

変異挿入により生じた新たな嚢胞腎

トランスジェニックマウスの分子生物学的検討

研究課題番号

09671183

平成9年～平成11年度科学研究費補助金（基盤研究C）

研究成果報告書



平成12年3月

研究代表者 土谷 健

(東京女子医科大学医学部 講師)



変異挿入により生じた新たな嚢胞腎

トランスジェニックマウスの分子生物学的検討

研究課題番号

09671183

平成9年～平成11年度科学研究費補助金（基盤研究C）

研究成果報告書

平成12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

体軸の左右を決定する責任遺伝子 *inv* の cloning を行い、その遺伝子産物の構造を決定した。その変異により内臓逆位と腎の形態形成異常、嚢胞形成が発生する。その機能解析は体軸決定のメカニズムとともに正常な尿細管の形態形成の機序を解明するのに有用な情報となりうると考えられる。さらにその異常が如何なる過程で嚢胞を形成するのかは同等の嚢胞性腎疾患の原因解明と治療への可能性をもたらすものである。

平成 12 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：望月俊雄（東京女子医科大学医学部助手）

研究分担者：横山尚彦（東京女子医科大学医学部助手）

研究経費

平成 9 年度	1,300 千円
平成 10 年度	900 千円
平成 11 年度	500 千円
計	2,700 千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. I Hondo, K Tsuchiya, T Mochizuki, et al. Morphological analysis of cyst-formed kidney associated with an inversion of embryonic turning.
投稿予定
2. K Tsuchiya, J Imaki, T Mochizuki, et al. Analysis of the expression of *inv* in the embryonic kidney by in situ hybridization.
投稿予定
3. K Tsuchiya, J Imaki, T Mochizuki, et al. Expression of the inversion of embryonic turning (*inv*) gene in the mouse kidney. *J Am Soc Nephrol* 1999;10;443A.
4. T Mochizuki, Y Saijo, K Tsuchiya, et al. Cloning of *inv*, a gene that controls left/right assymetry and kidney development.
Nature 1998;395;177-181.
5. T Mochizuki, K Tsuchiya, H Nihei, et al. Molecular cloning of a candidate gene for inversion of embryonic turning with cyst-formed kidney.
J Am Soc Nephrol 1998;9;378A.
6. M Takahashi, K Tsuchiya, Y Komatsu, et al. A role for Na/K adenosine triphosphatase in the pathogenesis of cyst formation in experimental polycystic kidney disease. *J Lab Clin Med* 1997;129;517-526.

(2) 口頭発表

1. 本渡幾久子、土谷 健、望月俊雄、他 内臓逆位 transgenic mouse に合併する嚢胞形成腎の組織学的検討 日本腎臓学会学術総会 6/26-28 横浜 1999
2. 土谷 健、望月俊雄、横山尚彦、他 挿入変異により生じた内臓逆位、腎嚢胞形成 transgenic mouse の責任候補遺伝子の同定 日本腎臓学会学術総会 5/11-12 東京 1998
3. 土谷 健、望月俊雄、二瓶 宏 他 挿入変異により生じた嚢胞形成腎 transgenic mouse の責任遺伝子に関する分子生物学的検討 日本腎臓学会学術総会 5/14-16 新潟 1997

(3) 出版物

1. 土谷 健、田中裕子、望月俊雄 形態遺伝子とその異常-基礎と臨床- 現代医療 印刷中
2. 望月俊雄、土谷 健 腎臓の発生における inv 遺伝子の役割 Annual Review 2000 腎臓 pp7-12 中外医学社 2000
3. 望月俊雄、田中裕子、二瓶 宏 多嚢胞性異形成腎 腎と透析 臨時増刊号 pp367-368 1999
4. 望月俊雄、堀川雅美、田中裕子、土谷 健 他 嚢胞腎はどのように進行するか 内科 84;77-80, 1999

腎臓の発生ならびに嚢胞形成における *inv* 遺伝子の意義

背景

腎臓は発生学的に中胚葉から分化するが、哺乳類を中心とした高等動物では、前腎、中腎以後に発生した後腎 (metanephros) と呼ばれる器管が生涯の腎として機能することになる。Wolff 管に由来する尿管芽が分岐し集合尿細管が形成され、この集合尿細管の分岐した先端に後腎からの細胞群が取り囲む形で腎小体が作られる。腎小体は糸球体と同義で、それに続く尿細管、さらに集合尿細管からなるネフロンが形成される。

