

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591243

研究課題名(和文)細胞内水チャネルによるオートファジー制御と腎嚢胞形成機構の解明

研究課題名(英文)The regulation of autophagy and the development of polycystic kidneys by an intracellular aquaporin

研究代表者

石橋 賢一 (Ishibashi, Kenichi)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80223022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：水チャネルであるAQP11は細胞内オルガネラ膜に存在し、その欠損マウスは生後1カ月で多発性のう胞腎による腎不全のために死にます。のう胞形成に先だって腎臓の近位尿細管細胞内に空胞が出現しますが、この一部にオートファジー(細胞内のタンパク質を分解するための仕組みの一つ)が関与していることが、オートファジーの発現を可視化したマウスや培養細胞を使った今回の研究で明らかにできました。今後オートファジーを制御することによってのう胞腎を治療できる可能性があります。

研究成果の概要(英文)：The aquaporin-11 (AQP11) is a water channel expressed at the intracellular organelle. The AQP11 null mice are fatal due to kidney failure caused by polycystic kidneys around one month after birth. Before developing polycystic kidneys, their proximal tubular cells have multiple vesicles. We have identified enhanced autophagy, a self-degradative process in the proximal tubules of AQP11 null mice as well as their primary cultured cells with visualization of activated LC3, a marker for autophagy. Our results suggest that the manipulation of autophagy will be a promising treatment modality for polycystic kidneys.

研究分野：水・電解質代謝

キーワード：水チャネル オートファジー 腎のう胞 小胞体ストレス 細胞内空胞 近位尿細管 ノックアウトマウス トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 水チャネルAQP11のノックアウト(KO)マウスは、腎臓の近位尿細管上皮細胞に多数の細胞内空胞と、それに引き続いておきる巨大な腎嚢胞を形成し、生後30日から60日程度で多発性嚢胞腎により死亡する。

(2) AQP11は細胞内小胞に発現するので、他のアキュアポリン(AQP)に比べ機能解析が困難で、詳細については不明な点が多い。

(3) AQP11は小胞体(ER)に多く発現しており、細胞全体を網の目のように分布するERのコンパートメントのホメオスタシスに重要で、ERストレス反応を防いでいる可能性もある。

(4) AQP11の欠損によって小胞体をはじめとする細胞内オルガネラの浸透圧勾配格差が生じて細胞障害がおき、その後再生する細胞にも空胞がみられるのでオートファジーによる細胞分化異常のために嚢胞上皮細胞になってしまう可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 腎臓近位尿細管のように大量の水と電解質が流入する細胞では特にこれらをうまく処理しないと、オルガネラ内での浸透圧やイオン濃度変化がおきて細胞内代謝がうまくいかなくなり、変性した蛋白やオルガネラができオートファジーによって除去されると考えられるので、それを明らかにする。

(2) 腎臓以外の臓器でのAQP11欠損によるオートファジーについても明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 全身のオートファゴソームが蛍光標識されるGFP-LC3トランスジェニックマウスとAQP11欠損マウスとを掛けあわせることで、近位尿細管だけでなく、全身でのオートファジーの発現を可視化できるようにする。

(2) AQP11ノックアウトマウスと野生型の近位尿細管細胞の初代培養細胞を作成して、オートファジーの発現に差がみられるかどうかを検討する。

(3) 脳ではAQP11は血管内皮細胞に発現しており、実験的脳浮腫でのAQP11の有無の影響、脈絡叢の上皮細胞での発現変化を検討する。

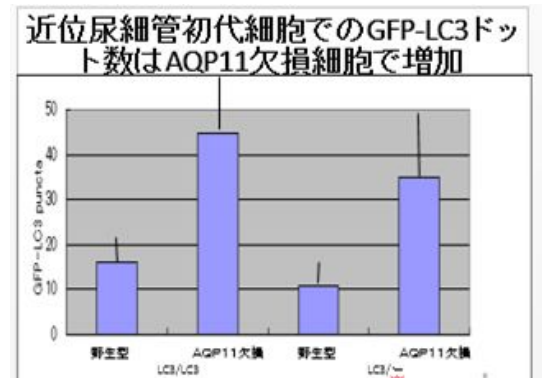
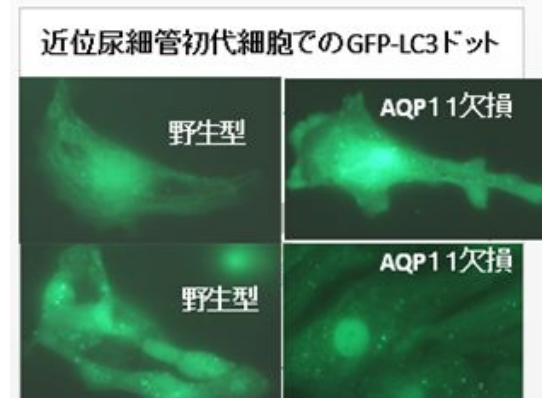
(4) 生後2, 3, 6, 8週令のAQP11ノックアウトマウスの腎臓RNA発現を正常マウスと以下の項目について比較する(マイクロアレイ、リアルタイムPCR): オートファジー、小胞体ストレス応答、アポトーシス、活性酸素ストレス。

