

左右決定遺伝子 inv ノックアウトマウスの作製と

疾患モデル動物の開発

研究課題番号 15590862

平成 15 年～平成 17 年度科学研究費補助金（基盤研究 C）

研究成果報告書



平成 18 年 3 月

研究代表者 土谷 健

東京女子医科大学医学部 講師



はしがき

本研究は、挿入変異 (insertional mutagenesis) により発生した内臓逆位、嚢胞形成腎を有するトランスジェニックマウスから体軸の左右決定遺伝子 *inv* のクローニングしたことを端緒とする(Nature 395:177, 1998)。本遺伝子の異常は内臓逆位とともに、嚢胞形成腎を合併するが、他に膀胱嚢胞、胆管形成不全などの表現型を呈することから、体軸回転に加えて、上皮細胞の機能制御にも関わる可能性がある。最近、ネフロンの上皮細胞には一次線毛が存在し、この形成や機能の異常が嚢胞性腎疾患の原因の一部をなすことが注目され、線毛依存性腎疾患というカテゴリーが成立しつつあり、さらにそれは体軸や他臓器の異常をきたす可能性も指摘されている。

以上の背景を踏まえて、本研究の全体構想は、

- 1) *Inv* ノックアウトマウスの作製
- 2) *inv* の機能解明および線毛依存性腎疾患における病態生理的意義の検討
- 3) 臨床上の接点を明らかにするため疾患モデル動物の開発を中心課題とした。

平成 18 年 3 月

研究組織

研究代表者：土谷 健（東京女子医科大学医学部講師）

研究分担者：西村佐代子（東京女子医科大学医学部助手）(退職のため 15 年度まで)

研究分担者：土谷まり子（東京女子医科大学医学部講師）

研究分担者：望月俊雄（北海道大学医学部講師）

研究経費

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 15 年度	1,700	0	1,700
平成 16 年度	1,100	0	1,100
平成 17 年度	600	0	600
総計	3,400	0	3,400

研究発表

(1) 学会誌等

1. Nishimura S, Yoshida T, Sugiura H, Shirota S, Tsuchiya K, and Nihei H: CD2AP expression in a renal ischemia/reperfusion injury model and analysis of its related genes using overexpression and RNA interference technique. **Am J Nephrol** 25:373-381, 2005
2. Imaki J, Tsuchiya K, Mishima T, Onodera H, Kim JI, Yoshida K, Ikeda H, and Sakai H: Developmental contribution of c-maf in the kidney: distribution and developmental study of c-maf mRNA in normal mice kidney and histological study of c-maf knockout mice kidney and liver. **Biochem Biophys Res Commun** 320: 1323-1327, 2004
3. 代田さつき、芳田 工、杉浦秀和、土谷 健、二瓶 宏 左右軸決定遺伝子 inv(inversion of embryonic turning)の機能解析 日腎会誌 46:676-684, 2004

(2) 口頭発表

1. Shirota S, Yoshida T, Sugiura H, Shiohira S, Tsuchiya K, Nitta K. Analysis of gene expression profile under silencing inv gene using siRNA expression vector in vitro and in vivo. **Annual meeting of American Society of Nephrology** Oct, 2005 (Philadelphia)
2. 代田さつき、芳田 工、杉浦秀和、土谷 健、秋葉 隆、二瓶 宏. SiRNA 発現プラスミドを用いた左右決定遺伝子 inv の持続的抑制による機能解析 日本腎臓学会学術総会 横浜 6/23-6/25 2005
3. Shirota S, Yoshida T, Sugiura H, Nishimura S, Tsuchiya K, Nihei H. Functional analysis of inversion of embryonic turning (inv) gene using novel RNAi technique. **Annual meeting of American Society of Nephrology** Nov, 2004 (San Diego)
4. 代田さつき、芳田 工、杉浦秀和、西村佐代子、土谷 健、二瓶 宏. RNAi を用いた左右決定遺伝子 inv の機能解析 日本腎臓学会学術総会 宇都宮 5/27-5/29 2004
5. 代田さつき、土谷 健、望月俊雄、芳田 工、西村佐代子、小池隆夫、二瓶 宏. DNAアレイを用いたIMCD細胞での内臓逆位遺伝子(inv)関連タンパク解析 日本腎臓学会学術総会 東京 5/22-5/24 2003

研究目的、実施計画

研究者らは挿入変異 (*insertional mutagenesis*) により新たに発生した内臓逆位、嚢胞形成腎を有するトランスジェニックマウスの分子生物学的検討を行い、体軸の左右決定遺伝子 *inv* のクローニングに成功して成果を発表した (*Nature* 395:177, 1998)。内臓逆位とともに、嚢胞形成腎を合併するが、他に腭嚢胞、胆管形成不全などの表現型を呈することから、本遺伝子は体軸回転に加えて、上皮細胞の機能制御にも関わる可能性を推測している。また、最近、ヒトの *inv* 遺伝子の塩基配列を最終的に決定し報告した (*Hum Genet* 110:157, 2002)。以上の背景を踏まえて、本研究では本遺伝子のノックアウトマウスを作製し、産物蛋白の機能解析を行い、その働きを明らかにするとともに、表現型で認められた器官の形態異常に着目し、疾患モデル動物の開発を行う。

具体的には、まずノックアウトマウスを作製する。さらに以下の 1) 機能解析、2) モデル動物の作製、二つの軸を基に研究を進める。

1) 機能解析: *full length* の遺伝子を発現ベクターに組み込み、培養細胞に導入し形態変化を観察。マーカー遺伝子の挿入によるキメラマウスでの形態形成過程での発現の観察、また、ノックアウトマウスでは発現蛋白の解析を二次元等電点電気泳動法、モノクローナル抗体による細胞内局在、腎臓に関しては、発生時期での嚢胞形成の機序を検討するため、器官培養を行い、どのレベルで嚢胞形成が始まるかを検討する。

2) 疾病関連モデル: 疾患モデル動物の開発のため、胎児での表現型を観察する。疾病に関連する形態、機能の解析を行う。

推測される実験結果

基本的には *inv* 遺伝子のノックアウトマウス作製は初めての試みであり、さらに本研究における特色および予測される結果を要約すると、1) *inv* 遺伝子は体幹の左右決定に関して最上流域に存在する遺伝子で、上皮細胞の形態、機能形成に関わる可能性があり、その異常は左右のみならず器官形成に障害をもたらすことが推測される。2) ノックアウトマウスを作製することで、レポーター遺伝子を付随させ、形態形成上本遺伝子の発現経過、推移を観察が可能であり、かつ遺伝子の修飾部位を替えることにより表現型の異なるマウスを作製できる可能性がある。3) *inv* 遺伝子の異常は腎尿細管の嚢胞形成を認めるが、上皮細胞の繊毛運動、輸送機能異常に起因する尿流の停滞による閉塞機転を推定している。4) 胆道閉鎖の表現型が常時発現する遺伝子コンストラクトはヒトでの先天性胆道閉鎖症の原因に関わる可能性があり、病態生理に関する情報をもたらす。

国内外の関連する研究の中での当該研究の位置づけ

体軸の左右、前後を決定する遺伝子の同定および機能解析に関する研究は、現在形態形成の分野で最も活発な領域であり、Nodal や lefty などの遺伝子群が、さらに最近では、最下流に位置づけられる Pitx2 が報告された。また、iv (inversus viscerum)マウスでは、内臓逆位が出現するが、原因としてダイニンの遺伝子変異が報告され、ノード繊毛の回転異常により左右の成立が 50% 程度の確率になる機序が報告された (Hirokawa ら, Cell 95:829-837,1998)。国内的には、Hamada らの体軸形成に関わる業績や先の Hirokawa らの仕事がみられる。こうした中において、inv 遺伝子は最上流の位置に存在するコントロール遺伝子と考えられる。さらに興味深い点は、最近、本蛋白がカテニン、カドヘリンなどの骨格蛋白と結合する可能性 (Mol Biol Cell 13:3096,2002)、さらに嚢胞腎(pkd)蛋白とも cross-talk がある可能性が指摘されていることである。上皮細胞の機能的構築や嚢胞形成などの病態生理の成立に関わる情報が得られる可能性があり、今後は本遺伝子産物の機能解析とヒトでの疾患モデル動物を作製する計画である。