胎生期のネフロン形成においては、尿管芽を取り巻く間葉細胞由来の細胞群が先に述べた糸球体や尿細管を構成する上皮細胞への形質転換を起こす過程が基本である。この発生過程にさまざまな遺伝子群が関与していることが知られている。腎の形態形成異常においては、尿管芽の発生や間葉細胞の分化、増殖過程に障害があると主として低形成腎となる。ある程度 nephrogenesis が進んだ以降での障害で重要な形成異常は嚢胞形成である。最近の数々の腎発生異常を伴う遺伝子欠損動物の報告から、腎臓の発生における各遺伝子の役割が判明してきた。例えば、Wilms 腫瘍抑制遺伝子である WT1 遺伝子欠損マウスでは尿管芽が発芽しないために後腎が発生しない。このため無形成腎となることが知られている。また、分泌型の糖蛋白である Wnt-4 は中腎の間葉細胞、後腎の間葉細胞と上皮変換後の尿細管構造に発現するが、この遺伝子欠損マウスでは、後腎中期までは異常はみられないが、その後尿管芽は誘導されるが、間葉細胞から上皮細胞への変換が障害され、結果的には間葉細胞の中に発達の悪い尿管芽がみられる。また、このような遺伝子欠損動物のなかには嚢胞を形成する Bcl-2 欠損マウスも含まれる。

今回、こうした腎の形態異常を発生するモデルマウスとして、内臓逆位に嚢胞腎を合併したトランスジェニックマウスについて、その遺伝子の同定と機能解析を試み、腎の形態形成と形成異常時に発生する嚢胞について成因、機序を検討した。

(I) inv 遺伝子のクローニング

inv 遺伝子

挿入変異により内臓逆位、嚢胞形成腎をきたしたトランスジェニックマウスにおいて、ホモ接合体で表現型が現れることから、劣性遺伝型式と考えられた。このため、今回、トランスジェニックマウスにおける欠失領域にあるコスミドを用いて、マウス胎生 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。その結果、一つのクローンが欠失領域を完全に含むように存在することが判明し、その遺伝子につき、シーケンス、ホモロジー検索やノザンハイブリダイゼーションなどの解析を行った。全長は約 5.6kb で胎生 7 日よりすでに発現し、成人マウスでは腎臓、肝臓に多く発現が認められた。エクソン-イントロン構造の解析結果より、トランスジェニックマウスではエクソン 4 から 12 までが欠失しており、さらにこの inv 遺伝子を cDNA レベルで遺伝子導入したところ、inv マウスの表現型である内臓逆位および嚢胞腎ともに正常化した。このため、内臓逆位および嚢胞腎の責任遺伝子は、この inv 遺伝子であることが判明した。

その欠失領域における翻訳領域は 1062 個のアミノ酸からなり、その前半約 3 分の 2 に細胞骨格として働くアンキリンとの高い相同性のある、16~17 個のアンキリン・モチーフが認められた。アンキリンモチーフは細胞骨格、転写因子、細胞周期調節蛋白、発生制御蛋白など様々な蛋白にモチーフとしてみられる。その繰り返しの数は、アンキリンでは 20 以上、その他では 1~7 個のものが多く、inv のように 15 個というのは、これまでになく、全く新しいタイプの遺伝子である可能性も考えられた。

inv マウス

inv マウスは、もともと内臓逆位を示すマウスとして注目されていた。内臓逆位とは、心臓、消化管、肝臓、脾臓など左右非対称を示す臓器が本来あるべき位置とは逆の位置に存在することをいう。その中には、部分的に逆位を示す例やさまざまな奇形を合併する場合もある。

それに比べて、inv マウスは、そのすべてのマウスが完全に内臓逆位を示す

モデル動物として発表された。また、左右を決定する遺伝子として注目された nodal や lefty といった遺伝子が inv マウスでは、本来左側に存在するものが右に出現したことから、左右決定への関わりは、それらの遺伝子より上流に存在し、その決定に大きく関与している重要なものと考えられている。今回、inv 遺伝子は同定されたが、それがどのように左右決定機構に関与しているかは現在研究が行われているところであり、まだ不明である。ただ、inv マウスにおける nodal および lefty 遺伝子の発現解析からは、胚の発生から逆位がみられる、その時期から左右決定機構に関与していることが判明している。