(5) さらに、近位尿細管障害モデルであるシスプラチン腎症においてAQP11のコピー数の影響やそれを軽減する薬剤について検討する。

4. 研究成果

(1) 全身のオートファゴソームが蛍光標識されるGFP-LC3トランスジェニックマウスとAQP11ノックアウトマウスを交配して、AQP11ノックアウトマウスの生後3日において近位尿細管でのオートファジーが亢進していることが確認された。その後のう胞形成まで皮質の深い部分にオートファジーが強く、浅い部分では弱くアポトーシスが亢進していることが示唆された。さらに絶食によるオートファジーの誘導でも、AQP11が半分しかないヘテロマウスのほうが野生型マウスよりオートファジーが強く誘導された。

(2) 近位尿細管細胞の初代培養細胞のGFP-LC3のドット数をかぞえることでオートファジーの程度を定量化したら、AQP11ノックアウトマウスのほうが野生型より増加していた。



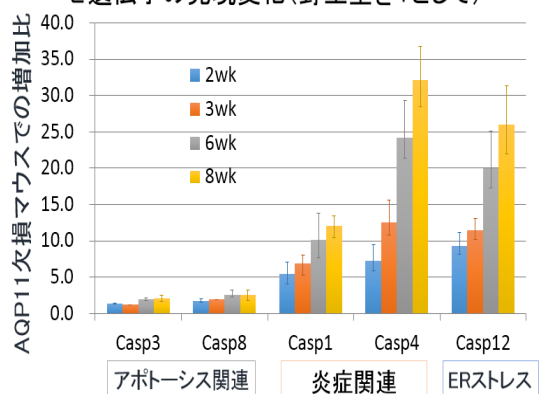
(3) AQP11ヘテロマウスではシスプラチン腎障害が野生型マウスより強く出ることがあきらかになり、活性酸素を軽減させるD-システインの経口投与で腎障害が軽減した。

(4) 脈絡叢の細胞内空胞がAQP11欠損で見られるのにオートファジーが関与しているかどうかを検討する目的でGFP-LC3を観察したが誘導は確認できなかった。さらに脈絡叢細胞での遺伝子発現の差をマイクロアレイ

で比較したところ、アポトーシス、細胞接着、カルシウム輸送に関連した遺伝子の増加がみられた。

(5) AQP11 欠損マウスは生後2週でオートファジーがさかんで細胞内空胞がみられる。オートファジーよりも酸化ストレスやアポトーシスに関連した遺伝子発現が亢進し、嚢胞形成が進行するにつれて増加していた。オートファジーによって生き延びた細胞のうちのう胞を形成する可能性があきらかになった。

AQP11欠損マウスの出生週令によるカスパーゼ遺伝子の発現変化(野生型を1として)



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5件)

Morishita Y, Yoshizawa H, Watanabe M, Ishibashi K, Muto S, Kusano E, Nagata D. siRNAs targeted to Smad4 prevent renal fibrosis in vivo. *Sci Rep*. 2014 Sep 19;4:6424.

doi: 10.1038/srep06424

Inoue Y, Sohara E, Kobayashi K, Chiga M, Rai T, Ishibashi K, Horie S, Su X, Zhou J, Sasaki S, Uchida S. Aberrant Glycosylation and Localization of Polycystin-1 Cause Polycystic Kidney in an AQP11 Knockout Model. *J Am Soc Nephrol*. 2014 25: 2789-2799.

doi: 10.1681/ASN.2013060614.

Ishibashi K, Tanaka Y, Morishita Y. The role of mammalian supraaquaporins inside the cell *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General* 1840: 1507-1512, 2014

doi:10.1016/j.bbagen.2013.10.039

Morishita Y, Imai T, Yoshizawa H, Watanabe M, Ishibashi K, Muto S, Nagata D. Delivery of microRNA-146a with polyethylenimine nanoparticle inhibits renal fibrosis in vivo. *International Journal of Nanomedicine*. 10: 3475-3488, 2015

DOI:http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S82587

Yasuko Tanaka, Yoshiyuki Morishita, Kenichi Ishibashi. Aquaporin10 is a pseudogene in cattle and their relatives. *Biochemistry and Biophysics Reports*. Volume 1, May 2015, Pages 16-21

doi:10.1016/j.bbrep.2015.03.009

〔学会発表〕(計15件)

ER-Stress and Endosomal Abnormalities in the Kidney of AQP11 NullMice: Shintaro Kondo, Tadashi Yamamoto, Yasuko Tanaka, Kenichi Ishibashi. *Renal Week 2012, American Society of Nephrology*, 2012/11, San Diego, USA

