

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08583

研究課題名（和文）嚢胞性腎疾患の発症に関わる細胞老化関連遺伝子の新規同定とその生理学的役割の解析

研究課題名（英文）Pathophysiological roles of cell senescence related gene in the polycystic kidney disease

研究代表者

波多野 亮（Hatano, Ryo）

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：60521713

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：Zfp277は細胞老化に関わる分子として同定されたが近年新たに細胞増殖が盛んな細胞において発現上昇していることが報告されるなど個々の細胞によって異なる役割を担う可能性が考えられる。腎臓での機能を明らかにするために疾患モデル動物を用いて検討を進め、Zfp277発現は多発性嚢胞腎のような細胞の増殖亢進を伴う病態において誘導されることが明らかになった。また、Zfp277欠損マウスでは膵臓において膵頭の成熟に異常がみられることが判明しており、加齢に伴う糖尿病の発症リスク増加につながる可能性も考えられた。本研究では、Zfp277は生体内において細胞の増殖を伴う過程において重要な役割を担う事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、転写因子の一種であるZfp277が生体内において細胞増殖を伴うような事象において発現が誘導され、組織の成熟や組織傷害に対する代償機構に関与することが明らかになった。生体の機能恒常性維持機能の一部としてZfp277は膵頭の成熟に寄与し成体における糖代謝恒常性の維持に寄与すると考えられ、その機能障害は糖尿病の発症リスクとなりうる。一方で、組織障害時の発現上昇は組織の修復過程で重要な役割を果たす可能性が考えられる。Zfp277の発現上昇は多発性嚢胞腎における細胞増殖にも寄与するものと考えられ、機能を制御することにより疾患の治療にも応用できることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Zfp277 was previously identified as a cell senescence associated transcriptional factor. By contrast, recent study revealed that the expression of Zfp277 is enhanced in actively proliferating cells, suggesting that Zfp277 plays distinct roles in different types of cells. In this study, we focus on the functional role of renal Zfp277 since it is highly expressed in the kidney. We observed that renal Zfp277 expression was upregulated in several animal models such as acute kidney injury (AKI) and polycystic kidney disease (PKD), suggesting that tubular Zfp277 expression is associated with the tubular cell proliferation. On the other hand, we discovered that numbers of pancreatic islet in adult Zfp277 knockout mice are significantly lower than wild type mice, suggesting that Zfp277 regulates islet cell growth. Our findings suggest that Zfp277 plays physiologically important roles in the regulation of cell proliferation and adaptive response to cell injury.

研究分野：腎生理学

キーワード：細胞増殖 多発性嚢胞腎

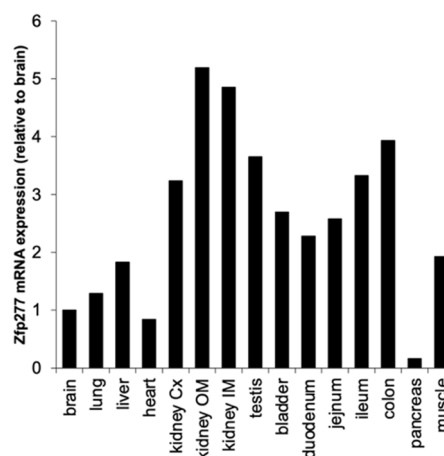
1. 研究開始当初の背景

(1) Zfp277 の生体における機能と疾患との関わり

Zfp277 (Zinc finger protein 277)は C2H2 型 Zinc finger domain をもつタンパク質であり、ポリコーム複合体因子として 2010 年に Negishi らによって報告された(Negishi *et al. PLoS ONE*. 5 : e12373, 2010)。Negishi らは Zfp277 ノックアウトマウスを作製し、マウス胎児線維芽細胞(MEF)を樹立してその機能解析を行い、Zfp277 欠損 MEF では Ink4a/Arf の発現が上昇することを発見している。さらに、クロマチン免疫沈降等の解析により、この Zfp277 欠損細胞ではポリコーム遺伝子複合体の Ink4a/Arf 遺伝子座への動員が障害されることや、酸化ストレス刺激により Zfp277 発現が抑制され、Ink4a/Arf 発現上昇が誘導されることも明らかにしており、Zfp277 は細胞老化制御に関わる重要な転写因子であることが示された。