計画の実際

1) ノックアウトマウス作製

ターゲティングベクター

ノックアウトマウスのターゲティングベクター構築の完成と、実際のマウス作製を担う。従来の科研費期間中により作製していた、最も表現型発現が確実と考えられる exon1 から 2 にかけて欠失させた inv 遺伝子によりターゲティングベクターを構築する。

コンストラクト作製の際に EGFP もしくは lacZ 遺伝子を連結させ構築し、発現の段階で発色もしくは X gal による判別が可能として、キメラマウスなど含めて部位や時間的变化を観察できるようにする。相同組み換え体同定のためのサザン解析用のプローブおよび PCR プライマーをこれまでの助成期間で作製してあるため、実際に有効かどうかを判定する。

- 1) マウスは 129 系統マウスを使用。
- 2) cDNA を 50mg/ml 濃度で調整し、培養中の ES 細胞へ電ポレーションする。相同組み換え体の同定-主として PCR によるスクリーニングを行う。
- 3) マイクロマニピュレーション-採卵-ES 細胞の注入
- 4) 仮親への移植-キメラマウスの作製
- 5) 表現型の解析

ES 細胞の培養、管理から遺伝子導入などの実際の工程では、筑波大学生命科学動物資源センター資源開発分野 高橋 智教授の指導を受け実行する。

表現型の相違が生じることを想定して、幾つかのターゲティングベクターを構

築する。胆道閉鎖がコンスタントに発現する構築は疾患モデルの成立と考えられる。基本的に ankyrin repeat 部と 3' 側の *inv* 遺伝子に特異性の高い部分の二カ所を中心とした遺伝子の modulation を行いベクターを作製する。

表現型の解析

腎の組織学的検討および形成メカニズムへの *inv* の関わりを検討する。多発性嚢胞腎での組織学的検討と発現蛋白の相互作用などの実験経験がある。

胎児の発現型の検討。マクロ的観察を実体顕微鏡下で行い、腎での嚢胞形成を確認する。

ノックアウトホモ接合体からの胎児から腎を摘出し、organ culture を行う。腎の形態形成の過程で尿細管形成が障害されている可能性を推測している。実際には胎生 15.5 日で後腎を採取し、transmembrane filter 上において DM-EM+FCS 中で培養し、観察する。

キメラマウスではレポーター遺伝子が挿入されているため、経時的に遺伝子発現の局在、経過が観察可能であるため、ホモ接合の完成前に研究自体の推進が可能である。

2) *inv* の機能解析

細胞内局在を同定するため Green fluorescence protein (GFP) を接続した遺伝子の細胞内導入を行う。*inv* 遺伝子のサイズは大きくないため、発現ベクターを mammalian cell に遺伝子導入を行う。細胞形態の変化、膜蛋白、主として Na/K ATPase などの酵素活性、また、pkd 蛋白(ポリシスチン)などとの共発現などを観察する。蛋白発現の検討は、一部分担者土谷(ま)との共作業になる。

本研究は *inv* 蛋白の機能解析が重要な根幹であり、細胞内で相互作用を持つ蛋白の検討も並行して行う。特にカドヘリンなどの骨格蛋白、カテニンなどのシグナルに関わる蛋白を east one hybridization や蛋白電気泳動などの手法を用いて検討する。

3) 関連遺伝子の検討

Microarray 法による関連遺伝子 profile を検索する。先に述べたノックアウトマウスからの組織、もしくは RNAi などにより遺伝子発現を修飾した培養細胞などから抽出した mRNA を用いる。現在、線毛関連遺伝子の細胞内シグナルとしては、Wnt- β catenin 系が注目されているが、さらに Ca 関連の遺伝子群にも着目する。先述したように *inv* の一つの特徴として骨格構造をもつことから、細胞外マトリックス、細胞内蛋白など関与も推定される。また、多発性嚢胞腎との関連について検討する。両者ともに嚢胞を起因する蛋白ながら、相互の作用についての報告は少ない。2つの蛋白とも尿細管上皮の線毛に存在することはすでに明らかにされている。

