bcl 2欠損マウスでみられる腎病変は尿管芽由来上皮の bcl 2の発現により改善する

近藤 秀治^{*1}・Christine M Sorenson^{*2}・須賀 健一^{*1}

松浦 里^{*1}・木下ゆき子^{*1}・香美 祥二^{*1}

(受付日：平成21年 8月11日 採用日：平成21年 8月18日)

要 旨

胎児腎臓では、アポトーシス抑制分子 bcl 2は尿管芽や集合管等に発現し成熟とともに bcl 2の発現は低下する。bcl 2欠損マウスの胎児腎臓では後腎間葉の著明なアポトーシスと尿管芽の分岐の減少により低形成腎をきたし成熟腎で腎嚢胞が形成される。bcl 2欠損マウスの尿管芽と集合管上皮に選択的に bcl 2を発現させることにより腎臓の重量や容積が増大し低形成腎は改善した。また、嚢胞形成や糸球体の肥大は軽減しネフロン数も増加した。bcl 2欠損マウスでみられる亢進したアポトーシスや細胞増殖の程度も改善した。以上から、bcl 2の尿管芽と集合管上皮への発現により、ネフロン数が増加し bcl 2欠損マウスでみられる腎低形成や嚢胞腎は部分的に改善する。

序 言

マウスの腎発生（後腎）では胎生11日（E11）頃に後腎間葉細胞由来のシグナルにより、ウォルフ管から尿管芽が出芽し後腎間葉細胞塊に貫入する。尿管芽と後腎間葉細胞の相互作用により、尿管芽は分岐を繰り返す。ま

^{*1}徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部小児医学分野
(〒770 8503 徳島市蔵本町3丁目18-15)

Improvement of renal hypoplasia and cystic dysplasia with re-expression of bcl-2 in the ureteric bud/collecting duct of bcl-2^{-/-} mice

Shuji Kondo^{*1}, Christine M Sorenson^{*2}, Kenichi Suga^{*1},
Sato Matsuura^{*1}, Yukiko Kinoshita^{*1}, Shoji Kagami^{*1}

^{*1}Department of Pediatrics, The Institute of Health Bioscience,
the University of Tokushima Graduate School

^{*2}Department of Pediatrics, University of Wisconsin-Madison

た、後腎間葉細胞は凝集し vesicle を形成、comma-, S-shaped body へと変化し上皮へと分化する。S-shaped body の遠位部は尿細管へと分化し集合管を形成する尿管芽と融合する。一方、S-shaped body の近位部は血管新生や脈管形成による糸球体毛細血管の形成と糸球体上皮細胞やボウマン嚢上皮細胞への分化を通じて成熟糸球体へと構築されていく。マウスでは、ヒトとは異なり出生後も腎表層部を中心にネフロンの形成が行われている¹⁾。

アポトーシスとは、多細胞生物をより良い状態に保つために積極的に引き起こされるプログラムされた細胞死であり臓器発生や形態形成などさまざまな生理的状态でみられる²⁾。アポトーシスは尿管芽の分岐やネフロン形成においても重要な役割を果たしている。bcl 2は、Tsujimoto らによって悪性リンパ腫細胞から発見された分子で、アポトーシスを強力に抑える作用を有する³⁾。1993年に bcl 2欠損マウスが作製されて以来、体内の種々の細胞において bcl 2が細胞の長期生存、特に腎臓の発生に必要な遺伝子であることが証明された⁴⁾。胎児腎臓では bcl 2は尿管芽および尿管芽由来の上皮と後腎間葉細胞の凝集部位で発現し、成熟とともにその発現は低下している⁵⁾。Nagata らやわれわれの解析により、bcl 2欠損マウスでは低形成腎と腎嚢胞形成/異形成腎を呈することが明らかになっている^{6,7)}。bcl 2欠損マウスの E12頃の腎臓では、後腎間葉の著明なアポトーシスと尿管芽の分岐が減少している一方、成熟腎では、腎嚢胞形成が顕著となり、病変部位では、アポトーシスと細

Key words : bcl 2

腎発生

嚢胞腎

低形成腎

アポトーシス

図 bcl 2欠損マウスの系球体数，系球体体積，系球体細胞数

胞増殖が亢進している。これらの病変形成に bcl 2 が果たす役割を明らかにするために，bcl 2 欠損マウスの尿管芽由来上皮に bcl 2 を発現させ腎発生異常が改善されるかを評価した。ここでは，その研究成果のまとめと bcl 2 の腎発生での役割を検討したので概説したい。