一方で、Zfp277 は全身においてはユビキタスに発現しており(図 1)、各臓器における機能は明らかになっていないが、マウスにおいては Zfp277 発現が大腸癌の発症と関わる可能性が報告され(Cheng *et al. Mol Cancer*. 13:77, 2014)、細胞増殖の亢進を促す因子である可能性も示唆されていた。ヒトにおいては相同遺伝子として ZNF277 が存在しているが、その遺伝子変異により言語障害が生じることが報告されている(Ceroni F *et al. Eur J Hum Genet*. 22(10):1165-71, 2014)。また、腎臓の podocyte の機能障害に関わる因子の一つとしても挙げられている(Lu *et al. Kidney Int*. 92(5):1119-1129, 2017)。しかしながら、マウスにおける Zfp277 やヒトにおける ZNF277 の役割は十分に明らかになっておらず、様々な生理機能や疾患の発症との関連性に関しては未解明である。

図1. 組織におけるZfp277発現分布



(2) 多発性嚢胞腎(polycystic kidney disease)における Zfp 関連タンパク質の役割について

常染色体優性多発性嚢胞腎 ADPKD に関する研究はその責任遺伝子である PKD1 及び PKD2 がコードする polycystin-1、polycystin-2 の機能解析を中心に進められている。一方で、常染色体劣性多発性嚢胞腎 ARPKD に関しては、責任遺伝子の一つとして新たに *DZIP1L* が同定されている(Lu H *et al. Nat Genet*. 49(7): 1025-1034, 2017)。*DZIP1L* は、Zfp277 と同じ C2H2 型の Zinc finger タンパク質であり、*DZIP1L* は一次繊毛の移行帯及び基底小体に局在し、*DZIP1L* の変異に伴って移行帯のパリア形成異常を引き起こすことで PKD を発症するものと考えられている。一方、ネフロン癆に関わる 19 種類の遺伝子の中に、Zfp277 と同じ C2H2 型の Zinc finger protein として NPHP14 (ZNF423)が報告されている。また、NPHP7 は GLIS2 と呼ばれる 5 つの C2H2 型 Zinc finger ドメインを持つタンパク質であり、GLIS2 の欠損はアポトーシスと腎繊維化の亢進を引き起こし腎髄質に嚢胞を生じる(*Nat Genet*. 39(8):1018-1024, 2007)。このように嚢胞性腎疾患の責任遺伝子の中には、Zfp277/ZNF277 との共通点を有するものが含まれている。加えて、Gli ファミリーのような C2H2 型の Zinc finger タンパク質は一次繊毛に局在し、一次繊毛で受容したシグナルを核内へと伝えるヘッジホッグと呼ばれる重要な転写調節メカニズムに関わることも知られており、シグナル伝達分子の一つとして

Zinc finger タンパク質が重要な役割を担うことが広く知られている。

2. 研究の目的

本研究課題においては、細胞老化関連遺伝子として同定された *Zfp277* が多発性嚢胞腎の発症や様々な腎疾患の発症に及ぼす影響について *Zfp277* 欠損マウスを用いて解析を行い、その生理学的な機能について明らかにすることを目的として研究を実施した。また、*Zfp277* のヒトホモログである *ZNF277* については近年新たに TWAS などの網羅的解析から糖尿病のような疾患との関連性も報告されるようになっており、その機能の欠失は腎臓以外でも生体の機能に様々な影響を及ぼす可能性が考えられることから膵臓における *Zfp277* の役割についても併せて検討を行なった。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた *in vitro* での実験

マウス腎臓における *Zfp277* の免疫組織染色により、*Zfp277* が一次繊毛に局在することが予測された。そこで、一次繊毛における *Zfp277* の役割を明らかにする目的でマウス由来腎髄質集合管(mIMCD)細胞、イヌ由来腎尿細管上皮(MDCK)細胞を用いて *in vitro* での解析を実施した。*in vitro* では2次元培養において transwell 上で培養し、一次繊毛形成に及ぼす影響をアセチル化チューブリン等の免疫蛍光染色により評価した。さらに mIMCD、MDCK 細胞の3次元培養(Matrigel を用いて上記培養細胞を用いて Cyst を形成させる)を行い、*Zfp277* の siRNA による発現抑制によりそのサイズや形態に及ぼす影響についての検討を行った。

