

平成 29 年 6 月 30 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461235

研究課題名(和文) 繊毛/繊毛蛋白異常による中心体/細胞周期同調機構破綻と嚢胞性腎疾患発生機序解明

研究課題名(英文) Mechanisms to develop renal cyst formation and progression by disruption of cilia/centriole and cell cycle relationships

研究代表者

横山 尚彦 (yokoyama, Takahiko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70191525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：嚢胞性腎疾患は尿細管の一部もしくは全体が拡張する病態である。遺伝的嚢胞性腎疾患として、常染色体優性および劣性多発性嚢胞腎(ADPKDおよびARPKD)、若年性ネフロン癆(NPHP)などがある。嚢胞性腎疾患の共通に観察される病態の一つに、細胞増殖亢進がある。細胞増殖を押さええる薬剤投与により嚢胞進展を抑制することや、逆に、c-mycやAPCを腎臓で過剰発現させることで腎臓嚢胞が発生することが知られている。したがって、細胞増殖亢進が嚢胞進展を進めていることが考えられている。本研究では、細胞増殖、細胞周期、嚢胞進展の関係を継時的に詳細に検討した。

研究成果の概要(英文)：Renal cysts occur when kidney tubules become enlarged. These cysts are observed in numerous genetic diseases and, recently, several causative genes for these diseases have been cloned. Most of the products of these genes are localized in cilia and/or centrioles. In addition, mutant mice lacking cilia develop renal cysts. Therefore, cilia are thought to have an important role in renal cystogenesis. One of the mechanisms to develop renal cysts is abnormal cell proliferation. Presence of cilium is tightly linked with cell cycle. In the present study, we studied relationships among cell cycle, cell proliferation and renal cyst development in detail.

研究分野：発生生物学

キーワード：腎嚢胞 細胞増殖 細胞周期 繊毛

1. 研究開始当初の背景

嚢胞性腎疾患では、上皮細胞の異常な増殖や分化に起因すると考えられるネフロンや尿細管が拡張した嚢胞が観察される。嚢胞形成による腎臓の構造及び機能に障害は、高血圧や貧血、腎不全を引き起こすため、病態解明を目的とした多くの研究が行われている。この疾患は、後天的な原因以外に、先天的な遺伝子の異常により引き起こされる事も知られている。遺伝性の嚢胞性腎疾患として最も症例が多いのは、出生 400~1,000 人に一人の割合で発症するとされている常染色体優勢多発性嚢胞腎 (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease; ADPKD) である。ADPKD は 2 つの原因遺伝子 *PKD1* と *PKD2* が同定されている。これらの遺伝子は、それぞれタンパク質 polycystin1 (PC1) と polycystin2 (PC2) をコードしている。常染色体劣勢多発性嚢胞腎 (Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease; ARPKD) は小児期に発症し、肝線維化を伴うことが知られている。この疾患は 20,000 人に一人の割合で発症するといわれており、原因遺伝子 *PKHD1* は polyductin/fibrocystin をコードしている。

若年性ネフロン癆 (Nephronophthisis; NPHP) も常染色体劣性の嚢胞性腎疾患であるが、間質の線維化を伴った腎皮髄の嚢胞形成を特徴としており、多くの場合、小児期及び若年期 (青年期) に末期腎不全を引き起こす。現在までに 19 種類の原因遺伝子 (*NPHP1* ~ *19*) が見出されており、これらの遺伝子は nephrocystin-1 ~ 19 をコードしている。

腎臓における尿細管の管腔径は約 50 μm 程度になるように制御されているが、嚢胞性腎疾患の患者では尿細管の拡張がみられる。嚢胞が形成される詳細な分子メカニズムは未だ不明な点が多いが、嚢胞が形成された腎臓では尿細管上皮における異常な細胞の増殖や分裂軸のずれが多く観察されている。従って、細胞の分化制御や細胞周期制御、細胞分裂軸制御の異常が複合的に作用し嚢胞を形成する可能性が高いと考えられている

2. 研究の目的

本研究では、若年性ネフロン癆 (Nephronophthisis; NPHP) のモデルマウスである *inv* マウスを用いて、経時的に細胞増殖、細胞周期、嚢胞進展の大きさと腎重量の関係を定量的に解析することにより、その役割の解明を目指した。

