福井大学リポジトリ
UNIVERSITY OF FUKUI REPOSITORY

先天性腎尿路異常発生の新たなメカニズム:分化制御因子Id2欠損マウスの解析

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2013-01-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 青木, 芳隆, AOKI, Yoshitaka メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/7128

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２３年５月２７日現在

機関番号：13401
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2008～2010
課題番号：２０５９１８７４

研究課題名（和文）先天性腎尿路異常発生の新たなメカニズム:分化制御因子Ｉｄ２欠損マウスの解析

研究課題名（英文）　Analysis of Molecular Mechanism of Congenital hydronephrosis.

研究代表者
青木　芳隆（AOKI YOSHITAKA）
福井大学・医学部・助教
研究者番号：３０２７３００６

研究成果の概要（和文）：遺伝子欠損マウスの解析結果より、先天性水腎症と深く関連のある分化制御因子 Id2 を中心とした先天性腎尿路異常の発生メカニズムの解析を行った。野生型マウスに尿管閉塞を作成すると水腎症の発症を認めるが、３日後に最大 2.4 倍の Id2 遺伝子の発現上昇を認めた。これまでの成果から、アンギオテンシン系の遺伝子との関連が示唆されていたが、遺伝子ネットワーク解析、およびマイクロアレイの解析から、その関連性がより強く示唆された。また、家族内発症例を対象にヒト Id2 遺伝子の SNP 解析を行ったが、いずれの SNP も検出されなかった。
研究成果の概要（英文）：We recently showed that Id2 mutant mice develop hydronephrosis with congenital obstruction at the ureteropelvic junction, the characteristics of which show a close resemblance to those of human congenital hydronephrosis. We investigated whether Id2 was involved in the pathogenesis of hydronephrosis using unilateral ureteral obstruction (UUO) mouse model. After 3 days of UUO, Id2 gene expressions of renal pelvis were increased by 2.4-fold. Ingenuity pathway Analysis and microarray expression data analysis from public data database suggested that Id2 gene related with Angiotensinogen.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００８年度	2,500,000	750,000	3,250,000
２００９年度	900,000	270,000	1,170,000
２０１０年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総　計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学
キーワード：転写因子、腎盂尿管移行部狭窄、分化、アンギオテンシン受容体、SNP

１．研究開始当初の背景

臨床上、尿路奇形は、心奇形に次いで多く遭遇する先天性疾患であり、新生児の0.6%に尿路の拡張が認められ、その約半数が腎盂尿管移行部の通過障害に起因するといわれるが、その発症機序は今だ不明である。しかし、尿路奇形は時に出生後に腎不全を起こし致命的な状況に陥ることもあり、その発症機序の解明が必要とされている。

Idは、bHLH型転写因子の機能を抑制して

細胞の分化を阻害する機能と細胞増殖を促進する機能を合わせ持つ分子であり、哺乳動物では４つのIdが単離されている（Id1ーId4）。このうちのId2については、本学の横田らによって遺伝子欠損マウスが作成されており、多臓器にわたる多彩な病態が認められことがすでに報告されている（*Nature*, 397, 702-706, 1999; *EMBO J.*, 19, 5772-5781, 2000）。

申請者はこれまでに，分化制御因子Id2遺伝子欠損マウスが高頻度に腎盂尿管移行部(UPJ)の通過障害に起因する先天性水腎症を発症することを見出している(*Genes Cells*. 9,1287-96, 2004)。その発現様式には雌雄差があり、片側性であることなど、他の水腎症モデルマウスに比べヒト症例に酷似しており、またId2+/-マウスにも水腎症を認める。これらのことから、ヒト水腎症症例においてId2遺伝子の変異が原因となっている可能性が強く示唆され、現在我々は家族内発生例を中心にヒトにおける、Id2遺伝子変異解析を行ってきた（申請者、平成17年度科学研究費 若手研究(B)）。

