

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461245

研究課題名(和文) NPHP嚢胞腎発生における細胞極性と細胞骨格の関与～ヒト嚢胞腎の上皮細胞株樹立

研究課題名(英文) Effects of planar cell polarity and cytoskeleton in NPHP cystic kidney development

研究代表者

杉山 紀之 (SUGIYAMA, Noriyuki)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：90381954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：嚢胞腎における尿細管拡張を引き起こす候補因子として平面極性因子や細胞骨格調節因子などの細胞内局在の解析を行った結果、注目した因子の局在に変動は認められず、尿細管拡張への平面極性および細胞骨格の関与はなかったことが推察された。  
また、嚢胞腎の尿細管上皮細胞株の樹立法の開発を行った結果、拡張前の尿細管上皮細胞からの細胞株樹立に成功した。  
さらにInvの機能解析のために点変異マウスの作製を行った。

研究成果の概要(英文)：Analysis of intracellular localization of planar cell polarity factor and cytoskeletal regulator as a candidate factor causing renal tubular expansion in cystic kidneys resulted in no change in localization of the factor. It was inferred that there was no involvement of plane cell polarity and cytoskeleton in renal tubular expansion.  
In addition, as a result of development of a method for establishing a renal tubular epithelial cell line from cystic kidney, we succeeded in establishing a cell line from renal tubular epithelial cells before renal tubular expansion in inv\_deltaC kidneys.  
In addition, point mutant mice were prepared for functional analysis of Inv.

研究分野：腎臓内科

キーワード：嚢胞腎 ネフロン癆

## 1. 研究開始当初の背景

嚢胞性腎疾患は尿細管が拡張する遺伝子性疾患であり、常染色体優性多発性嚢胞腎 (ADPKD) NPHP に代表される。近年、これらの遺伝子性疾患の責任遺伝子産物のほとんどが一次繊毛に局在する事から、一次繊毛の異常が嚢胞腎発症に関与している事が明らかになってきた。

我々は若年型 NPHP type2 のモデルマウスであり、内臓逆位と嚢胞腎を合併する inv マウスの解析を行ってきた。我々は inv 嚢胞腎の尿細管上皮細胞は異常増殖して尿細管を拡張していること (Gene to cells, 2006) また上皮-間充転換を伴った fibrosis も観察され、頂底極性が乱れていることを報告した (Nephrol Dial Transplant, 2011) また、尿細管上皮細胞の分裂方向が乱れていることを報告した (Kidney Int, 2011) 以上の事から、inv 嚢胞腎では尿細管上皮細胞の細胞極性の乱れが生じ、異常な細胞増殖や尿細管の拡張を引き起こされたと推察した。また、近年多くの報告から一次繊毛は細胞外刺激 (尿の流れ、尿中液性因子など) を感受して細胞内に伝達するアンテナとして機能していると考えられていた。我々が注目している Inv は繊毛基部に存在する事からも、一次繊毛が受容した原尿中からの刺激を細胞体へ伝達するシグナル経路に Inv が機能し、そのシグナルが細胞極性を維持していると予想していた。

そこで、その繊毛シグナルの探索を行った結果、ERK シグナルの上皮細胞の異常増殖への関与、p38 MAPK の線維化への関与を明らかにしたが、これらは繊毛シグナル破綻後の二次シグナルであり、Inv の機能と直接の関係はなかった。また、細胞極性の関与が知られている Wnt PCP シグナルは変化していなかった。当時、Inv がアクチン骨格の構築に関与すると報告され (Werner ME et al., Am J Physiol Cell Physiol. 2013; Veland IR et al., PLoS One. 2013) Inv が新規の細胞極性シグナルを伝え細胞骨格の構築および細胞分裂方向の決定を行っていることが予想された。

## 2. 研究の目的

inv 嚢胞腎を用いて尿細管拡張時の尿細管上皮細胞の PCP 因子の細胞内局在および細胞骨格の構造を明らかにすることにより、細胞極性および細胞骨格への Inv の機能解析を目的とした。