Impaired Trafficking of Polycystin-1 May Be a Key Mechanism of Cyst Formation in the Aquaporin-11 Knockout Mouse: Yuichi Inoue, Eisei Sohara, Katsuki Kobayashi, Tatemitsu Rai, Kenichi Ishibashi, Sei Sasaki, Shinichi Uchida. *Renal Week 2012, American Society of Nephrology*, 2012/11, San Diego, USA

近位尿細管起源の多発性嚢胞腎モデル(AQP11 欠損マウス)での経時的アレイ解析: 近藤信太郎、田中靖子、山本格、石橋賢二. 日本薬学会第133年会、2013/3、横浜

脳浮腫治療をめざした脳梗塞モデルマウスにおけるアクアポリン11の機能解: 田中靖子、一柳美聡、倉光優太、清治めぐみ、山本龍世、石橋賢二. 日本薬学会第133年会、2013/3、横浜

AQP11 欠損による多発性嚢胞腎発症に關与する遺伝子とタンパクの網羅的解析: 石橋賢二、近藤信太郎、山本格、田中靖子. 第56回日本腎臓学会学術総会、2013/5、東京

Aquaporin-10 May Not Be Physiologically Important in Mammals as Some Are Pseudogenes: Kenichi Ishibashi, Ryouya Koma, Kenma Nozaki, Yasuko Tanaka, Yoshiyuki Morishita. *Renal Week 2013, American Society of Nephrology*, 2013/11, Atlanta, USA

Aberrant Glycosylation and Localization of Polycystin-1 Cause Polycystic Kidney in AQP11-Knockout Mice: Yuichi Inoue, Eisei Sohara, Katsuki Kobayashi, Tatemitsu Rai, Kenichi Ishibashi, Shigeo Horie, Xuefeng Su, Jing Zhou, Sei Sasaki, Shinichi Uchida. *Renal Week 2013, American Society of Nephrology*, 2013/11, Atlanta, USA

シンポジウム:「アクアポリンを標的とし

た診断・創薬の新らたな可能性」AQP 欠損からみた AQP の役割：AQP11 と多発性嚢胞腎：石橋賢一、日本薬学会第 134 年会、2014/3、熊本

シンポジウム：「拡散強調 MRI で何が見えるか-水透過性と灌流の可視化」アクアポリンによる水輸送調節：細胞膜アクアポリンと細胞内膜アクアポリン：石橋賢一、第 42 回磁気共鳴医学会大会、2014/9、京都

Polycystin-1 の糖鎖と細胞内局在の異常が AQP11 ノックアウトマウスの嚢胞腎形成を引き起こす：井上佑一、蘇原映誠、小林克樹、頼建光、石橋賢一、堀江重郎、内田信一、佐々木成、第 24 回バソプレシン研究会、2014/1、東京

細胞内水チャネル AQP11 のマウス腎組織におけるオートファジー制御機構の解明：田中靖子、高木瑛美、坂元雄基、倉光優太、清治めぐみ、石橋賢一、日本薬学会第 134 年会、2014/3、熊本

反芻偶蹄哺乳類アクアポリン 10(AQP10) 遺伝子の偽遺伝子化：石橋賢一、狛諒哉、野崎憲真、田中靖子、第 57 回日本腎臓学会学術総会、2014/7、横浜

Enhanced Autophagy in the Proximal Tubule with Intracellular Vacuoles from AQP11 Null Mice Leading to the Development of Polycystic Kidneys: Tanaka Y, Watari M, Takagi E, Sakamoto Y, Morishita Y, Ishibashi K., Renal Week 2014, American Society of Nephrology, 2014/11, Philadelphia, USA

Elongated Ciliary Length of Proximal Tubules in a PKD Model AQP11 Knockout Mouse: Inoue Y, Sohara E, Kobayashi K, Rai T, Ishibashi K., Horie S, Su X, Zhou J, Sasaki S, Uchida S, Renal Week 2014, American Society of Nephrology, 2014/11, Philadelphia, USA

AQP11 欠損マウス近位尿細管細胞でのオートファジーとアポトーシス亢進：石橋賢一、渡真弓、高木瑛美、坂元雄基、田中靖子、第 58 回日本腎臓学会学術総会、2015/6 名古屋

〔図書〕(計 3 件)

Navigate 神経疾患：石橋 賢一：医学書院 (2013/6/3)

Navigate 腎疾患：石橋 賢一：医学書院 (2013/6/3)

Navigate 循環器疾患：石橋 賢一：医学書院 (2014/9/15)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.my-pharm.ac.jp/~kishiba/sub4.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石橋 賢一 (ISHIBASHI, Kenichi)

明治薬科大学・病態生理学・教授

研究者番号：80223022

(2) 研究協力者

田中 靖子 (TANAKA, Yasuko)

明治薬科大学・病態生理学・講師

研究者番号：20386452