(2) 野生型及び *Zfp277* 欠損マウスを用いた *in vivo* での機能解析

様々な腎障害モデルマウス(腎虚血再灌流急性腎不全モデル、尿管結紮急性腎不全モデル、PKDモデル(*pcy* マウス))を用いて、*Zfp277* の発現変動や関連遺伝子発現について検討を行なった。さらに、*Zfp277* 欠損マウスを用いて、*Zfp277* 欠損に伴う病態の発症・進展への影響についても検討を行なった。

また、腎以外の臓器における *Zfp277* の役割についての解析についても検討を行なった。特に膵臓の解析では膵島の発達に影響がある可能性が考えられたため、膵島量や数、サイズに及ぼす影響などを解析した。

4. 研究成果

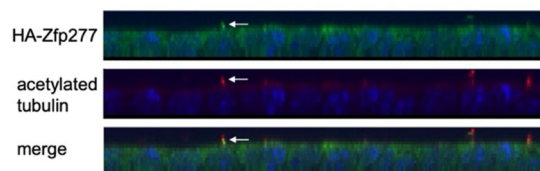
(1) 培養細胞における *Zfp277* の局在と機能解析 : *Zfp277* はマウス腎尿細管において一次繊毛に

局在することが免疫染色で観察された。

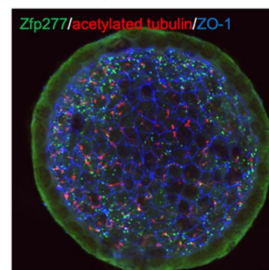
そこで mIMCD 細胞及び MDCK 細胞を用いて極性培養系にて局在を検討したところ、一次繊毛において発現している様子が確認された。HA タグ標識したりコンビナント *Zfp277* を発現しても同様に一次繊毛における局在が観察されており、これらの細胞では核内ではなく、一次繊毛に局在しているものと考えられた(図2)。次に mIMCD 細胞、MDCK 細胞を用いてマトリゲル内で3次元培養によりスフェロイドを形成させた。mIMCD

スフェロイドにおいても *Zfp277* は部分的に一次繊毛に局在する様子が見られた。しかし、siRNA により *Zfp277* の発現抑制を行いスフェロイドの形態に及ぼす影響を調べたが、明ら

図2. 培養細胞における *Zfp277* の細胞内局在



mIMCD細胞における *Zfp277* の局在

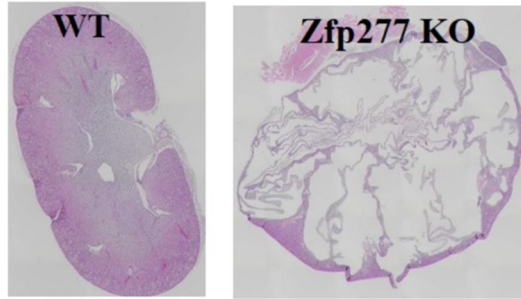


3次元培養 mIMCDスフェロイドにおける *Zfp277* の局在

かな形態異常は認められなかった。

- (2) 腎臓における Zfp277 の機能解析：研究開始当初、Zfp277 欠損マウスにおいて PKD 様の腎形態異常が見られ、Zfp277 を欠損することで PKD を発症する可能性を予想した(図 3)。しかしながら、戻し交配後の Zfp277 欠損マウスにおいてその表現型は消失したことから、単一の遺伝子の機能喪失では PKD を発症しないものと考えられた。