また、胎仔尿管器官培養を用いた刺激実験から、Id2はBMP4の下流に位置しながら腎盂尿管系の正常な発達に必要であることを示した。さらには、マウスUPJ組織から抽出した、RNA, タンパク質を用いてそれぞれ、定量的RT-PCR法、ウエスタンブロット法で発現量を調べた結果、Id2欠損マウスではアンギオテンシンIIタイプ１受容体(AT1受容体)の発現量が低下しており、AT1受容体が、Id2の下流にある可能性を示唆する所見を得た。Tsuchidaら(1999)の報告によれば、AT1受容体欠損マウスは水腎症を発症する。また野生型マウスではUPJにおいて平滑筋層（間質）にAT1受容体は強く現している。Id2も同様に胎仔UPJの平滑筋層に強く発現しており、Id2を欠損したマウスでは同様の表現型を示す。このことは、Id2とAT1受容体の関連を強く示唆するものである。つまり、AT1受容体はId2によって直接その発現量の調節を受けている、あるいは間接的に機能抑制を受けていると考えられることから、今回我々は本研究を立案した。

これまでに各種遺伝子欠損マウスの解析から、マウスにおける水腎症関連遺伝子が多く判明している。これまでの報告では、他の水腎症関連遺伝子との分子生物学的関係を明らかにしたものはない。そのような中で、我々はこれまでに、腎盂尿管の発生におけるBmp4-Id2 という機能的上下関係を世界に先駆けて明らかにし報告している。また、Id2 と AT1 受容体の関係についても腎尿管のみならず細胞レベルでもこれまで報告はなく、今後我々の解析で AT1 受容体を中心にレニン・アンギオテンシン系と Id2 との関係を明らかにできるものと考えた。

２．研究の目的

(1) 本研究は、遺伝子解析の手法を駆使して、Id2 によるアンギオテンシン受容体遺伝子の発現および機能を抑制する機構を明らかにすることを目的とし、個々の水腎症関連遺伝子群、とくに Id2 と AT1 受容体を関連づけ、先天性水腎症発生メカニズムを解明したい。

３．研究の方法

(1) 片側尿管結紮(UUO)モデルを用いた Id2 発現量解析。

麻酔下に６週齢の野生型マウスの右尿管を 6-0 ナイロン糸で結紮して片側尿管結紮モデルを作製し、後天的な水腎症を作成し、定量的 RT-PCR 法にて Id2 遺伝子の経時的変化をみた。

(2) 水腎症関連遺伝子のネットワーク解析

Ingenuity pathway analysis(IPA; インジェヌイティ社製)を用いて、Id2 遺伝子と既知の水腎症関連遺伝子との関係を調べた。

(3) Gene Expression Omnibus (GEO)に登録されている水腎症自然発症ラットのマイクロアレイ解析データをもとに、Id2 遺伝子、既知の水腎症関連遺伝子の変化、および新たな水腎症関連遺伝子の探索を行った。

(4) これまで、我々が独自に集めた、先天性水腎症の家族内発症を認める家系の Id2 遺伝子変異の解析を行ってきたが、今回は、これまでに報告されている SNP (single nucleotide polymorphism)の解析を行った。

４．研究成果

(1) 片側尿管結紮(UUO)モデルを作成と Id2 遺伝子発現の変化.

８週齢の野生型マウスの片側尿管結紮モデルを作成し、１、３、７、１４日後に病理学的変化と Id2 遺伝子の発現をみた。尿管結紮に伴う水腎症の程度を定量化した数値である C/P ratio(Calyx/Papilla ratio)は、sham 群においては全く変化がないことに比べ、尿管結紮群は日数とともに増大していった（図１）。また、定量的 RT-PCR の結果、尿管結紮後３日目で最大 2.4 倍の Id2 発現の上昇を認め、その後徐々に発現量は低下した（図２）。このことより、後天的な水腎症発症においても、比較的水腎症発症の早期に Id2 遺伝子が関与するものと考えられた。

アンギオテンシン受容体の発現に関しては、Id2 遺伝子欠損マウスにおいて、胎生期には大きな変化はないが、水腎症が完成している生後８週齢では mRNA, および蛋白レベルで低下している。