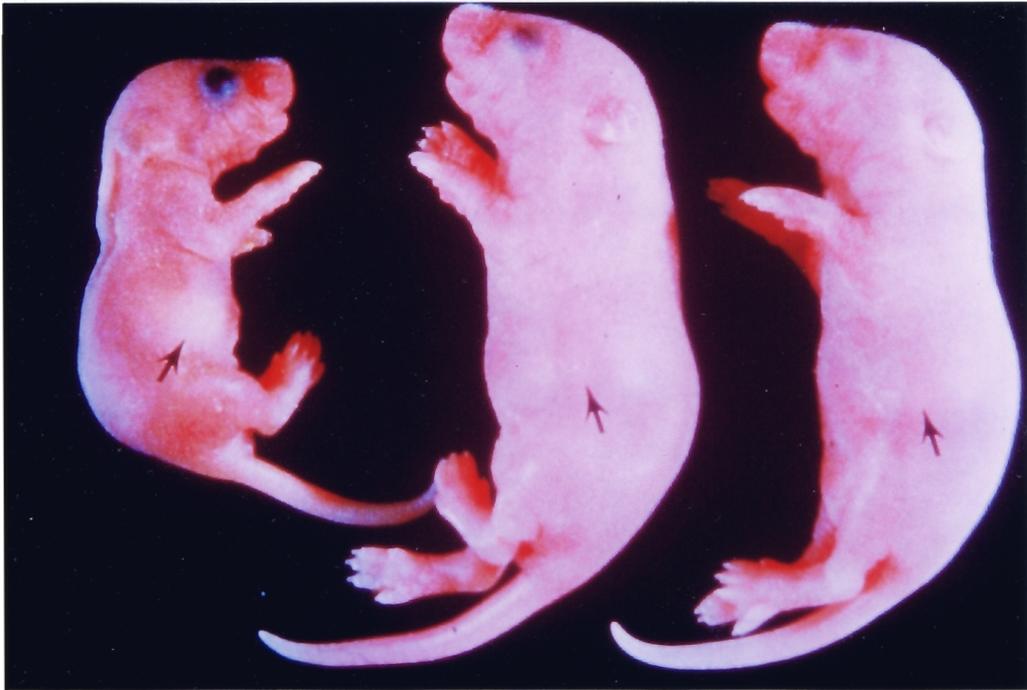
研究成果

1) inv 概論

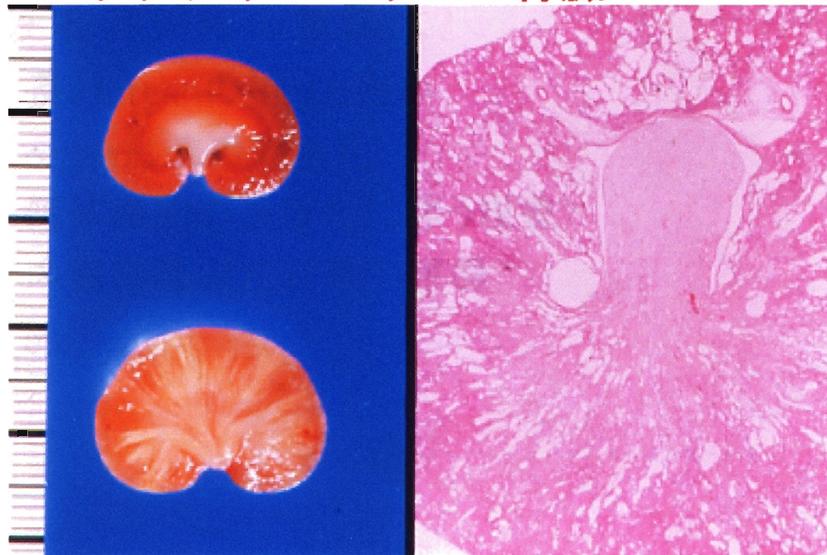
研究成果

1) inv 概論

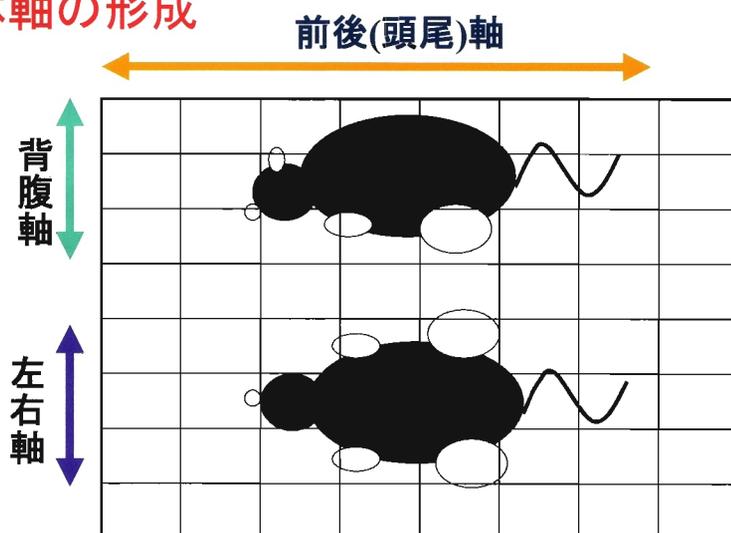
Invマウス



Invノックアウトマウスの腎臓

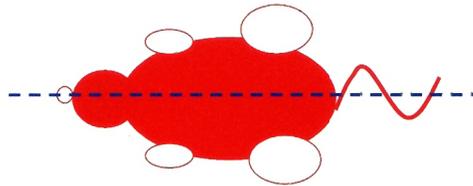


体軸の形成



左右非対称の意義は?

- 長いorganの折りたたみ
- organ形成の効率化
- 個体機能の高度化に伴う現象?
- 中枢神経の左右差の意義?
- etc....



左右軸 左右非対称の形成

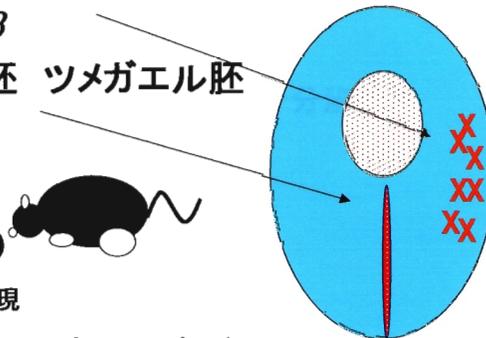
- 正中線に存在した臓器が片方に局在する
(心臓, 胃 etc)
- 両側に存在した臓器の片方が消失する
(大血管系 etc)
- 発生初期から片方のみが存在する
(脾臓)
- 左右に存在するが大きさ、形状が異なる
(肺 etc)

正位から完全逆位

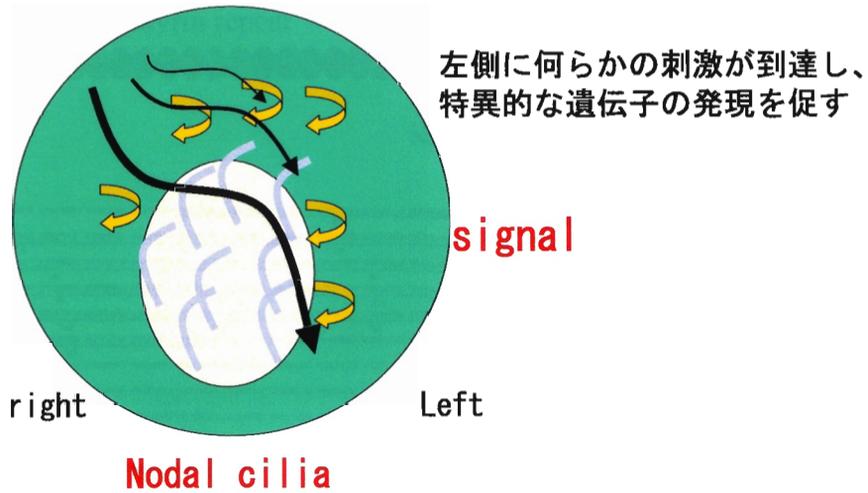
- Situs solitus 正位
- Situs ambiguous
- Visceral heterotaxy, Isomerism
- asplenia/polysplenia
- Situs inversus totalis

左右非対称の研究の背景と進歩

- 胚発生個体で左右非対称な発現を示す遺伝子
- *lefty*, *nodal*, *HNF- β*
- Gap junction ニワトリ胚 ツメガエル胚
- マウスミュータント
- **iv (inversus viscerum)**
 - 50%逆位出現
- **inv (inversion of embryonic turning)**
 - 100%逆位出現



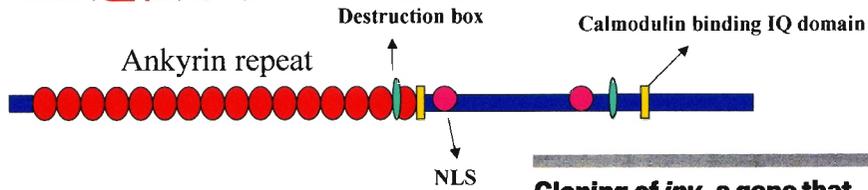
nodeにおける軸流の決定



invのphenotype

- 心臓：心臓逆位，心血管奇形，心内膜欠損症
ファロー四徴症
- 肺：左右逆位，分葉異常
- 肝臓，胆道：分葉異常，胆道閉鎖，胆汁分泌異常
- 胃：逆位
- 脾臓：逆位
- 膀胱：形成不全，嚢胞形成
- 腎臓：嚢胞形成，嚢胞糸球体
- 腸管：回転異常
- 大血管：形成不全，走行異常

Inv 遺伝子クローニング



1 NTISEPVLST CSQLASQYFA AYTKQMGAL QKLTQKMSAL ENKESQSGIT PLRYCYLAEV YGCAALIEA GADVQVETRS REYALIEAD EGYTFYKELL
 31 62
 101 LTRAVYKPE QLEDTYHLL STRIKSPKEL ALLKAYKAPG EYQYQKQKQ TALVRSAYTS APERAKLLIK HSEKIGIPQV KSKLPLVNAI NEDPSAYVT
 121 152
 204 VVCLDAAPY ESKLWQWYE GRTYRQYFA QKLVYVYPL TSTESCHTS YRMLPFTPLA YALLGQWQI YVLLERKES QYFSPSSGGA TPLVYVAGN
 224 255
 301 FAYTYVYVLO RPYQKSKTL KSTYRQYFA GEQVQVLYLT NLSLSEQYH VMSRQYQTA LKHALGQYH STYLLLEDD JQVQATQYAL WYFRACRY
 321 352
 401 QWRQYVOTLI KQKARYVQVQ QDQSLQYFA ALGQKAPVCO LLELSKIAQV YQVYAGYPL QGAAQYQYH QVAVLIEQA QPQVQKQER TALVYSCQV
 421 452
 501 TLDAIYELLO FAFYFQYFA NESTYPLDT ALLEGREYI QKQKQKLLS IAAQYDIAF RYQVYVQTE YQVAFQYH LKMLGQELAE DAQAQKQEL
 521 552
 601 YKQKQKQK QALYDTPYS HESSAPVYF QYPSQWES EGATYFSQV FASITVQSPD PERSVLPQK PQRASQDSS DLQCTASAK PSEYFIERG
 621 652
 701 QPSAQYRYS FEGSSQSSQ QYSEYKRRS ETKQKQKQK QYSSARQVY QYSGQYFAK QYSSQYFAS ASQDQYFEP NQVQVNAAN QKASQKQYH
 721 752
 801 QLRQKQSHG ESKQYKQKQ VACQKQSSUL NTPYQVQTO DMLGQYSSG LFCSTKQRS GENQVYKIC ASYQVYVAG PYPQDQYH LKLVQKQLL
 821 852
 901 IQKRSKQKQ FQKALQYFA IQKQKQYVQ KQKLSKQYH LQKQKQYVQ CTQVYVLLI QVYKQKQK QYPSYVQYK QYSSQKQSSA TQYVQKQYH
 921 952
 1001 QYVQKQKQK QRPYKQSSKA PAVLQSSYK SLSQKQKQK QKQKQYVQ QYSSQKQYH KQ