方 法

- 1) Hox b 7 /GFP トランスジェニックマウスの腎臓では，GFP が尿管芽と尿管芽由来上皮細胞（集合管）に選択的に検出される⁸⁾。従って，Hox b 7 の promoter の下流に bcl 2 の cDNA を組み込み，bcl 2 欠損マウスの尿管芽と尿管芽由来上皮細胞に bcl 2 を選択的に発現するトランスジェニックマウスを作成した。
- 2) トランスジェニックマウスの P25 の腎組織で，bcl 2 の発現の有無とその局在について Western Blot と免疫二重染色で調べた。HE 染色標本で組織所見を検討した。さらに Bertram らの測定法により系球体数を測定した⁹⁾。

3) 新生仔 (P0) および成熟マウス (P25) の腎臓での Ki 67, PAX 2, cleaved caspase 3 の発現を免疫染色で，アポトーシスを TUNEL assay で検討した。

4) 腎嚢胞形成時の増殖シグナルに関連する分子 protein tyrosine phosphatase 1B (PTP 1B) の発現と局在を検討した。*Dolichos biflorus* agglutinin (DBA) による whole-mount 染色を行い尿管芽の分岐（分岐点と分岐先端の数）を評価した。

成 績

1. 尿管芽と集合管に bcl 2 を発現するトランスジェニックマウスの作成

Hox b 7 の promoter の下流に bcl 2 の cDNA を組み込み，その遺伝子の中で最も発現レベルの高い founder を用いてトランスジェニックマウスを作成した。P25 のトランスジェニックマウスの腎臓に bcl 2 が強く発現することを western blot にて確認した。さらに，bcl 2 の発現が尿管芽と尿管芽由来上皮細胞（集合管）に選択的に

発現することを DBA と bcl 2 の二重染色で確かめた。また、その他の部位では bcl 2 の発現はみられなかった。

2. 腎嚢胞や低形成腎における bcl 2 の役割

bcl 2 欠損マウスの P25 の腎臓では、その重量や容積の減少がみられ嚢胞形成を伴う低形成腎を呈するが、トランスジェニックマウスでは bcl 2 欠損マウスと比較して腎臓の重量や容積が増大し嚢胞形成は減少した。また、bcl 2 欠損マウスでのネフロン数減少に伴う代償変化としての糸球体肥大はトランスジェニックマウスで軽減した。実際に糸球体数や体積、糸球体細胞数を計測したところ、bcl 2 欠損マウスでは糸球体数の低下と糸球体体積と糸球体細胞数の増加がみられたが、トランスジェニックマウスでは、糸球体数が増加し糸球体体積は bcl 2 欠損マウスと比較して軽減した(図)。従って、bcl 2 はネフロンの形成に関与し、ネフロン数の維持に関係していると考えられた。

次に、bcl 2 欠損マウスの嚢胞形成部位では、亢進したアポトーシス (TUNEL 陽性細胞数の増加) や細胞増殖 (Ki 67 陽性細胞数の増加) が認められた。一方、トランスジェニックマウスでは嚢胞形成の抑制に伴い、アポトーシスや細胞増殖は bcl 2 陽性コントロールマウスのレベルに改善した。従って、bcl 2 欠損マウスの嚢胞形成部位では、細胞増殖やアポトーシス等を誘導するシグナル伝達に何らかの変化が起こっている可能性がある。

PTP 1 B は細胞接着部位で細胞増殖に関連するリン酸化シグナル分子を脱リン酸化する作用を持つ。われわれは、bcl 2 欠損マウスの腎嚢胞形成において細胞接着斑キナーゼ (FAK)、パキシリン、Erk1/2 等のリン酸化シグナルが持続亢進し、リン酸化シグナルを制御調整する PTP 1 B の活性型 p42 の低下や細胞内局在の変化を報告しており¹⁰⁾⁻¹²⁾、その局在と発現レベルおよび活性化は、腎発生および成熟だけでなく嚢胞の形成時にも役割を果たしている可能性がある¹⁰⁾。今回の検討でも bcl 2 欠損マウスでは嚢胞上皮の細胞周囲ではなく細胞質全体に PTP 1 B の強い発現がみられ活性型 p42 の発現の低下がみられた。bcl 2 陽性コントロールマウスとトランスジェニックマウスで PTP 1 B は尿管細胞周囲 (細胞接着部位) に局在し p50 と p42 は同レベルの発現であった。このことから、bcl 2 欠損マウスの病変部では PTP 1 B が適切に機能せず細胞増殖のリン酸化シグナルが持続し、一方、トランスジェニックマウスでは適切にシグナル伝達の制御が行われていると考えられた。