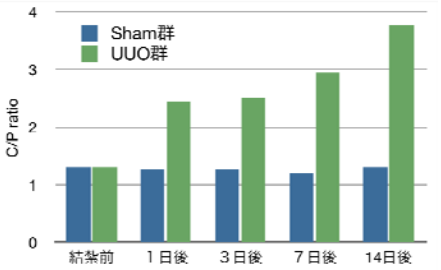

図１．片側尿管結紮による Calyx/papilla ratio の変化

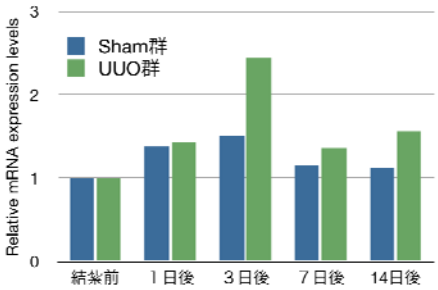

図２．片側尿管結紮による Id2 遺伝子発現の変化

(2) IPA ネットワーク解析.

Id2 遺伝子とアンギオテンシン受容体遺伝子との関連において、関与する遺伝子群で上位に位置する遺伝子を選び出し、IPA (Ingenuity Systems, www.ingenuity.com) を利用して、ネットワーク図を作成した（図３）。

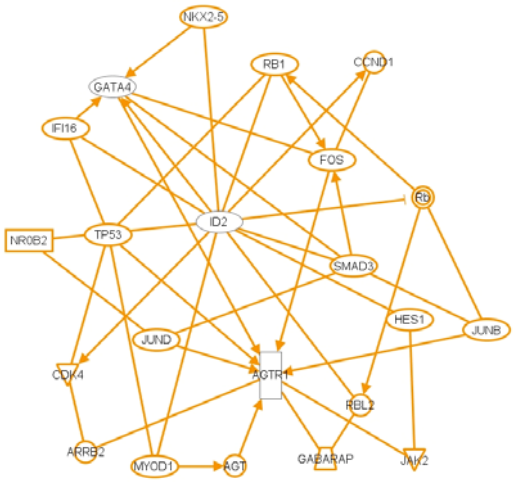

図３. IPA network analysis (Id2)

IPA によるネットワーク機能解析の結果は、Id2 の下流にアンギオテンシン受容体が存在することを示しており、これは我々の予測と一致する。さらにここには、GATA4, Agt（アンジオテンシノーゲン）などが関与しているものと推測された。

(3) 公共データを用いたマイクロアレイ解析.

NCBI が管理、提供する遺伝子発現情報データベース GEO（Gene Expression Omnibus）に登録されているマイクロアレイデータから、本研究に関連性の強い自然発症型水腎症ラットのマイクロアレイ実験結果（GSE6215）をダウンロードし解析した。自然発症型水腎症ラットにおいて、15,923 遺伝子の中からの 2 倍以上に変化している 70 の遺伝子と、0.5 倍以下に低下している 114 の遺伝子を抽出した。自然発症型水腎症ラットにおいては、Bmp4 遺伝子が有意に低下していた(0.40 倍、$p<0.001$)。また、BMP4 の下流と考えられる Id2 遺伝子は、0.66 倍ではあるが有意に減少($p=0.045$)していた。Agt 遺伝子の低下傾向を認めるも (0.52 倍)、有意なものではなかった($p\geq0.05$)。その他には、脂質代謝に関わる因子などの有意な変化を認めたが、その意義については不明であった。

(4) 家族内水腎症発症例における Id2 の SNP 解析.

ヒト先天性水腎症症例における Id2 遺伝子の変異の有無について、これまでエクソンの遺伝子配列を変異の有無を調べているが、今回は SNPs（single nucleotide polymorphisms）について解析した。対象は、先天性水腎症の家族内発症を認める 7 家系 28 例とした。まず約 4.0kb にわたる Id2 遺伝子座を PCR で増幅し、これを鋳型として PCR によるダイレクトシークエンスを行い、GenBank に登録されているヒト Id2 遺伝子座の塩基配列と比較した。ヒト Id2 遺伝子座において SNPs がプロモーター領域と第一エクソン、イントロンにあることがデータベースに登録されているが、塩基配列を決定した 7 家系、28 サンプルにおいて、いずれの SNPs も検出されなかった。

