

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009年度～2010年度

課題番号：21890170

研究課題名（和文）多発性嚢胞腎の新たな発症機序の解明～腎近位尿細管のPTENとEGF受容体の役割～

研究課題名（英文）The new mechanism in the development of polycystic kidney～the role of PTEN and EGF receptor in the proximal tubule～

研究代表者

長井 幸二郎（ナガイ コウジロウ）

徳島大学・病院・講師

研究者番号：40542048

研究成果の概要（和文）：

多発性嚢胞腎の発症機序は以前として不明であるが、PTENを近位尿細管特異的にノックアウトすることで嚢胞腎が形成されることを発見した。その機序として細胞増殖が主であり、アポトーシスやciliaが関わっているのではないことが示唆された。PTENとEGF受容体とのダブルノックアウトマウスは生まれているが、ラインにより、ノックアウトの比率が異なるため、現在効率のよいラインを選択して、マウスの数を増やしつつある。

研究成果の概要（英文）：

The mechanism in the development of polycystic kidney is still unclear. We developed the proximal tubule specific PTEN knockout mice and found the development of polycystic kidney. We investigated the proliferation and apoptosis in the proximal tubule and the proliferation can be the main factor of the cyst formation. We also checked the cilia and the number and the length of the cilia were not different from control mice. To clarify the role of the EGF receptor in the cyst formation, we started to establish PTEN-EGF receptor double knockout mice in the proximal tubule. Now, we are choosing the effective line to develop the double knockout.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 腎臓内科学

キーワード：PTEN EGF受容体 多発性嚢胞腎

1. 研究開始当初の背景

ヒト多発性嚢胞腎は末期腎不全にいたる主要な原疾患である。その多くは遺伝性であり、いまだ有効な治療法は解明されてい

い。その責任分子として polycystin-1、polycystin-2及びfibrocystinなどが同定されたが、それによる嚢胞形成の発症メカニズ

ムは解明されていない(N Engl J Med. 2004 350(2):151-64.)。

多発性嚢胞腎では、尿細管上皮細胞の「脱分化」、すなわち、増殖、アポトーシス、分泌機序の変化、細胞外基質の増生がおこる(Kidney Int. 2005 67(4):1234-47.)。そのプロセスに尿細管上皮の cilia(鞭毛)の異常が重要な役割を果たすことが、責任分子である polycystin-1 などが鞭毛に存在することから証明されている。

その中で近年 mTOR 細胞伝達経路の嚢胞形成への関わりが示唆された。mTOR 細胞伝達経路の上流には tuberin/TSC2 というヒトに腎嚢胞を引き起こす疾患である結節性硬化症の責任分子が存在し、その欠損、変異によって mTOR 経路の活性化が起こることがわかっているが(Nat Genet. 2005 37(1):19-24.)、Weimbs T らは polycystin-1 がその tuberin/TSC2 と結合することを細胞実験で確認した。そこで mTOR 経路が多発性嚢胞腎に関与することをうたがい、ヒトの多発性嚢胞腎とそのマウスモデルを検討したところ、嚢胞上皮細胞で mTOR 経路の活性化を認めた。更に mTOR 経路の活性化阻害剤である rapamycin をマウスモデルに投与したところ嚢胞形成を抑制した。また、ヒトで多発性嚢胞腎が原因の末期腎不全患者に対する腎移植の際 rapamycin を使用したところ、嚢胞が縮小したことから、嚢胞形成への mTOR 経路の関与が強く疑われた(Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 103(14):5466-71.)。以上から、mTOR 経路が嚢胞形成に関わることがわかっているが、嚢胞の発症を近位尿細管に引き起こすかどうかは未だ不明である。

また Epidermal growth factor receptor (EGF 受容体)は嚢胞上皮にて発現部位が尿細管基底膜側から管腔側にうつり、尿細管腔への分泌機序を変化させることによって嚢胞の増大に関与することが示唆されている(N Engl J Med. 2004 ;350(2):151-64.)。In vitro では尿細管細胞において EGF 受容体の下流に mTOR 経路が存在することが示されているが(J Am Soc Nephrol. 2006;17(6):1615-23)、その嚢胞形成への役割は明らかとはなっていない。

2. 研究の目的

有効な治療法のないヒト多発性嚢胞腎の新たな発症機序を近位尿細管特異的に PTEN、EGF 受容体をノックアウトしたマウスを介し

て解明する。

3. 研究の方法

1, PTEN ノックアウトマウスの組織の評価

すでに PTEN ノックアウトマウスの標本は Vanderbilt University の Dr. Eric G Neilson との共同研究として手に入れており、まず嚢胞形成のメカニズムとして重要な細胞増殖を Ki67 染色で、アポトーシスを Tunnel 染色、activated Caspase-3 染色で評価し、どちらが PTEN ノックアウトマウスで嚢胞形成に大きく関わっているかを近位尿細管のマーカーである Lotus tetragonolobus lectin(LTA)との二重染色によって近位尿細管特異的に評価する。