3. 研究の方法

invDC マウスを嚢胞腎のモデルとして用いた。マウスは京都府立医科大学実験動物施設に

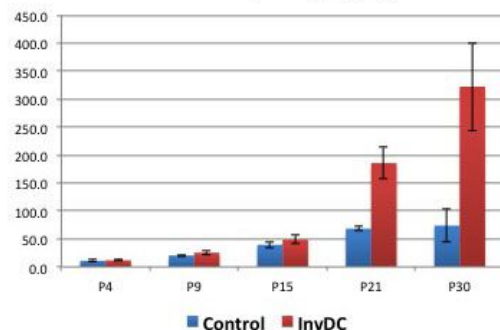
て飼育した。*invDC* ホモマウス同士を繁殖維持し、*Inv/inv*, *invDC/invDC* を *invDC* 群として用い、対照群には *inv/+*, *invDC/invDC* 及び *+/+*, *invDC/invDC* を用いた。生後経時的に腎重量、及び DNA 量を測定した。DNA 量の測定には DNAzol (life technologies. Inc.) を用いた。

細胞増殖及び細胞周期測定に、BrdU 及び EdU を腹腔内に注入後、経時的に灌流固定後腎臓を凍結包埋し、その取り込みを観察した。

4. 研究成果

腎重量の変化は、対照群では、P4 (n=3) $10.9 \pm 1.6\text{mg}$, P9 (n=3) $20.4 \pm 2.1\text{mg}$, P15 (n=5) $39.6 \pm 5.7\text{mg}$, P21 (n=3) $68.4 \pm 4.1\text{mg}$, P30 (n=4) $73.8 \pm 29.1\text{mg}$ であった。*invDC* 群では、P4 (n=3) $11.8 \pm 1.3\text{mg}$, P9 (n=5) $25.3 \pm 3.6\text{mg}$, P15 (n=5) $48.7 \pm 8.0\text{mg}$, P21 (n=4) $185.6 \pm 29.0\text{mg}$, P30 (n=4) $322.4 \pm 78.7\text{mg}$ であった。既報の通り図 1 に示すように、*invDC* マウスでは P15 より急激に重量の増加が見られた。

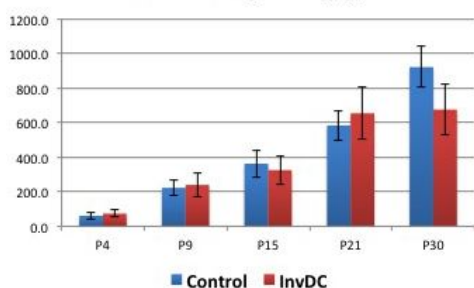
図 1 Kidney weight (mg)



次に、腎臓の全 DNA 量を掲示的に測定した。図 2 で示すように、対照群では、P4 (n=3) $60.6 \pm 19.1\mu\text{g}$, P9 (n=5) $222.2 \pm 43.6\mu\text{g}$, P15 (n=5) $362.0 \pm 79.9\mu\text{g}$, P21 (n=4) $582.9 \pm 85.4\mu\text{g}$, P30 (n=8) $920.5 \pm 119.0\mu\text{g}$ であった。*invDC* 群では、P4 (n=3) $73.2 \pm 19.1\mu\text{g}$, P9 (n=5) $238.7 \pm 67.7\mu\text{g}$, P15 (n=5) $324.6 \pm 83.1\mu\text{g}$, P21 (n=3) $582.9 \pm 85.3\mu\text{g}$, P30 (n=7) $674.8 \pm 154.7\mu\text{g}$ であった。

腎臓の重量と全 DNA 量を、対照群と *invDC* 群においては比較すると、対照群では、P15 あるいは P21 の間で顕著に重量が増大しているものの、DNA 量の増加はほとんどないことがわかった。

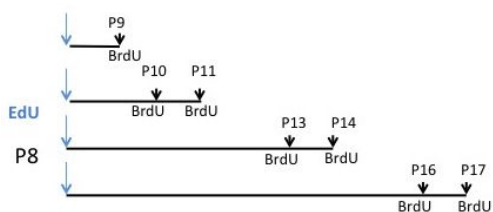
図2 Kidney DNA (μg)



以上のことから、腎重量の増加は嚢胞内に貯留する液体によるものと考えられた。また、DNA 量の増加から分裂回数(n)を計算すると以下ようになる(細胞死が存在しないと仮定する)。aもしくはb時点(b>a)でのDNA量をp(a)もしくはp(b)とすると $P(b)=2^n \times P(a)$ となる。これから、分裂回数を求めると、対照群：2.58回(P4-P9), 0.68(P15-P9), 0.7回(P21-P15), 0.7回(P30-P21)となる。これに対して、invDC群では、1.7回(P4-P9), 0.44回(P15-P9), 1.01回(P21-P15), 0.05回(P30-P21)である。P4-P9及びP15-P9の期間においては、invDC群の細胞分裂回数は対照群の分裂回数よりも少なく、P21-P15の期間においてinvDC群の細胞分裂回数は対照群の分裂回数よりも増加していた。

