

# 腎線維化における Wnt5a-Ror シグナルの解析

神戸大学大学院 医学研究科 細胞生理学分野  
山形 薫

## 1. 背景と目的

左右一対存在するヒトの腎臓は、約200万個のネフロンという機能単位から構成され、傷害により炎症反応が起こると、糸球体硬化、および糸球体を支える間質に線維化が誘導される。以上のプロセスを介した腎機能の低下により腎不全に至る。病変部位において、間質に筋線維芽細胞（活性化線維芽細胞）の集積、コラーゲン等細胞外基質（ECM）の異常蓄積、およびマトリックスメタロプロテイナーゼ（MMPs）等による基底膜破壊等が認められる。

液性因子であるWntファミリー分子は、発生、生理および病態過程において重要な機能を担っている。興味深いことに、転写因子Snailを人為的に発現させた扁平上皮癌細胞ではWnt5aおよびRor2（Wnt5a受容体）が発現誘導される。そして、Wnt5a-Ror2シグナルの作動によりMMP-2遺伝子が発現誘導され、基底膜の破壊がもたらされることが明らかにされている<sup>1)</sup>。また、マウスの片側尿管を閉塞（UUO）後、腎病変部位におけるWnt5a遺伝子の発現誘導について報告されている<sup>2)</sup>。しかしながら、その病態におけるWnt5a-Rorシグナルの役割については全くの不明である。

本研究課題では腎線維化におけるWnt5a-Rorシグナルの役割について明らかにする。

## 2. 方法

◆ **腎線維化マウスモデルの作成**—先行研究での方法に従い、C57BL/6J雄マウス（8週齢）における片側の尿管を閉塞した。そして、1、3、7日後に各腎臓（腎盂を除く）を摘出し、以下の解析に用いた。

◆ **腎線維化病変におけるmRNA発現の解析**—上記の腎臓から、Isogen試薬を使用して総RNAを抽出した。そして、逆転写反応によりcDNAを合成した。その後、各遺伝子（Wnt5a、Ror1、Ror2等）の発現量について解析するために、定量性PCRを行った（qRT-PCR）。

◆ **腎線維化病変におけるタンパク質発現の解析**—上記の腎臓から、組織溶解バッファーを使用して総タンパク質を抽出した。その後、各タンパク質（Wnt5a、Ror1、Ror2、Dishevelled2等）の発現量について解析するために、ウェスタンブロッティング（WB）を行った。

◆ **腎線維化病変におけるタンパク質局在の解析**—上記の腎臓から凍結切片を作成した。その後、Ror2特異的抗体および以下の抗体（筋線維芽細胞マーカーαSMA、間葉系細胞マーカーVimentin、基底膜破壊酵素MMP-2等）を用いて、それぞれ二重蛍光免疫染色を行った。

## 3. 結果

マウスにUUO操作後、腎線維化の誘導に伴い、Wnt5aに加え、Ror1とRor2のmRNAおよびタンパク質発現が誘導された（図1）。また、蛍光免疫染色により、尿細管上皮でRor2の発現誘導が検出された。

しかしながら、Ror2等の発現制御機構は不明である。最近、我々は、Snailを発現する扁平上皮癌細胞において、Wnt5aとRor2が発現誘導されることを見出した<sup>1)</sup>。そこで、腎臓においてこの制御機構について解析した。qRT-PCRの結果から、UUO操作後1日にSnailが発現誘導され、3日から発現誘導されるRor2よりも早い時期に誘導されることを見出した。次に、二重蛍光免疫染色により、Ror2はSnail陽性尿細管上皮細胞にて発現誘導されることを見出した。

次に、Ror2シグナルが作動するか否か不明である。そこでWntシグナル活性化のマーカであるDishevelled2(Dvl2)のモビリティシフトをWB法により解析した。その結果、UUO操作後3日からDvl2の発現が誘導され、7日からモビリティシフトが検出された。この結果を踏まえ、腎線維化に伴い、Ror2シグナルが作動する可能性が想定される。

それに伴い、特定遺伝子の発現誘導が想定されるが、その実態は不明である。我々は扁平上皮癌細胞にてWnt5a-Ror2シグナルの作動により、MMP-2が発現誘導されることを見出した<sup>1)</sup>。そこで、Ror2陽性尿細管上皮細胞におけるMMP-2発現について解析した。二重蛍光免疫染色により、MMP-2はRor2陽性尿細管上皮細胞にて局在することを見出した(図2)。