次に嚢胞形成と強い因果関係を証明されている cilia の形態の解析をすすめるため、cilia のマーカーである acetylated α -tubulin (J Am Soc Nephrol. 2008 19(3):469-76.)と、LTA とで二重染色し、近位尿細管細胞にある cilia の数を検証する。同時に、電子顕微鏡にて cilia の長さ、形態を検討する。

2, PTEN ノックアウトマウスへの rapamycin 投与による治療

PTEN ノックアウトマウスが掛け合わせにより誕生すれば、rapamycin 投与による治療を開始する。生後 8 週には PTEN 欠損尿細管細胞肥大を認めるので、そこから腹腔内投与にて治療を開始し、まず mTOR 経路の活性が抑制されていること(rapamycin 投与が効いていること)を rpS6 のリン酸化を Western blotting で見ることにより確認する。その後、肥大の程度を腎重量/体重値と蛋白合成/DNA 合成の比から(J Am Soc Nephrol. 2005 16(5):1384-91.)、そして嚢胞形成の主因である細胞増殖、アポトーシスを Ki67 染色、Tunnel 染色、activated Caspase-3 染色にて近位尿細管細胞特異的に評価する。rapamycin は可能な限り長期投与し、嚢胞形成への影響をも検討する。

3, 近位尿細管細胞特異的 PTEN ノックアウトマウス、PTEN/EGF 受容体ダブルノックアウトマウスの作成

gamma-GT Cre マウス、PTEN floxed マウス、EGFR floxed マウスはすでに提供先から譲渡の同意を得ており、現在マウスの移動にあたっての感染検査などを提供先と連絡をとりながら行っている。マウスを入手しだい掛け合わせを開始し、PTEN ノックアウトマウス、

EGF 受容体ノックアウトマウス、PTEN/EGFR ダブルノックアウトマウスを作成する。

それまでに PTEN ノックアウトマウスの嚢胞上皮細胞にて EGF 受容体の発現を染色にて検証し、EGF 受容体の発現部位の変化を確認しておく。

なお今回の実験は遺伝子組み換え実験で、学内で承認申請中であり、承認を受けた後、実験を開始する。

4. PTEN/EGF 受容体ダブルノックアウトマウスの解析

PTEN/EGF 受容体ダブルノックアウトマウスにおいては、まず、PTEN、EGF 受容体の両方ともが近位尿細管特異的にノックアウトされていることを PCR(遺伝子)及び、腎蛋白の Western blotting、近位尿細管のマーカーである LTA との二重染色(蛋白発現)によって確認する。そのマウスを使って生後 8 週の時点で腎肥大の程度を上記のパラメーターを使って検定する。また近位尿細管細胞の面積を測り、近位尿細管細胞特異的に肥大を検討し、EGF 受容体を介するシグナルの尿細管細胞肥大に対する影響を検討する。

次に生後 9 ヶ月から 12 ヶ月にてやはり LTA の染色によって近位尿細管を同定し、近位尿細管に形成される嚢胞の大きさを見ることにより、また、線維化の程度を collagen I 染色や Masson Trichrome 染色により、染色された面積を測ることにより評価する。機能的には尿蛋白の排出量を蓄尿により測定し、血清クレアチニンは HPLC 法を使って検討する。また、嚢胞形成のメカニズムである細胞増殖と、アポトーシスを評価する。それらの値から EGF 受容体の嚢胞形成への寄与を検討する。

肥大や嚢胞形成へ EGF 受容体の欠損が影響すれば、Akt/mTOR 経路の活性化の程度と比較することにより、Akt/mTOR 経路の肥大、嚢胞形成への関与が確認できる。

続いて、更に長期に観察し、PTEN ノックアウトマウスにおける癌形成の有無、さらにもし癌を発症するのであれば、EGF 受容体のダブルノックアウトによりどれくらい発症の頻度が影響をうけるか評価する。

4. 研究成果

まず PTEN ノックアウトマウスで PTEN が近位尿細管特異的にノックアウトされていること、その下流のマーカーである ribosomal S6 の活性化があることを western blotting

と免疫染色で確認した。

次に生後 9 ヶ月～12 ヶ月で嚢胞が形成される顕微鏡下に明らかとなるが、それが PTEN をノックアウトした部分であることを確認するため、組織を近位尿細管細胞のマーカーである LTA と集合管などのマーカーである DBA で染色し、LTA 陽性尿細管の管腔と DBA 陽性尿細管の管腔、両方のサイズを測定した。すると、DBA 陽性尿細管の管腔は PTEN ノックアウトマウスでコントロールと同様であったが、LTA 陽性尿細管の管腔は生後 3 ヶ月では差がなかったが、生後 9 ヶ月～12 ヶ月では有意な差をみとめた。以上より PTEN がノックアウトされた近位尿細管で特異的に嚢胞が形成されたことが明らかとなった。また、Masson Trichrome 染色や collagen I 染色での染色領域の測定から有意に線維化を伴うことが明らかとなった。加えて、尿蛋白排出増加、血清クレアチニンの上昇を認めることを見いだした。これは、この嚢胞形成が PTEN をノックアウトしたことによって直接的に発症したことを示唆し、さらに病理学的変化に加え、腎機能障害もあることからヒトの多発性嚢胞腎に類似した病変を発症したことが明らかになった。