以上、これまでの解析結果より、水腎症発症においては、その進行過程で、Id2 遺伝子発現量は常に一定ではなく変化しており、比較的早期に発現することとその発現量が重要であると考えられた。IPA ネットワーク解析やマイクロアレイ解析の結果からアンジオテンシノーゲンとの関与が強く示唆されたことから、AT1 受容体は Id2 の発現量変化によって間接的に機能抑制を受けている可能性が示唆された。今後はこの点について、さらに解析を進める予定である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 9 件）

① Modulation of stretch evoked adenosine triphosphate release from bladder epithelium by prostaglandin E_2. Tanaka I, Nagase K, Tanase K, Aoki Y, Akino H, Yokoyama O. *J Urol*. 2011; 185(1): 341-6.（査読あり）

② α1-adrenoceptor blocker naftopidil improves sleep disturbance with reduction in nocturnal urine volume. Yokoyama O, Aoki Y, Tsujimura A, Takao T, Namiki M, Okuyama A. *World J Urol*. 2011;29(2):233-8.（査読あり）

③ メタボリックシンドロームと排尿障害: メタボリックシンドロームと夜間頻尿.

青木芳隆, 横山修. 排尿障害プラクティス, 2011; 19(1): 11-16 (査読なし)

④ Urinary prostaglandin E_2 was increased in patients with suprapontine brain diseases, and associated with overactive bladder syndrome. Yamauchi H, Akino H, Ito H, Aoki Y, Nomura T, Yokoyama O. *Urology*. 2010;76(5):1267.e13-9. (査読あり)

⑤ Improvement in neurogenic detrusor overactivity by peripheral C fiber's suppression with cyclooxygenase inhibitors. Tanaka I, Nagase K, Tanase K, Aoki Y, Akino H, Yokoyama O. *J Urol*. 2010;183(2):786-92. (査読あり)

⑥ Selective α1A-blocker improves bladder storage function in rats via suppression of C-fiber afferent activity. Yokoyama O, Ito H, Aoki Y, Oyama N, Miwa Y, Akino H. *World J Urol*. 2010;28(5):609-14. (査読あり)

⑦ 生活習慣病と夜間頻尿. 青木芳隆, 横山修. Urology View, 2010; 8(3): 28-32 (査読なし)

⑧ Long-lasting breaches in the bladder eqithelium lead to storage dysfunction with increase in bladder PGE2 levels in the rat. Shioyama R, Aoki Y, Ito H, Matsuta Y, Nagase K, Oyama N, Miwa Y, Akino H, Imamura Y, Yokoyama O. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008; 295(2), R714-8. (査読あり)

⑨ Novel role for inhibitor of differentiation 2 in the genesis of angiotensin II-induced hypertension. Gratze P, Dechend R, Stocker C, Park JK, Feldt S, Shagdarsuren E, Wellner M, Gueler F, Rong S, Gross V, Obst M, Plehm R, Alenina N, Zenclussen A, Titze J, Small K, Yokota Y, Zenke M, Luft FC, Muller DN. *Circulation*. 2008;117(20):2645-56. (査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

①青木芳隆、坂井清英、横山 修、先天性水腎症の家族内発症例における Id2 遺伝子変異解析 (第 1 報)、第 19 回日本小児泌尿器科学会総会、2010.7.2. 札幌

〔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

http://www.med.u-fukui.ac.jp/SEIKA1/

6. 研究組織

(1)研究代表者

青木 芳隆 (AOKI YOSHITAKA)

福井大学・医学部・助教

研究者番号:30273006

(2)研究分担者

伊藤 秀明 (ITO HIDEAKI)

福井大学・医学部・助教

研究者番号:00345620

横山 修 (YOKOYAMA OSAMU)

福井大学・医学部・教授

研究者番号:90242552

横田　義史（YOKOTA YOSHIFUMI）
福井大学・医学部・教授
研究者番号：50222386

(3)連携研究者
なし