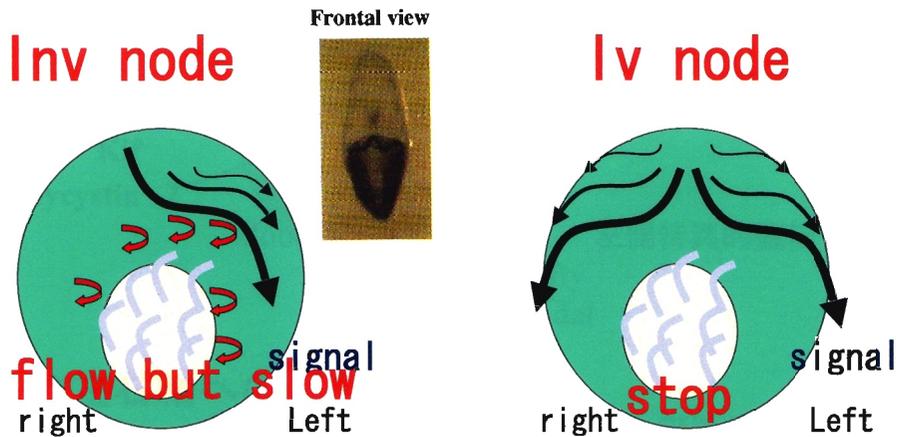
Cloning of *inv*, a gene that controls left/right asymmetry and kidney development

Toshio Mochizuki¹, Yukio Saijoh^{†,‡}, Ken Tsuchiya¹,
 Yasuaki Shirayoshi¹, Setsuo Takai¹, Choji Taya¹,
 Hiromichi Yonekawa¹, Kiyomi Yamada¹, Hiroshi Nihei¹,
 Norio Nakatsuji[§], Paul A. Overbeek[¶], Hiroshi Hamada[†]
 & Takahiko Yokoyama[‡]

¹ Department of Medicine, Kidney Center, and ² Department of Anatomy and Developmental Biology, Tokyo Women's Medical University, School of Medicine, 8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8600 Japan
[†] Institute for Molecular and Cellular Biology, Osaka University, 1-3 Yamada-oka, Suita, Osaka 565, Japan
[‡] Crest, Japan Science and Technology Corporation, Tokyo 170-0013, Japan
[§] Mammalian Development Laboratory, National Institute of Genetics, 1111 Yata, Mishima-shi 411, Japan
[¶] Department of Genetics, Research Institute, International Medical Center of Japan, 1-21-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162, Japan
[¶] Department of Laboratory Animal Science, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 3-18-22 Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

nodeにおける軸流の決定

(Nonaka S et al Cell 1998)



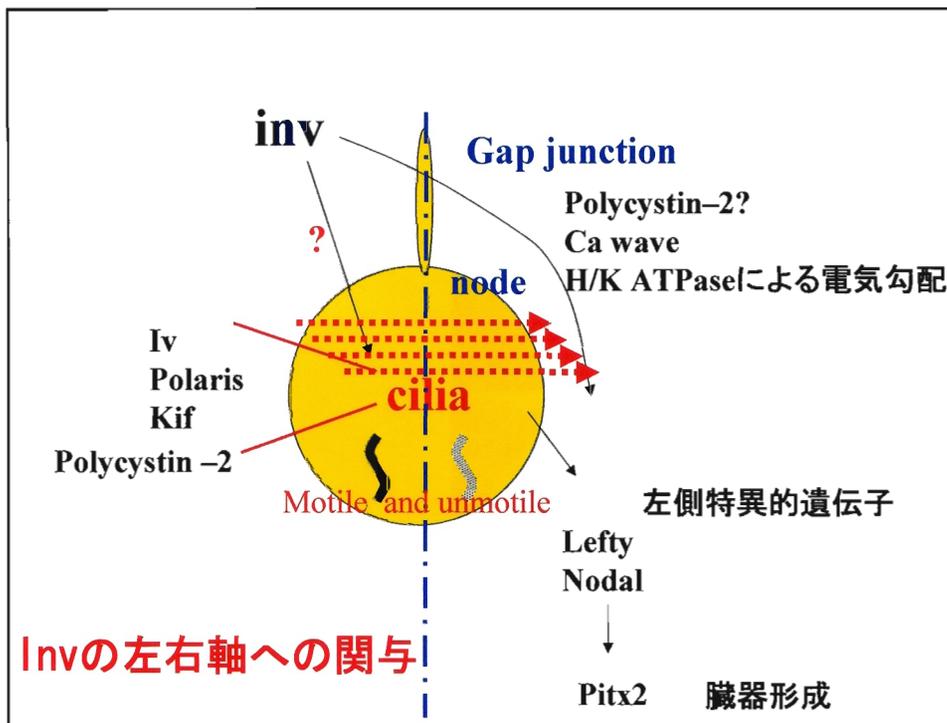
囊胞腎起因蛋白と繊毛の関わり

- **orpk mouse** *Tg737* gene polaris(繊毛内輸送蛋白)
- **cpk mouse** *cpk* gene Cystin
- **C.elegance (線虫)** *pkd1, pkd2* homologue *lov-1, pkd-2*
- sensory neuron, ciliary functionの異常をきたす



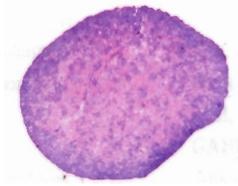
Polycystin2が腎尿細管の繊毛での存在が報告

Pazour GJ, et al Curr Biol 2002

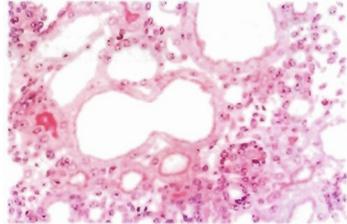


Inv マウスの腎臓所見

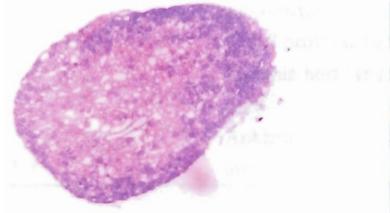
(A)



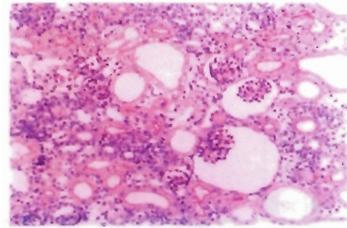
(C)