また、他の嚢胞腎においても同様な検討を行って比較することにより、細胞極性および細胞骨格と嚢胞進展の関係を明らかにすることを目的とした。

これらを通じて、繊毛が細胞骨格の構築に関与していることを明らかにし、嚢胞発生機構および繊毛機能の解明を最終目的とした。

さらに、Inv の機能解析を行うために、Inv の機能領域の検討を行うことを新たに加えた目的とした。

## 3. 研究の方法

inv 嚢胞腎の尿細管上皮細胞において、以下の因子の局在を免疫組織化学染色にて可視化して、正常腎の尿細管上皮細胞と比較した。その際、尿細管が拡張する前の近位尿細管上皮細胞に注目した。

### (1) PCP core 因子

Frizzled2, 4, & 6  
Vangl2  
Prickle2  
Celsr1  
Dvl2 & 3

### (2) 他の PCP 因子

Fritz  
Scrib  
Dlg1

### (3) 細胞分裂関連因子 NuMA

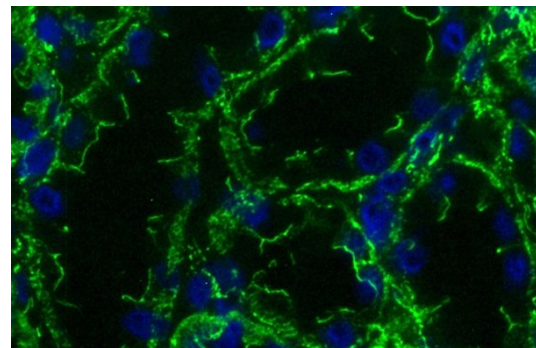
### (4) 細胞骨格関連因子 ERM

また、他の嚢胞腎との比較のために嚢胞腎尿細管上皮細胞の初代培養系の検討を行った。

さらに、inv の機能解析を促進させるために inv の他の因子との結合領域に点変異を入れた遺伝子改変マウスを作製した。

## 4. 研究成果

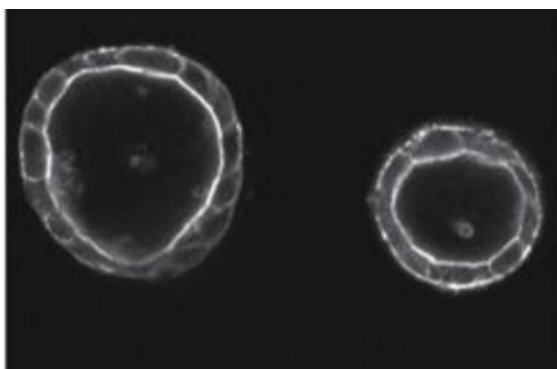
計 13 因子の免疫組織化学染色による検討を行ったが、嚢胞腎と正常腎とで局在に差異が認められるものはなかった (下図: 嚢胞腎での Drizzled2 の発現)。



ただし、尿細管が拡張する前の嚢胞腎尿細管上皮細胞が対象であり、拡張して上皮細胞

が扁平化した段階では多くの因子の局在の変化が観察された。しかしながら、これらは形態変化から起きた二次的現象であると考えられ、我々が求めている嚢胞化へのシグナルとは関与しないと推察された。

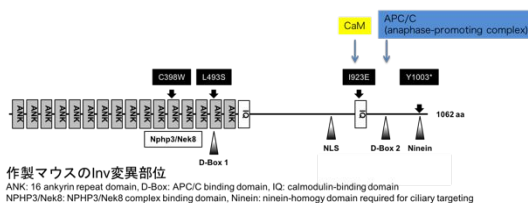
ADPKD 患者からの尿細管上皮細胞の初代培養系の検討のために、嚢胞腎マウス (inv C マウス: inv マウスに Inv の N 末端領域の遺伝子を導入したトランスジェニックマウス、嚢胞腎の発症が 4 週齢以降に遅くなる) の成体個体からの初代培養系を検討した。以前、inv マウスの 3 日齢の腎臓からの初代培養を行い、細胞株樹立を行った。今回も同様な方法で行ったところ、上皮細胞の生存率が著しく低かった。また、残存した上皮細胞の細胞形態が上皮細胞形態から一著しく逸脱しており、新たな初代培養法の開発が必要で合った。そこで接着性を高める検討として、マトリゲルの検討を行った。また、嚢胞化後の尿細管上皮細胞は生体内でも扁平な形態に変化しており、adherens junction も十分に形成されていないなど上皮細胞としての維持は非常に難しかった。そこで、嚢胞化が起こり始める 3 週齢の inv C マウスの腎臓を試料とすることに変更した。これらの検討により、上皮構造 (立方上皮であること、繊毛が生えていること、微絨毛が残っていること、水チャンネルなどが発現していること等) がある程度保たれた近位尿細管上皮細胞株 2 系統の樹立に成功した。樹立された細胞株を用いてマトリゲルによる三次元培養を行なった結果、嚢胞が形成されることを確認した (下図)。