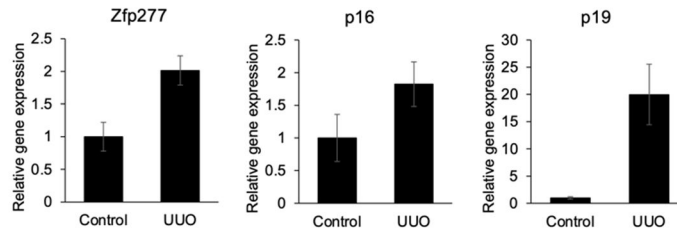
図3. 当初観察されたZfp277欠損マウスの腎臓のPKD様形態異常



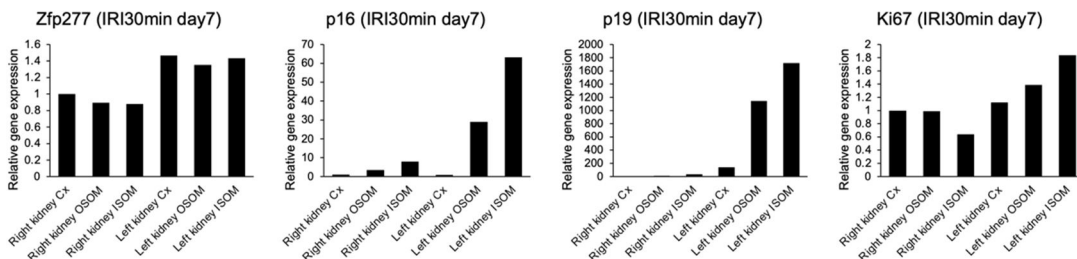
そこで Zfp277 の機能的な役割について C57BL/6 マウスを用いて、様々な病態時における *in vivo* での検討を行なった。Zfp277 の発現が

腎臓においてどのような条件で変化が見られるかどうかについて検討を行なった。まず、片側尿管結紮を行うことで腎障害を誘発した際の影響を調べたところ、対側の正常腎に比べて、Zfp277 発現が有意に上昇することがわかった(図 4)。この時、細胞老化に関連する p16^{INK4a} 及

図4.腎傷害モデルマウスにおけるZfp277と関連遺伝子発現変動



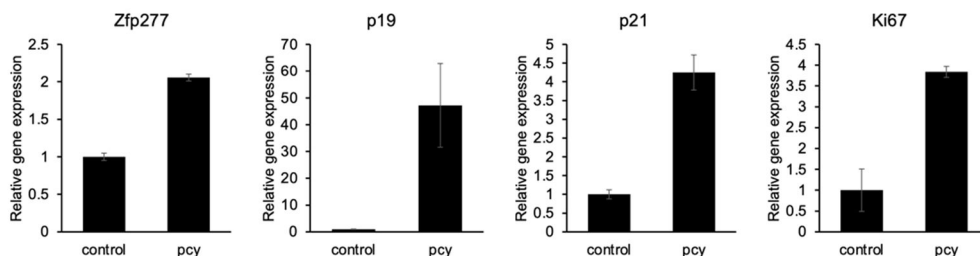
尿管結紮モデルマウスにおけるZfp277及び関連遺伝子発現



腎虚血再灌流モデルマウスにおけるZfp277及び関連遺伝子発現

び p19^{ARF} 発現に関しても同様に発現上昇が見られており、細胞の傷害に伴って発現上昇するものと考えられた。腎虚血再灌流により急性腎不全を誘発した場合にも同様に Zfp277 発現の上昇が見られ、この場合にも p16^{INK4a} 及び p19^{ARF} 発現の上昇が見られており、細胞の増殖マーカーである Ki67 の発現とも関連性が観察された(図 3)。さらに、PKD モデルマウスである pcy マウスを用いて解析を行なったところ、12 週齢の pcy マウスにおいて調べたところ多発性嚢胞腎においても zfp277 発現が有意に上昇しており、同様に p16^{INK4a} 及び p19^{ARF} 発