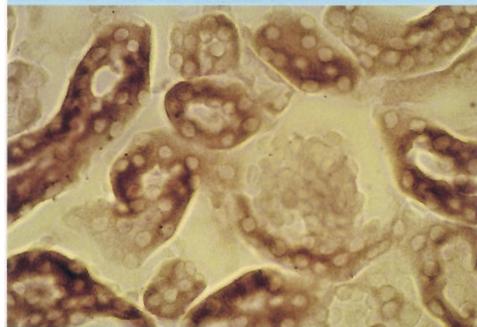
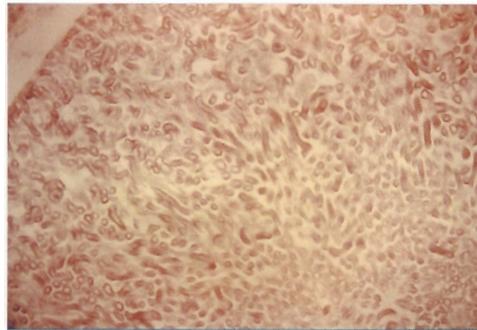
(B)



(D)



Invの腎臓局在



In situ hybridization

Ankyrin repeat構造

機能	遺伝子	繰り返し数
cell differentiation	Notch, Xotch, TAN1, GLP1, LIN12, FEM1	6
cell cycle control	CDC10, SWI6, SWI4	2
transcription factor	NF-kB precursor p105	6
	I-kB, REL-associated pp440	5
	GABP-b	4
structual proteins	Ankyrin	22
other	phIB	3
	Glutaminase	1
	a-latrotoxin	19
	BCL-3 proto-oncogene	7
	Vaccinia host range factor	1
	p120	18
	Ankhzn	17
	inv	15or 16
?????		

2) ノックアウトマウス ターゲッティングベクター

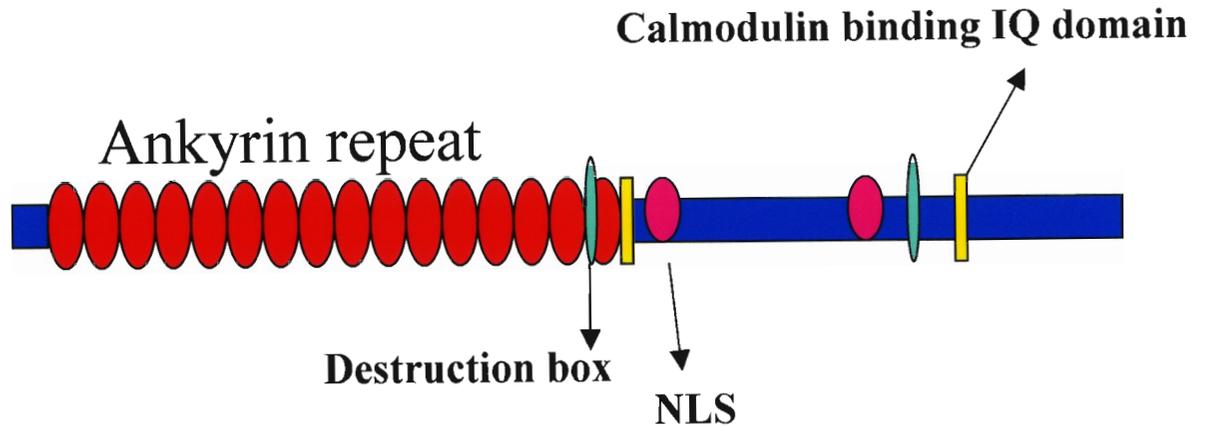
ターゲッティングベクター

ノックアウトマウスのターゲッティングベクター構築の完成と、実際のマウス作製を担う。従来の科研費期間中により作製していた、最も表現型発現が確実と考えられる exon1 から 2 にかけて欠失させた inv 遺伝子によりターゲッティングベクターを構築する。

コンストラクト作製の際に EGFP もしくは lacZ 遺伝子を連結させ構築し、発現の段階で発色もしくは X gal による判別が可能として、キメラマウスなど含めて部位や時間的变化を観察できるようにする。相同組み換え体同定のためのサザン解析用のプローブおよび PCR プライマーをこれまでの助成期間で作製してあるため、実際に有効かどうかを判定する。

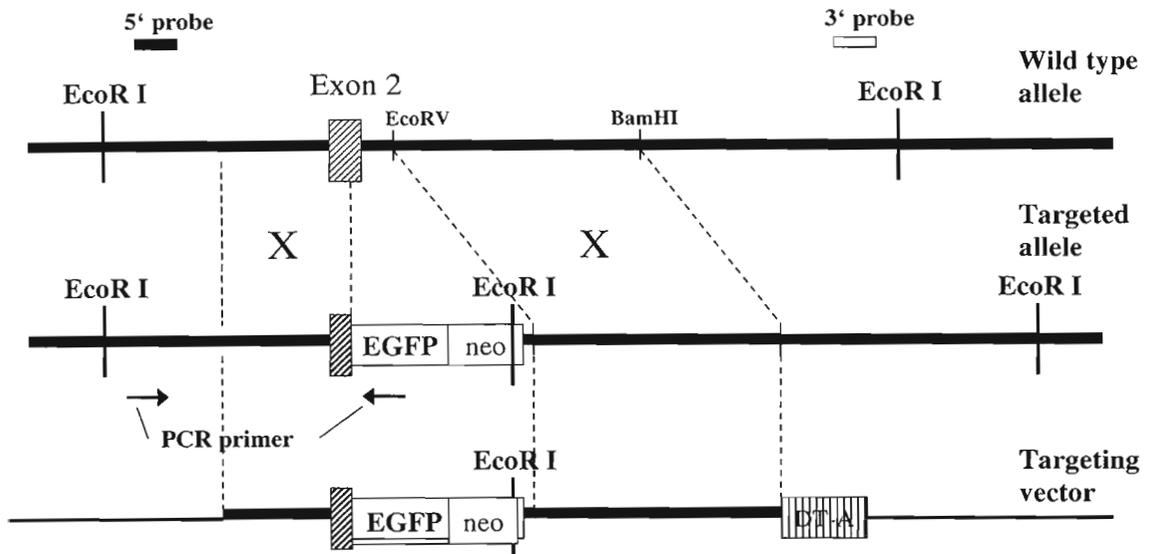
- 1) マウスは 129 系統マウスを使用。
- 2) cDNA を 50mg/ml 濃度で調整し、培養中の ES 細胞へエレクトロポレーションする。相同組み換え体の同定-主として PCR によるスクリーニングを行う。
- 3) マイクロマニピュレーション-採卵-ES 細胞の注入