腎臓形成における inv 遺伝子の役割

腎臓の発生においては、尿管芽が間葉を上皮へと分化させ、その結果、後腎芽組織の中にネフロンが形成され、さらにその後腎芽組織が尿管芽の分岐を適切に誘導する。その過程に異常が生じると、腎臓の発生異常が認められる。inv 遺伝子の欠損時も、嚢胞形成が胎生期から観察されることから、腎臓発生の過程において何らかの異常を起こしていると思われる。その原因については以下のように推測される。

初めに、Bcl-2 (B cell lymphoma-2) のノックアウトマウスにみられるように、低形成腎の結果として嚢胞が形成されてくる場合である。Bcl-2 はその機能としてアポトーシス抑制に働くことが知られており、後腎では間葉細胞から上皮細胞への変換過程で発現し、成熟した糸球体や尿細管への発現は減弱している。そのノックアウトマウスでは、間葉細胞に著しい数のアポトーシスがみられ、低形成腎となり、生後早期から主に集合管由来の嚢胞腎を発症する。この場合、後腎において間葉細胞から上皮細胞への変換過程が障害されていると考えられている。inv ホモ接合マウスの腎臓では、糸球体および尿細管組織は構造的には保たれており、嚢胞は主に集合管および遠位尿細管に認められる。このことから後腎芽組織および間葉細胞における相互誘導の初期段階は正常と考えられる。本モデルではむしろ低形成腎であり、このことは、bcl-2 ノックアウトマウスと同様に、正常な腎臓発生に必要な因子が欠如することによって

嚢胞が形成されていくことが予想される。

次に、inv 遺伝子が一つの細胞骨格を担っておりそれが障害されることにより、低形成腎および嚢胞を形成してくる可能性である。inv 遺伝子は、その中にアンキリンモチーフを有している。アンキリンは通常、spectrin binding domain を有し、赤血球などの細胞骨格の一部として働いている。inv 遺伝子は、アンキリンと異なり、アンキリンモチーフの繰り返し数がアンキリン 22~23 個に対して、inv は 15~16 個と少なく、また spectrin binding domain に相当する部分はないが、尿細管上皮細胞において何らかの形で細胞骨格として働いている可能性はある。また、アンキリンモチーフは、さまざまな遺伝子において認められるが、その繰り返しの数やその役割も多種多様である。最近、inv と同様に、その繰り返し数が 17 あるいは 18 個の遺伝子が報告された。その一つである p120 遺伝子は、その N 末端に 18 個のアンキリンモチーフをもち、またその C 末端には 6 個の膜貫通部分をもつ膜貫通蛋白であった。その機能としては、情報伝達に関連するイオンチャンネルとして働いている蛋白と考えられている。また、Ankhzn 遺伝子は、17 個のアンキリンモチーフをもち、その C 末端には zink finger モチーフをもつ遺伝子であった。その機能としては、小胞輸送におけるエンドサイトーシスへの関与が指摘されている。

最後に、上皮細胞における細胞極性の逆転の結果として嚢胞が形成されるという従来からの仮説への関わりである。一般に上皮細胞は極性を示し、微小管を中心とする細胞骨格が重要な役割を果たしていることが知られている。細胞内における細胞小器官の輸送には細胞質ダイニンやキネシンが関係しており、どちらのモータータンパク質が結合するかによって輸送の極性が決まるとされる。iv 遺伝子(lrd)が軸糸ダイニンであることやヒトの嚢胞腎では、Na/K ATPase やさまざまなレセプターの局在が嚢胞上皮細胞において逆転していることなどを考えあわせると、この細胞極性の形成に inv が関与する可能性がある。

総括

今回、左右体軸の決定に関わる新しい遺伝子 *inv* とその異常に起因する内臓逆位、嚢胞腎形成マウスについて概説した。ヒトでは、Kartgenar 症候群が有名であるが、それとは別に家族性に認められる症例があり、最近その責任遺伝子は X 染色体上に局在し、転写因子である *ZIC3* であることが報告されている。ヒト *inv* 遺伝子 homologue と mutation の報告は現在進行中である。ヒトでは内臓逆位と嚢胞腎の合併例の報告は極めてまれであり、実際に腎臓が如何なる表現型を示すかは今後の検討を待たねばならない。本 *inv* 遺伝子は新たにクローニングされた、発生過程での形態形成に関わる重要な遺伝子であることが推測される。体軸の左右決定のみならず、腎臓の発生にも大きな役割を演ずると考えられ、その機能解析、ヒトでの働き、PKD など既知の嚢胞性腎疾患での意義づけなど、今後の課題である。