図5. pcyマウスにおけるZfp277及び関連遺伝子発現

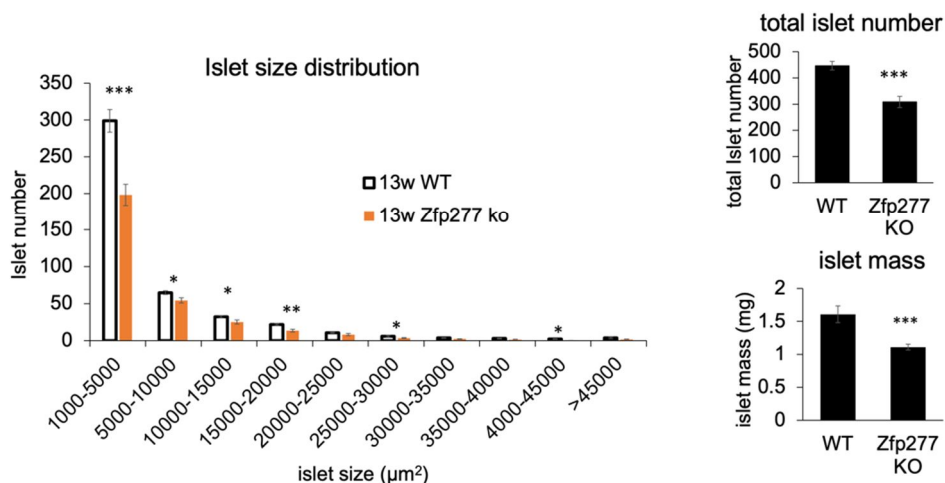


現の上昇が見られることがわかった(図5)。これらの結果から、腎尿管細胞においては血球細胞やMEFとは異なり、細胞の増殖過程において役割を担っているものと考えられた。

Zfp277についてはポリコム遺伝子との相互作用による細胞老化機能制御とは別に大腸癌の発症と関係があることが報告されている。Xieらは小腸において、Zfp277は初期の幹前駆細胞であるtransit amplifying cell(TAC)において高発現しており、 β -cateninシグナルによって制御されていることを報告している(Xie et al. *JCI insight* 2022)。現在、Zfp277欠損マウスを用いて急性腎不全やPKD発症に及ぼす影響について検討を進めているが、Zfp277欠損に伴う細胞障害や細胞の増殖抑制との関わりを今後さらに検討していく必要がある。

- (3) 膵島の成熟におけるZfp277の役割についての解析：一方で、Zfp277欠損マウスにおいては膵島(islet)形成に異常をきたすことが判明した(図6)。Zfp277欠損マウスでは生後4週前での過程では野生型と差が見られないが、成体マウスにおいてisletの数が野生型マウスよりも少なく、isletの成熟にZfp277が重要な役割を担っている可能性が考えられる。グルコース経口負荷試験では耐糖能異常などの明らかな異常は見られないが、前述のような細胞増殖の異常と関連している可能性が考えられる。最近新たにTWAS(トランスクリプトームワイド関連分析)により、ヒト2型糖尿病においてZNF277がT2DM susceptibility genesとしてピックアップされており(*Genome Biol.* 2022; 23: 196.)、Zfp277の遺伝子異常は潜在的に2型糖尿病の発症リスクを高める可能性が考えられる。

図6. Zfp277欠損マウスにおける膵島数、総膵島量



以上のように、本研究においてC2H2型Zinc finger domainの一種であるZfp277は様々な疾患の発症と関連して発現が誘導され、細胞の増殖や障害の進展に関わる分子である可能性が示された。また、先天的にその機能を欠損することも、糖代謝の恒常性維持などに影響を与える生体にとって重要な分子であることが強く示唆された。