Inv遺伝子とTargetting vector

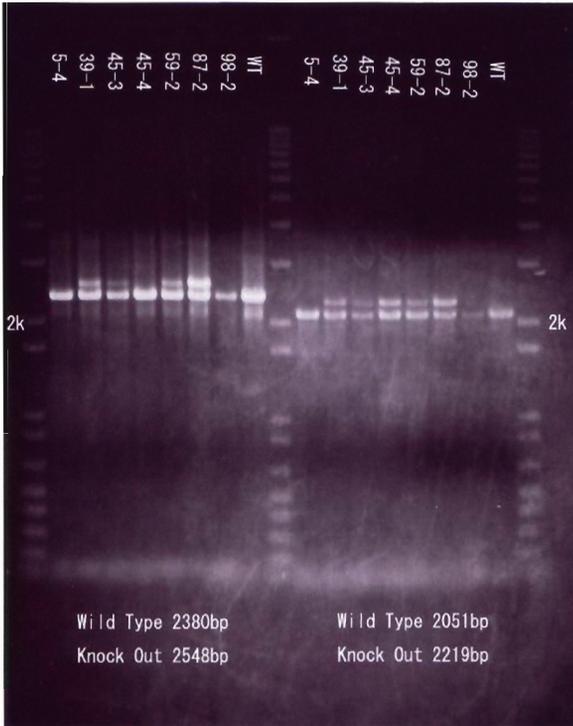


```

1  WNTSEWVLT GSSLASQVHA AAVNGDQGL QRLVGNLAL RDKEDRFGRK PLWYCYLADR VDCADALL&A GADWKEIHS RRTALHLAAQ IGVYF&KLL
                                     R1                                     R2
101 LTR&ANW&E DLE&MTPL&L STR&HSPE&L ALL&K&F&APG EVOTQ&N&Q TAL&HS&AY&M YPE&AKLL&K H&SNIG&IP&V E&S&IPL&W&A W&H&D&S&AV&T
                                     R3                                     R4                                     R5
201 Y&RC&LD&A&PT ES&LL&W&Q&YE G&R&T&PL&F&A&V D&W&L&T&V&D&V L&S&Y&E&S&C&H&I&T&S Y&D&N&L&F&R&T&P&L&H W&A&L&L&G&H&A&Q I&V&L&L&E&R&Y&E&S G&T&I&P&S&D&S&G&A T&P&L&Y&A&Q&S&N
                                     R6                                     R7                                     R8
301 F&A&E&T&Y&V&Y&P&L Q&P&S&Y&E&D&D&S&D&L E&G&R&T&S&E&W&H&A&A G&K&G&N&D&D&V&L&R&T N&L&S&L&K&S&D&I&D&I W&N&S&W&Y&G&G&T&A I&H&A&A&L&S&C&H&Y S&T&V&K&L&L&D&W D&Q&V&D&A&T&O&V&M&K H&T&P&L&F&R&A&C&E&N
                                     R9                                     R10                                    R11
401 C&H&R&O&V&I&Q&T&L I&K&G&A&R&V&D&V&D Q&Q&C&H&S&L&L&H&R&A A&L&G&C&A&D&V&C&O I&L&I&E&S&E&I&N&P&N V&Q&Y&A&G&R&T&P&L Q&C&A&A&Y&G&G&Y&I&N C&M&A&Y&L&M&E&X&S&A D&E&N&I&Q&D&E&G&R T&A&L&H&F&S&C&M&G
                                     R12                                    R13                                    R14
501 Y&L&D&A&I&K&L&L&L F&A&A&F&P&M&E&N W&E&R&Y&T&P&L&D&Y A&L&L&G&E&R&H&E&Y I Q&F&L&E&H&G&A&L&S T&A&A&I&Q&D&I&A&A&F K&I&Q&A&Y&K&C&Y&N Y&K&K&A&F&R&O&E&N L&L&M&H&E&D&L&R&K D&A&A&K&K&E&E&E
                                     R15
601 W&K&K&E&A&E&Q&K Q&L&D&T&P&P&R&S H&C&S&S&A&P&Y&L&P C&P&P&S&P&W&E&G&S K&Q&D&A&T&P&S&Q&P P&A&S&H&T&V&O&S&P&D P&E&H&S&L&P&G&R&C P&O&R&A&S&Q&D&S I&D&L&Q&T&A&S&R&K P&S&E&T&I&E&H&C&R
701 G&P&S&A&C&H&I&P&R&S W&E&G&G&N&S&E&M Q&T&S&S&Y&E&K&R&C E&T&N&G&H&R&R&C&E E&G&P&S&S&A&R&Q&P&L C&T&G&S&R&P&A&E&X G&E&D&S&P&A&F&A&S A&S&Q&M&P&P&K W&K&R&Q&D&H&A&E&R R&G&A&S&Q&R&R&T&H
801 Q&L&R&D&R&C&P&A&G S&S&R&P&S&A&N&G&E V&A&C&A&D&O&S&L&H R&H&T&P&K&S&V&T&Q D&L&L&I&G&Y&S&S&G L&P&L&S&T&E&A&S&K&S G&C&K&Q&L&Y&E&D&I&C A&S&P&E&T&O&H&A&N&G P&P&P&Q&M&W&I&H L&L&P&Y&E&Q&R&L&L I
901 I&Q&R&E&R&S&K&K&E&L P&R&R&K&E&A&A&V I&Q&R&A&W&S&Y&Q&L R&G&H&L&S&R&L&L&L K&Q&L&G&A&R&E&Y&L&R C&T&Q&V&T&A&L&L&L Q&V&W&K&E&L&E&L&K F&P&K&S&I&S&Y&S&R&T S&E&S&P&S&O&S&S&A T&K&Y&A&R&H&S&Y&L&R
1001 Q&I&V&G&C&S&Q&E&G&K G&H&P&I&K&S&K&A P&A&V&I&H&L&S&S&Y&N S&L&O&S&I&H&L&D&N&S G&R&S&K&F&S&Y&N&L Q&P&S&S&Q&K&W&P&K K&L
    
```

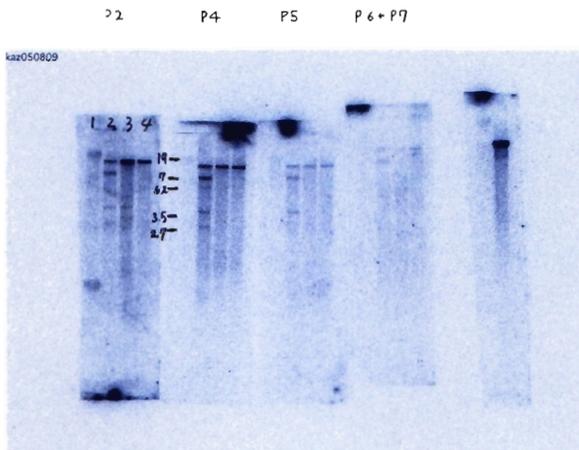


PCRおよびSouthern blottingによるスクリーニング



PCR screening

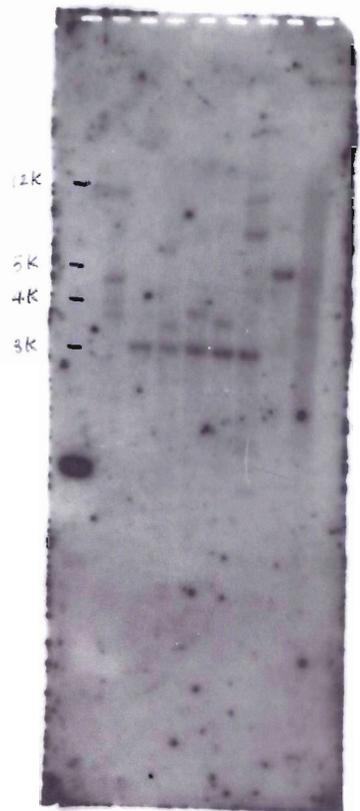
Southern blotting



1) Marker Wild Type 13.5k
2) 5-4 Knock Out 4.2k
3) 45-4
4) 98-2

051130 EGFP-NEO 1h

2	5	39	45	45	59	80	98	L
5	1	1	1	1	1	1	1	U
1	4	1	3	4	2	2	2	R



GFPをprobeとしたSouthern blotting

3) inv 機能解析

培養細胞における RNAi

同様の plasmid を従来通りの lipofectamin を用いた transfection を cell line (M1, MDCK, mIMCD3 cell) に行う。おもに発現する遺伝子 profile への影響を microarray 法で検討する。

Microarray 法による関連遺伝子 profile 検索

RNAi などにより遺伝子発現を修飾した培養細胞などから抽出した mRNA を用いる。実際の方法は Affymetrix 社の array chip を用いて、従来報告した方法に則り施行する(研究業績: Osmoadaptation-related genes in inner medulla of mouse kidney using microarray. Yoshida T, Shirota S, Tsuchiya K, et al **Biochem Biophys Res Commun** 322:250-257, 2004)。