3. bcl 2 とネフロン形成および尿管芽分岐

腎成熟における bcl 2 の細胞増殖やアポトーシスへの影響を検討するため、ネフロン形成部位 (P0) での PAX 2、Ki 67、活性型 Caspase 3 の発現を調べた。bcl 2 欠損マウスでは PAX 2 や Ki 67 のネフロン形成部位での発現とネフロン形成部位の深さは減少していたが、トランスジェニックマウスでは改善していた。bcl 2 欠損マウスでみられる亢進したアポトーシスもトランスジェニックマウスで抑制された。

ネフロン数は尿管芽分岐数に影響されると考えられており、われわれも bcl 2 欠損マウスでは尿管芽の分岐数が減少していることを報告してきた¹³⁾。今回の研究でトランスジェニックマウスではネフロン数が増加していたことから、bcl 2 を尿管芽細胞に選択的に発現させることにより bcl 2 (欠損マウス) で減少した尿管芽分岐数が改善するかを E12 の腎臓を用いて whole-mount 染色を施行し評価した。トランスジェニックマウスでは尿管芽分岐数が改善していた。以上から bcl 2 は、尿管芽の分岐に影響してネフロン数を規定する役割があると考えられた。

考 察

今回の研究をまとめると以下の通りである。bcl 2 欠損マウスの尿管芽と集合管上皮に選択的に bcl 2 を発現させることにより腎臓の重量や容積が増大し低形成腎は改善した。また、嚢胞形成や糸球体の肥大は軽減しネフロン数も増加した。bcl 2 欠損マウスでみられる亢進したアポトーシスや細胞増殖の程度も改善した。

bcl 2 は腎臓の発生で重要な役割を果たしている。bcl 2 を欠損しても腎臓は発生するが、アポトーシスは腎発生早期より起こっており、結果として生後に低形成腎や嚢胞腎を呈するようになる。今回の研究では、bcl 2 を選択的に尿管芽と尿管芽由来集合管上皮に発現させることで bcl 2 が尿管芽の分岐に影響していることが明らかとなった。従って、bcl 2 のトランスジェニックマウスでは、尿管芽の分岐数が増加することによりネフロン数が増加し、最終的に腎全体の容積や重量が改善したものと考えられる。興味深いことに、PAX 2 遺伝子異常の腎コボローマ症候群では尿管芽分岐およびネフロン数減少に伴う腎低形成がみられ腎機能低下へと進行するが、Goodyer らは、PAX 2 欠損マウスを用いて PAX 2 の promoter の下流に bcl 2 を組み込み選択的に尿管芽に発現させた。これにより、アポトーシスは抑制され尿管芽の分岐数やネフロン数が増加し低形成腎の改善と腎機能低下の抑制がみられることを示した¹⁴⁾。現在のところ尿管

芽が分岐する正確な機序は不明であるが, bcl 2を介したアポトーシスの制御は尿管芽分岐に重要な影響を与えている可能性がある。

われわれは, 尿管芽細胞を用いた培養実験で, コラーゲンゲルやマトリゲル内で bcl 2欠損細胞では分岐の形成が抑制されることを報告した。さらに, この現象に bcl 2欠損による異常な細胞接着や細胞遊走が関与していることも報告した¹³⁾。従って, bcl 2が細胞接着機能にも影響していることが考慮され, bcl 2欠損による細胞接着や遊走機能の変化が, 今回の研究でみられる尿管芽の分岐数の変化に影響した可能性がある。

bcl 2の細胞接着への影響は, 尿管芽の分岐だけでなく嚢胞形成にも関与している可能性がある。その理由として, bcl 2欠損マウスの腎嚢胞形成部位の上皮細胞では, FAK やパキシリン等の細胞接着関連蛋白およびその下流のシグナル蛋白のリン酸化が持続亢進していることが挙げられる。特に, 腎発生では bcl 2とパキシリンの結合は重要と考えられている¹⁵⁾。ADPKD や ARPKD 等の嚢胞腎でも細胞接着は病態にかかわっているとされ, 腎嚢胞が形成される機序を明らかにする手段の一つとして, bcl 2が関連する細胞接着機構やシグナル調節を明らかにすることは重要であると思われる¹⁶⁾。