<引用文献>

- 1) Negishi et al. *PLoS ONE*. 5(8): e12373, 2010
- 2) Cheng et al. *Mol Cancer*. 13:77, 2014
- 3) Ceroni F et al. *Eur J Hum Genet*. 22(10):1165-1171, 2014
- 4) Lu et al. *Kidney Int*. 92(5): 1119-1129, 2017
- 5) Lu et al. *Nat Genet*. 49(7): 1025-1034, 2017
- 6) Attanacio et al. *Nat Genet*. 39(8):1018-1024, 2007
- 7) Xie G et al. *JCI insight* 7(4): e150894, 2022
- 8) Atla et al. *Genome Biol.* 2022; 23: 196.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Lee E, Zhang X, Noda T, Miyamoto J, Kimura I, Tanaka T, Sakurai K, Hatano R, Miki T.	4. 巻 22(19)
2. 論文標題 Lecithin Inclusion by α -Cyclodextrin Activates SREBP2 Signaling in the Gut and Ameliorates Postprandial Hyperglycemia.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10796
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms221910796.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Moriyama Y, Hatano R, Moriyama S, Uehara S.	4. 巻 1862(12)
2. 論文標題 Vesicular polyamine transporter as a novel player in amine-mediated chemical transmission	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Biomembr.	6. 最初と最後の頁 183208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamem.2020.183208.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ma Y, Lee E, Yoshikawa H, Noda T, Miyamoto J, Kimura I, Hatano R, Miki T.	4. 巻 621
2. 論文標題 Phloretin suppresses carbohydrate-induced GLP-1 secretion via inhibiting short chain fatty acid release from gut microbiome.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 176-182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.06.069.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujimoto M, Yokoyama M, Kiuchi M, Hosokawa H, Nakayama A, Hashimoto N, Sakuma I, Nagano H, Yamagata K, Kudo F, Manabe I, Lee E, Hatano R, Onodera A, Hirahara K, Yokote K, Miki T, Nakayama T, Tanaka T.	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 Liver group 2 innate lymphoid cells regulate blood glucose levels through IL-13 signaling and suppression of gluconeogenesis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 5408
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-33171-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三木隆司、李恩瑛、芳川隼登、波多野亮、宮本潤基、木村郁夫
2. 発表標題 腸内細菌叢と宿主の代謝クロストーク
3. 学会等名 第99回日本生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 波多野亮、張錫麟、馬玉潔、陳雪、李恩瑛、金田篤志、三木隆司
2. 発表標題 膵 細胞傷害モデルマウスを用いた膵島再生機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会大会第141回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 波多野亮、張錫麟、馬玉潔、陳雪、李恩瑛、金田篤志、三木隆司
2. 発表標題 Investigation of molecular mechanisms in pancreatic cell regeneration using -cell-specific injured mice
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会第98回 日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Xue Chen, Xilin Zhang, Ryo Hatano, Yujie Ma, Atsushi Kaneda, Eunyong Lee, Takashi Miki
2. 発表標題 Adult murine pancreatic b cells retain repetitive proliferation capacity in a diphtheria toxin mediated cell ablation model
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 波多野亮、張 錫麟、馬 玉潔、陳 雪、李 恩瑛、金田篤志、三木隆司
2. 発表標題 膵 細胞傷害モデルマウスを用いた膵島再生機構の解析
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 波多野亮、李恩瑛、三木隆司
2. 発表標題 腎臓における糖代謝と糖新生の役割と制御
3. 学会等名 第99回日本生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 張錫麟、波多野亮、李恩瑛、金田篤志、三木隆司
2. 発表標題 レーザーマイクロダイセクション法による膵島再生の分子機構の解明
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三木隆司、波多野亮、張錫麟、陳雪、馬玉潔、金田篤志、李恩瑛
2. 発表標題 膵 細胞再生の分子機構
3. 学会等名 令和2年度生理研研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 波多野亮
2. 発表標題 膵 細胞の再生様式と分子機構
3. 学会等名 第14回千葉糖尿病診療研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 波多野亮、張 錫麟、馬 玉潔、陳 雪、李 恩瑛、金田篤志、三木隆司
2. 発表標題 膵 細胞傷害モデルマウスを用いた膵島再生機構の解析
3. 学会等名 第141回日本薬学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 波多野亮、張 錫麟、馬 玉潔、陳 雪、李 恩瑛、金田篤志、三木隆司
2. 発表標題 Investigation of molecular mechanisms in pancreatic cell regeneration using -cell-specific injured mice
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会第98回 日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 波多野亮
2. 発表標題 腎臓における糖代謝 腎糖新生の役割
3. 学会等名 第40回千葉糖尿病研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 波多野亮、三木隆司
2. 発表標題 臓器連関による生体恒常性維持機構と生体活動の統合的理解 肝臓-腎臓間クロストークを介した腎糖新生制御機構の解析
3. 学会等名 生理学研究所研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 波多野亮、三木隆司
2. 発表標題 臓器間クロストークを介した腎糖新生制御機構
3. 学会等名 第100回日本生理学会記念大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	伊藤 素行 (Ito Motoyuki) (20377906)	千葉大学・大学院薬学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	三木 隆司 (Miki Takashi) (50302568)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	Wiriyasermkul Pattama (Wiriyasermkul Pattama) (80825836)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教 (32651)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------