**腎嚢胞形成、左右軸決定遺伝子*inv*
(*inversion of embryonic turning*)の
機能解析**

東京女子医科大学 第4内科、同 血液浄化療法科
代田 さつき、土谷 健、芳田 工、杉浦 秀和、
三戸部 倫大、秋葉 隆、新田 孝作

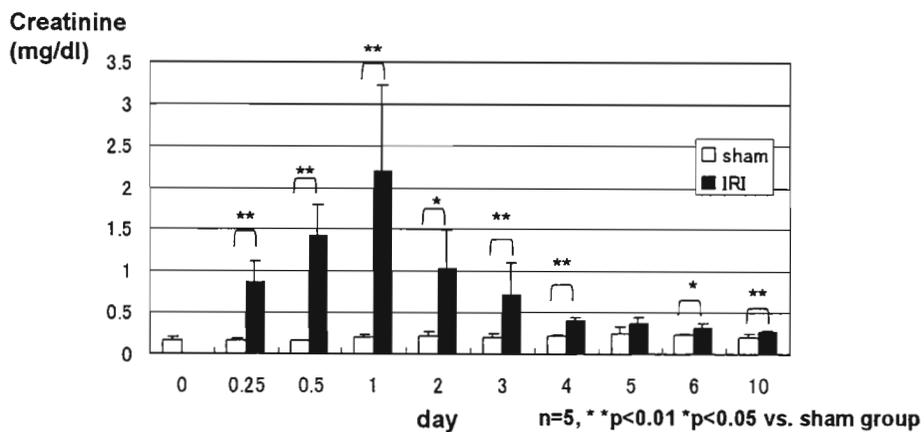
目的

1. 虚血、酸化ストレスによる腎組織および腎培養細胞での*inv*の発現、その意義を検討した。
2. *inv*を標的としたsmall interference RNA (siRNA) を腎培養細胞に遺伝子導入し、関連が推測される遺伝子profileを検索した。

方法 1

12週齢雄の Wistar rat を用いて
腎虚血再還流 (IRI) モデルを作成、
血清クレアチニン (Cr) および
腎臓での *inv* mRNA の発現を測定した。

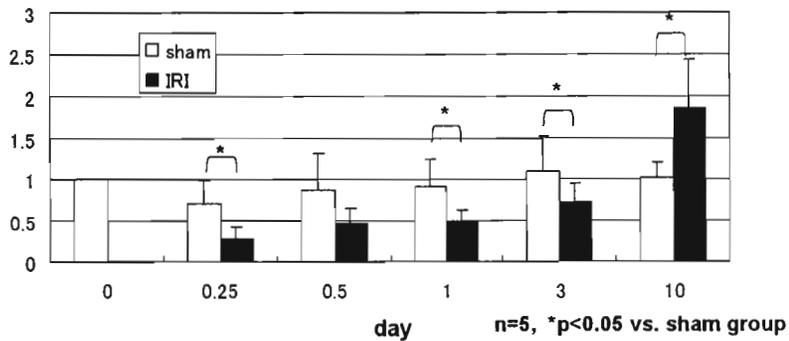
ラット腎虚血再還流 (IRI) モデルでの 血清クレアチニン (Cr) 値



CrはIRI後24時間で最も上昇し、次第に改善した。

ラット腎虚血再還流 (IRI) モデルにおける 腎臓での *inv* mRNA の発現

Inv/GAPDH



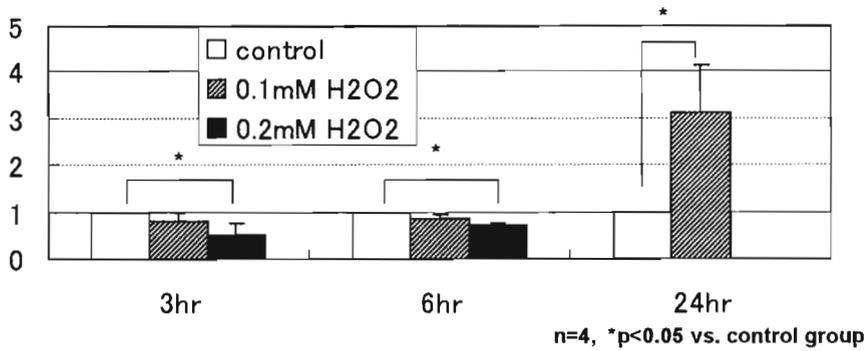
inv mRNAの発現は6時間後に最も減弱し、IRI後240時間で過剰発現した。

方法 2

マウス腎集合管上皮培養細胞(mIMCD-3)を用い、
培養液に過酸化水素(H₂O₂)を添加し
酸化ストレス下での*inv* mRNAの発現を測定した。

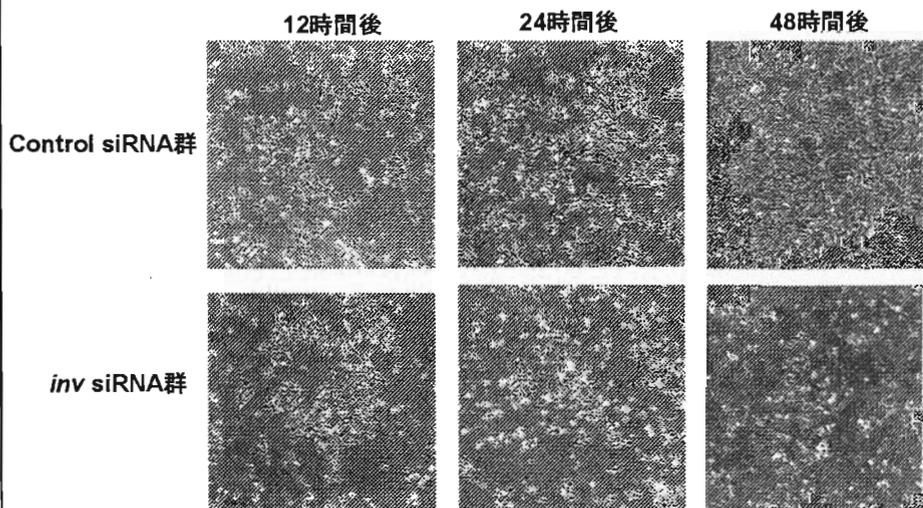
腎培養細胞 (mIMCD-3 cell) における酸化ストレス下での *inv* mRNA の発現変化

Inv relative ratio



inv mRNA の発現は、H₂O₂ 負荷後3時間で低下、24時間で発現が増強した。

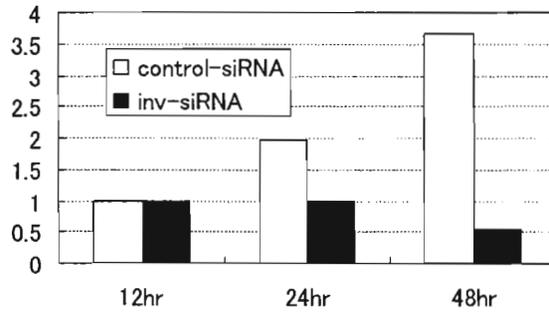
siRNA を遺伝子導入した腎培養細胞



inv siRNA 導入細胞では細胞-細胞間の接合が消失、細胞数が減少した。

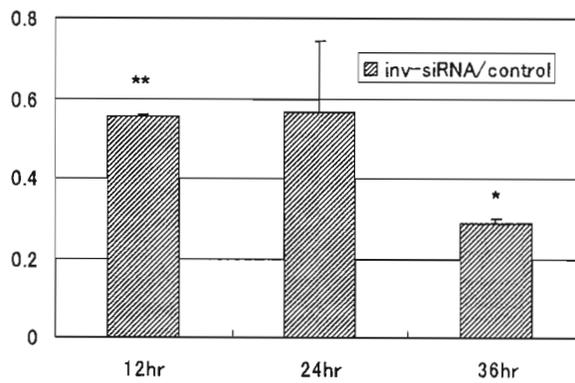
siRNAを遺伝子導入した腎培養細胞の細胞数

Cell count ratio



inv siRNA導入細胞では、細胞数が減少した。

siRNAを遺伝子導入した腎培養細胞での *inv* mRNAの発現変化



n=4, **p<0.01 *p<0.05 vs. control siRNA group

inv mRNAは36時間後で50%以下に抑制された。

**siRNAを遺伝子導入した腎培養細胞での
他の遺伝子の発現変化:発現亢進**

Symbol	Accession No.	Definition	Ratio
Mmp8	NM_008611	Mus musculus matrix metalloproteinase 8	4.6
Tnr	NM_022312	Mus musculus tenascin R	3.9
Selectin E	M87862	Mus musculus E-selectin protein	3.1
Bmp5	NM_007555	Mus musculus bone morphogenetic protein 5	2.6
Mmp3	NM_010809	Mus musculus matrix metalloproteinase 3	2.3
Mmp2	NM_008610	Mus musculus matrix metalloproteinase 2	2.1
Bmp7	NM_007557	Mus musculus bone morphogenetic protein 7	1.9