(II) 内臓逆位 transgenic mouse に合併する嚢胞形成腎の組織学的検討

我々は、先に内臓逆位 transgenic mouse より左右決定遺伝子 (*inv*) を同定し、その遺伝子配列を決定して報告した (Nature 395, 177, 1998)。この mouse では内臓逆位とともに嚢胞形成腎を合併するため、その組織学的特徴について検討した。

生後 1 日齢の腎臓を摘出し、光学および電子顕微鏡で観察した。レクチン染色で nephron segment を同定し、Na/K ATPase、fodrin、cytokeratin の各免疫染色を行った。

嚢胞形成は遠位集合尿細管を中心に認められ、また糸球体にも嚢胞様の拡張が観察された。電顕所見では尿細管上皮細胞や核の扁平化、細胞の立方化、微絨毛の欠如、ミトコンドリアの局在変化が観察された。免疫染色では Na/K ATPase および fodrin は尿細管基底膜側に染色され、cytokeratin は嚢胞上皮で弱く染色された。

内臓逆位 transgenic mouse では一貫して嚢胞形成腎が認められたが、尿細管上皮細胞の極性異常は特定されなかった。*inv* 遺伝子はその構造において 15 個の ankyrin repeat を保持しており、細胞骨格の異常が左右構造と腎の発達異常に関わる可能性を推測している。

English Summary of whole project

Vertebrate organisms have a common left-right asymmetry of their visceral organs. However, all unpaired organs of the chest and abdomen, such as heart, stomach, spleen and liver, develop from the midline in the fetus and localize to their normal positions in the adult. The mirror image reversal of this asymmetry is called situs inversus. In this study, the inversion of embryonic turning (*inv*) mutation in a mouse was created by random insertional mutagenesis. The phenotype of the *inv* mouse is a consistent mirror-image reversal of the left-right polarity (situs inversus) and cystic formation of the kidneys.

To analyze the transgenic integration site, the ICRF YAC clones was screened by hybridization with the probe which contains the transgenic integration site. Three YACs were identified and cosmid libraries were constructed from these YACs. Since genomic deletion were indicated, cosmid contig spanning the whole deleted region was generated by genomic walking. The EcoRI fragment of one cosmid was not deleted and three probes between two probes were deleted in homozygote, indicating that genomic deletion is approximately 60 kb. In an effort to identify transcript, we used cosmid insert DNA to screen mouse embryo cDNA libraries directly after pre-competition with Cot1 DNA to suppress nonspecific signal. Only one cDNA clone was identified, and then obtained full length cDNA. Genomic southern hybridization indicated that these gene spans the whole deleted region, implying that the homozygous *inv* mice have intragenic deletion of this gene. Northern hybridization showed that the gene is expressed as early as embryonic day 7, and its size was approximately 5.6 kb. The highest expressions are observed in kidney and liver in adult. The deduced aminoacid of the gene has revealed ankyrin-like motif in its N-terminal domain.

We also analyzed the pathological findings of cyst-formed kidney associated with an inversion of embryonic turning. We obtained homozygous one day mice after birth and compared them with wild mice. A striking feature of the mutant mouse kidney was the occurrence of various sized tubular cysts. Although the number of glomeruli was not different from the control kidney, some of the glomeruli showed cystic dilatation, suggesting an abnormality of podocyte and Bowman's capsule in their structure. Flattened epithelium with some cells of cuboidal shape, frequent absence of micovilli and dislocation of irregularly shaped mitochondria were observed by electron microscopic examination. A thickened basement membrane was prominent in the cystic tubule. Double staining with lectin (DAB and Lotus T) was used to distinguish nephron segments with labeled streptavidin biotin method and cyst-formation was shown to occurred mainly in the distal tubule. Both subunits of Na/K ATPase and fodrin were stained at basolateral side, but the staining was faint in large cysts. Cytokeratin was also weakly stained in cells in cystic tubule. In conclusion, the *inv* mutation mouse consistently replicated multicyst-formed kidneys. As protein encoded by a candidate gene involved 15 consecutive repeats of ankyrin motif, there may be a possibility that a cytoskeletal abnormality was involved in the mechanism and production of both structural abnormalities, inversion and cyst formation in the kidney.