しかしながら、本来の目的であった ADPKD 患者の嚢胞腎からの尿細管上皮細胞株の樹立はできていない。先にも記載した通り、尿細管拡張後のマウス嚢胞腎の尿細管上皮細胞の培養法が確立できておらず、今後の課題となっている。

このように研究計画当初とは大きく結果が異なってきたが、嚢胞化の分子機構解明のために、再度 inv の機能解析を行った。既に Inv はいくつかの結合因子 (APC/C, CaM, Ninein, Nphp3/Nek8, Dvl) が報告されている。しかしながら、それらの因子の中で機能解析まで行われているのは NPHP3 のみであり、

他の因子については明らかになっていない。さらに、これらが嚢胞化とどのように関わっているのか全く明らかではない。そこで、再度 Inv に立ち戻り、その機能解析を行うこととした。それぞれの結合部位に点変異を導入したマウスを CRISPR/Cas9 法により行っている (下図)。



現在のところ、Y1003\* 変異マウスの heterozygous の第 2 世代まで交配が進んでおり、あと数ヶ月以内にホモ個体の産出が可能な段階までたどり着いている。

I923E 変異マウスも第 1 世代が産出され、現在交配時期まで成長させている段階である。

これらのマウスの表現系を解析することにより、新たな Inv の機能を詳細に明らかにすることができ、さらには嚢胞化の分子機構の一端が明らかになることが期待される。

## 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 1 件)

Murata S, Sugiyama N, Maemura K, Otsuki Y, Quantified kidney echogenicity in mice with renal ischemia reperfusion injury: evaluation as a noninvasive biomarker of acute kidney injury., Med Mol Morphol, 査読有, 50, 2017, 161-169, DOI 10.1007/s00795-017-0157-8

[学会発表] (計 7 件)

杉山 紀之, 近藤 洋一、急性腎障害から慢性腎臓病への移行に関わる IL-24 の機能解析、第 61 回日本腎臓学会学術総会、2018 年

杉山 紀之, 村田 真野, 近藤 洋一、急性腎障害早期診断における超音波検査による腎輝度の有用性、第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017 年

杉山 紀之, 村田 真野, 足立 孝臣, 大槻 勝紀、虚血性急性腎障害における MDA-7/IL-24 の機能解析、第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016 年

村田 真野, 杉山 紀之, 前村 憲太朗、  
大槻 勝紀、急性腎障害における早期診  
断因子としての超音波検査による腎輝  
度の有用性の検討、第 91 回日本解剖学  
会近畿支部学術集会、2015 年

村田 真野, 杉山 紀之, 大槻 勝紀、  
急性腎障害における超音波検査におけ  
る腎輝度を用いた診断・予後予測能の検  
討、第 56 回日本組織細胞化学会、2015  
年

杉山 紀之、芝 大、大槻 勝紀、一次  
繊毛異常が引き起こす嚢胞腎の発生機  
序の解析、第 46 回日本臨床分子形態学  
会、2014 年

杉山 紀之、村田 真野、足立 孝臣、  
大槻 勝紀、虚血再灌流における急性腎  
障害の新規バイオマーカーの探索、第  
120 回日本解剖学会総会・全国学術集会  
第 92 回日本生理学会大会合同大会、  
2015 年

〔図書〕(計 0 件)

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉山 紀之 (SUGIYAMA, Noriyuki)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：90381954

### (2) 研究分担者

津田 雅之 (TSUDA, Masayuki)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部  
門・准教授

研究者番号：90406182