**siRNAを遺伝子導入した腎培養細胞での
他の遺伝子の発現変化:発現低下**

Symbol	Accession No.	Definition	Ratio
Talin	NM_011602	Mus musculus talin	0.15
β -Catenin	NM_007614	Mus musculus catenin beta	0.15
β -Actin	NM_007393	Mus musculus actin, beta, cytoplasmic	0.21
α -Catenin	X59990	M.musculus alpha-catenin gene	0.22
N-Cadherin	AB008811	Mus musculus mRNA for N-cadherin	0.22
Col4a1	M15832	Mouse alpha-1 collagen type IV	0.26
α -Actin	M12233	Mouse skeletal muscle alpha-actin	0.34
Thbs1	M87276	Mouse thrombospondin 1	0.36

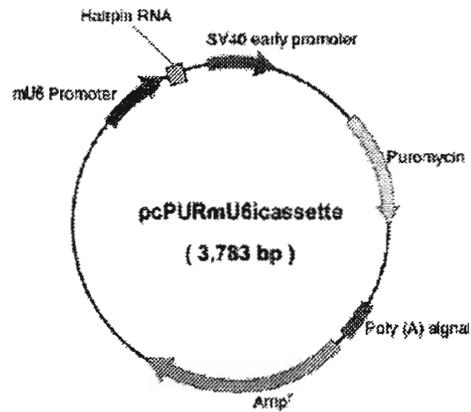
考察・結論

虚血、酸化ストレスにより*in vivo*、*in vitro*において
*inv*の発現は初期に低下し、次第に過剰発現がもたらされた。
傷害された腎の修復過程において*inv*は
何らかの役割を果たしている可能性が推測された。
この機序に関して、細胞形態や発現遺伝子profileの変化から
細胞増殖や細胞骨格形成にかかわる可能性が示唆された。

目的・方法

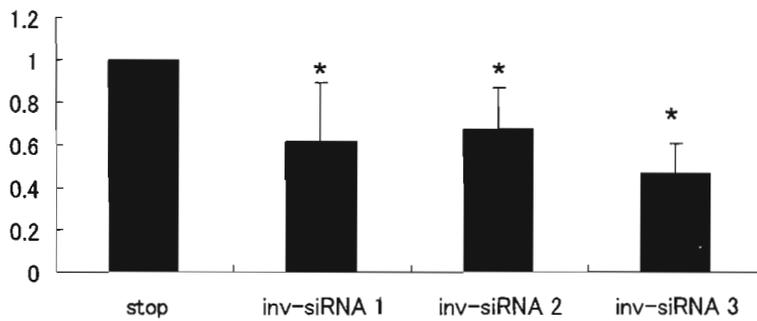
*inv*を標的としたsiRNA発現プラスミドを用いて、
腎培養細胞での*inv*発現を持続的に抑制し、
酸化ストレス応答および*inv*関連遺伝子の発現変化
を検討した。

siRNA発現プラスミド



siRNA発現プラスミドを遺伝子導入した腎培養細胞での*inv* mRNAの発現変化

Inv relative ratio

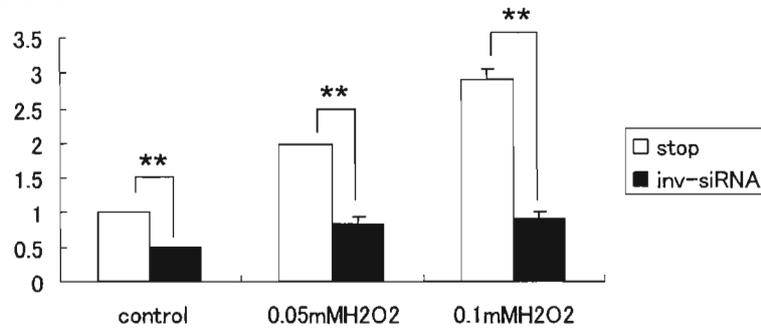


n=4, *p<0.05 vs. stop group

遺伝子導入24時間後で約60%の*inv*遺伝子の発現抑制効果が得られた。

H2O2負荷時の*inv*を標的としたsiRNA発現プラスミドの導入による遺伝子発現の変化

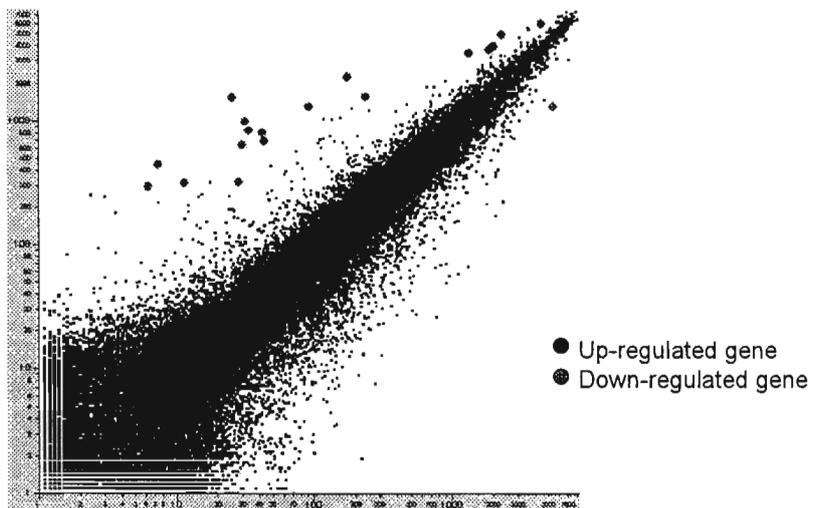
Inv relative ratio



n=3, **p<0.01 vs. stop (control) group

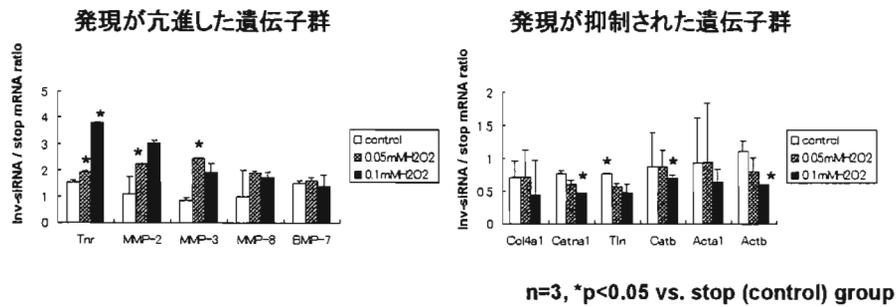
コントロール群ではH2O2負荷により*inv*の発現増加が認められたが、*inv*標的プラスミドでは*inv*の発現抑制が持続した。

Result (4): cDNA microarray analysis



Scatter-plot analysis of cDNA microarray (Affymetrix Mouse 430A) including 54,000 genes in IMCD3 cells with *inv* siRNA vector and control siRNA vector

siRNA発現プラスミドを導入した腎培養細胞での H2O2負荷時の他の遺伝子の発現の変化



siRNA導入時と同じ遺伝子群において酸化ストレス時に発現の亢進、抑制が認められた。