そのメカニズムとして、嚢胞形成の機序にあげられる細胞増殖やアポトーシスの有無について検討したところ、細胞増殖のマーカーである Ki67 の染色にて LTA 陽性細胞すなわち近位尿細管細胞の増殖は 3 ヶ月の時点ですでに有意な増殖をみとめ、それが少なくとも 12 ヶ月後、病変がすでに形成された時期においても持続することがわかった。一方、アポトーシスは tunnel 染色や Cleaved Caspase-3 染色で確認したところ、やはり近位尿細管細胞において有意に増加するものの、染色された核の数は腎臓の長軸にそった輪切りの面に対して 2, 3 個とごく軽微であることから増殖の方が有意に嚢胞形成に関わっていることが示唆された。また比較的長期間にわたる細胞増殖の継続によって嚢胞形成が徐々に形成されることが明らかとなった。

次に治療法を考慮するため、PTEN のノックアウトによって活性化される mTOR 経路の阻害剤である rapamycin を 2 週間マウスへ投与した。まずは rapamycin の投与量が有効であるかどうかを確認するために、mTOR 経路の活性化をその surrogate marker である

ribosomal S6 の活性化を検出する抗体にて確認したところが westernblotting と免疫染色で rapamycin によりその活性化が抑制されていることを確認した。同時に、Ki67 をマーカーとする近位尿細管細胞の増殖も有意に減少したことから、rapamycin の投与が嚢胞形成の軽減につながる可能性があることが示唆された。

ヒト多発性嚢胞腎では polycystin-1 といった cilia に存在する蛋白が責任遺伝子であることが明らかになってきているため、近位尿細管特異的 PTEN ノックアウトマウスにおいても cilia における蛋白発現や、形態変化を検討した。

まず上記の PTEN ノックアウトマウスに polycystin-1 の染色を施行したところ、発生時には発現が強いものの、生後からは急激に発現が低下しており、コントロールと同様なパターンをとっていた。すなわち、PTEN が polycystin-1 を介して嚢胞形成を引き起こしたのではないことを確認した。

また cilia の数をやはり PTEN ノックアウトマウスにおいて、acetylated α -tubulin の染色で確認したところ、cilia の近位尿細管細胞数に対する数はコントロールとかわらなかった。さらに電子顕微鏡にて cilia の形態を確認し、その長さ、太さもコントロールに対して著変は見られなかった。以上から PTEN は cilia の形態的、機能的変化を介して病変形成を起こしているのではないと思われる。

次に PTEN の欠損はヒトに対して臓器によっては良性、もしくは悪性腫瘍を起こすことが報告されているので、生後2年までノックアウトマウスの経過をおったが、腎臓への癌形成は見られなかった。ヒトに対して同様に腎嚢胞やがん形成をおこす VHL 遺伝子をマウスの腎臓の近位尿細管特異的にノックアウトさせても嚢胞は出来るものの、癌形成はできなかつたことから (Cancer Res. 2006 66(5):2576-83.)、マウスの近位尿細管細胞にはヒトとは違う癌形成への抵抗性があることが示唆された。

次に嚢胞形成に関与すると言われる EGF 受容体を PTEN と同時にノックアウトすることを試みた。PTEN のみのノックアウトマウスと同様、EGF 受容体のみのノックアウトマウスも近位尿細管細胞でほぼ 100%ノックアウトされることは染色で確認されていたが、ダブ

ルノックアウトを作成したところ、ラインにより、ノックアウトの効率に差があることがわかった。そこで 100%ノックアウトが起こるラインを選定し、そのラインのマウスを解析に足りる匹数になるよう育成中である。

現時点では生後3ヶ月の近位尿細管特異的ダブルノックアウトマウスを3匹ほど検討した。PTEN, EGF 受容体それぞれの発現がノックアウトされていることは染色のみならず westernblotting でも確認されたが、腎臓の肥大に関しては EGF 受容体をノックアウトしても著明な変化はみられなかった。また、Ki67 染色にて近位尿細管細胞の増殖に関しても著変がみられていないため、嚢胞形成がダブルノックアウトマウスで影響があるとすれば分泌機序の変化で有る可能性が高いと思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔報告〕

Multiple cyst formation in PTEN conditional knockout mice in kidney. 41st Annual meeting, American Society of Nephrology

長井 幸二郎

Philadelphia, U. S. A.

平成20年11月7日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
<http://www.tokudai-kidney.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長井 幸二郎 (ナガイ コウジロウ)
徳島大学・病院・講師
研究者番号：40542048

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：