我々の以前の結果、及び、他の報告において、嚢胞におけるBrdUの取り込みの増加が知られている。今回の結果は、従来の嚢胞腎において細胞増殖が亢進しているとの結果と矛盾している。

そこで、細胞周期時間の測定を以下のようにを試みた。一度分裂した細胞が再び分裂するまでの時間を計測するため、Day8にEdUを投与さらに、一度分裂した細胞が再び分裂するまでの時間を計測するため、Day8にEdUを投与し、その後下記のようにBrdUを投与した後にDay9, Day11, Day14, Day17でサンプリングをして、EdU, BrdUのdouble labeling細胞を調べた(下图)。



結果は、下表に示すが、再分裂までの時間は、3日から9日までバラバラであった。対照群とinvDC群の間に顕著な差は認められなかった。したがって、本研究のこれまでの結果からは、細胞周期時間に大きな違いはないと考えられる。

Sampling (Interval between EdU and BrdU uptake)	Control				InvDC			
	Number of EdU cells	Number of BrdU cells	Number of EdU+BrdU cells	EdU+BrdU/EdU %	Number of EdU cells	Number of BrdU cells	Number of EdU+BrdU cells	EdU+BrdU/EdU %
P9 (1 day)	250	105	0	0	72	33	0	0
P11 (3 days)	51	27	6	11.8	107	43	10	9.3
P14 (6 days)	124	106	11	8.9	100	111	10	10.0
P17 (9 days)	71	17	1	1.4	86	60	1	1.2

我々の以前の結果、及び、他の報告において、嚢胞におけるBrdUの取り込みの増加が知られている。そこで、BrdUの取り込みを発生時期を変えて調べた。下表に結果を示す。対照群のBrdU取り込みのデータは、DNA量の増加と大きくは矛盾しなかった。これらの結果は、我々のデータを含め既報のデータと一致する。

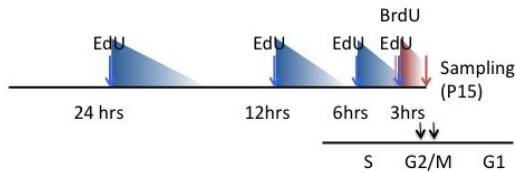
表1	Postnatal cays	%BrdU positive cells/total cells	No. of BrdU positive cells/No. of total cells
Control	P4	0.0%	0/951
	P9	3.5%	105/2985
	P15	3.4%	41/1221
	P30	0.7%	5/698
Inv DC	P4	1.8%	36/1936
	P9	8.4%	33/394
	P15	5.0%	42/837
	P30	3.9%	53/977

しかしながら、BrdUの取り込みを対照群とinvDC群で比較した時に、invDC群ではP9, P15で約2倍の取り込みがある。もし、BrdUの取り込みが細胞周期時間を反映しているとしたならば、invDC群の細胞周期時間は対照群の1/2となる。また、DNA量の増加もそれに比例すべきである。

そこで、S期の長さが対照群とinvDC群の間に差がある可能性を探るために、S期の長さに違いがあるかについて検討を試みた。

P15にサンプリングを行う前に、EdUを24, 12, 6時間前に投与し、BrdUを3時間前に投与した。(図参照)

我々の結果では、12時間前に Edu を投与した群においては、BrdU の double positive 細胞は観察されず、S 期の長さは 12 時間いないと考えられた。



現在、invDC 群でも検討中である。

In vivo における S 期の長さの測定は、様々な条件（薬剤の代謝時間など）を考慮しなくてはならない。今後の課題である。

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 2 件）

Tsuji T, Matsuo K, Nakahari T, Marunaka Y, Yokoyama T. Structural basis of the Inv compartment and ciliary abnormalities in Inv/nphp2 mutant mice.

査読あり Cytoskeleton (Hoboken). Jan;73(1),2016 45-56.

Yokoyama T. Ciliary subcompartments and cyto-proteins. 査読あり Anat Sci Int. 92(2), 2017, 207-214.

〔学会発表〕（計 2 件）

尿細管形成と嚢胞発生機構,2016 11.24-25, 「上皮膜輸送調節蛋白の異常と病態生理学の融合」

Inv compartment nephroncystins, 2017 2-23, The kitasato-yale symposium 2017; Control oc cellular and epithelial function.

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

横山尚彦 (YOKOYAMA Takahiko)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70191525