結 論

bcl 2を尿管芽と集合管上皮に選択的に発現させることにより, 細胞増殖やアポトーシスの制御を通じて bcl 2欠損マウスでみられる腎低形成や嚢胞腎は部分的に改善する。bcl 2は尿管芽の分岐に影響してネフロン数を調節し腎臓の発生と成熟に重要な分子であると考えられた。本研究成果の一部は, *Developmental Dynamics* 誌に報告している¹⁷⁾。

「日本小児腎臓病学会の定める基準に基づく利益に関する開示事項はありません。」

参 考 文 献

- 1) Saxen L: Organogenesis of the kidney. New York: Cambridge University Press, 1897.
- 2) Ellis RE, Yuan J, Horvitz RH: Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 7: 663-698, 1991.
- 3) Tsujimoto Y, Croce CM: Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 5213-5218, 1986.
- 4) Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ: bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75: 229-240, 1993.
- 5) Veis D, Korsmeyer SJ: bcl-2 protein expression during murine development. *Am J Pathol* 145: 61-73, 1994.
- 6) Nagata M, Nakauchi H, Nakayama K, Nakayama K, Loh D, Watanabe T: Apoptosis during an early stage of nephrogenesis induces renal hypoplasia in bcl-2-deficient mice. *Cell* 148: 1601-1611, 1996.
- 7) Sorenson SM, Padanilam BJ, Hammerman MR: Abnormal postpartum renal development and cystogenesis in bcl-2 (-/-) mice. *Am J Physiol* 271: F184-F193, 1996.
- 8) Srinivas S, Goldberg MR, Watanabe T, D'Agati V, Al-Awqati Q, Constantini F: Expression of green fluorescent protein in the ureteric bud of transgenic mice: a new tool for the analysis of ureteric bud morphogenesis. *Dev Genet* 24: 241-251, 1999.
- 9) Bertram JF: Counting in the kidney. *Kidney Int* 59: 792-796, 2001.
- 10) Sorenson CM, Sheibani N: Altered regulation of SHP-2 and PTP 1B tyrosine phosphatases in cystic kidneys from bcl-2 -/- mice. *Am J Physiol* 282: F442-F450, 2002.
- 11) Sorenson CM, Sheibani N: Focal adhesion kinase, paxillin, and bcl-2: analysis of expression, phosphorylation, and association during morphogenesis. *Dev Dyn* 215: 371-382, 1999.
- 12) Sorenson CM, Sheibani N: Sustained activation of MAPK/ERKs signaling pathway in cystic kidneys from bcl-2 -/- mice. *Am J Physiol* 283: F1085-F1090, 2002.
- 13) Sheibani N, Scheef EA, Dimaio T, Wang Y, Kondo S, Sorenson CM: bcl-2 expression modulates cell adhesion and migration promoting branching of ureteric bud cells. *J Cell Physiol* 210: 616-625, 2007.
- 14) Dziarmaga A, Eccles M, Goodyer P: Suppression of ureteric bud apoptosis rescues nephron endowment and adult renal function in *Pax2* mutant mice. *J Am Soc Nephrol* 17: 1568-1575, 2006.
- 15) Sorenson CM: Interaction of bcl-2 with paxillin through its BH4 domain is important during ureteric bud branching. *J Biol Chem* 279: 11368-11374, 2004.
- 16) Calvet JP: Polycystic kidney disease: primary extracellular matrix abnormality or defective cellular differentiation? *Kidney Int* 43: 101-108, 1993.
- 17) Kondo S, Oakes MG, Sorenson CM: Rescue of renal hypoplasia and cystic dysplasia in bcl-2 -/- mice expressing bcl-2 in ureteric bud derived epithelia. *Dev Dyn* 237: 2450-2459, 2008.

Improvement of renal hypoplasia and cystic dysplasia with re-expression of
bcl-2 in the ureteric bud/collecting duct of bcl-2 $-/-$ mice

^{*1}Department of Pediatrics, The Institute of Health Bioscience, the University of Tokushima Graduate School

^{*2}Department of Pediatrics, University of Wisconsin-Madison

Shuji Kondo^{*1}, Christine M Sorenson^{*2}, Kenichi Suga^{*1},
Sato Matsuura^{*1}, Yukiko Kinoshita^{*1}, Shoji Kagami^{*1}

Bcl-2 is the founding member of a family of proteins that influence apoptosis. Loss of bcl-2 results in renal hypoplasia/cystic dysplasia at birth. In this review, we show that re-expression of bcl-2 in the ureteric bud/collecting duct resulted in increased nephron numbers partially rescuing renal hypoplasia/cystic dysplasia in bcl-2 $-/-$ mice.

Key words : bcl-2, renal development, renal hypoplasia, cystic dysplasia, apoptosis