しかしながら、尿細管上皮細胞にてRor2シグナルが制御するMMP-2の役割は不明である。MMP-2は基底膜の細胞外基質を分解する機能を有する。そこで、尿細管上皮にて発現誘導されるMMP-2が、隣接する基底膜の破壊に作用する可能性について解析した。基底膜タンパク質であるLamininとRor2を検出するために、二重蛍光免疫染色を行った。その結果、UUO未操作の尿細管基底膜で連続したLaminin染色域が検出される一方、UUO操作後では断続したLaminin染色域および陰性域が検出された。この結果から、腎線維化において尿細管基底膜が破壊されていることが示唆された(図3)。興味深いことに、Ror2染色が弱い上皮ではLaminin陽性連続域が検出される一方、Ror2染色が強い上皮ではLaminin陽性断続域および陰性域が検出された。

#### 4. 考察

まず、腎線維化に伴い腎病変部位におけるWnt5aの発現誘導が報告されている<sup>2)</sup>。しかしながら、その機能的役割については不明な点が多い。本研究では、腎線維化マウスモデルを用いて、病変部位において、Wnt5aに加え、Wnt5a受容体として重要なRor1とRor2の発現誘導を見出した。特に、Ror2は尿細管上皮細胞にて発現し、上流でSnailの制御を受ける可能性が示唆された。興味深いことに扁平上皮癌細胞で、発現誘導されるRor2はSnailの制御を受けることが報告されている<sup>1)</sup>。

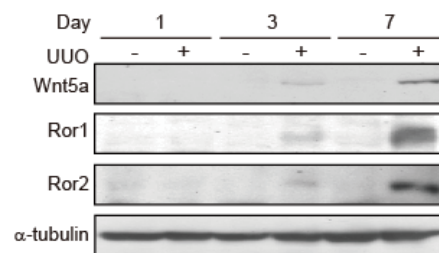


図1. 腎線維化におけるWnt5aとRor1/2発現誘導

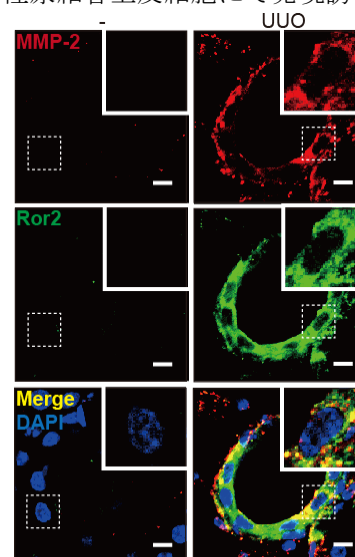


図2 Ror2 陽性尿細管上皮細胞におけるMMP-2の局在。Bar, 10μm

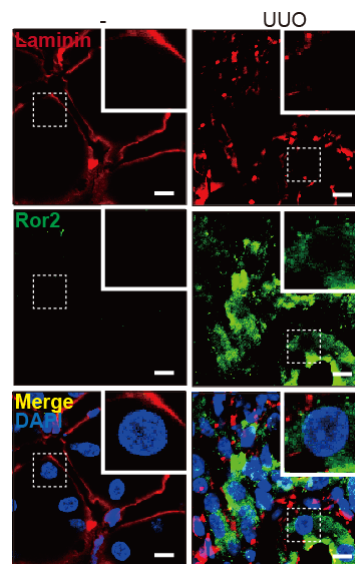


図3 Ror2 陽性尿細管上皮細胞に隣接した基底膜の破壊。Bar, 10μm

つぎに、線維化を伴う腎においてWntシグナル活性化のマーカであるDvl2のモビリティシフトが検出され、Ror2シグナルは下流でMMP-2の発現を制御する可能性が示唆された。腎細胞がん細胞および扁平上皮癌細胞にて、Ror2およびWnt5a-Ror2シグナルがそれぞれMMP-2の発現を制御する知見と照らし合わせて、本研究で想定される経路を解析するのも興味深いと考えている<sup>1),3)</sup>。次に、野生型と比較してMMP-2遺伝子欠損マウスでは腎線維化が軽減することが報告されている<sup>4)</sup>。そこで、Ror2陽性尿細管上皮細胞に隣接した基底膜が破壊されていることに着目した。Ror2シグナルがMMP-2発現に強い関与があるのであれば、尿細管基底膜の破壊におけるRor2シグナルの役割は大変重要になる。さらに、①尿細管基底膜破壊および隣接する尿細管上皮脱落等を伴いながら腎線維化は進行する点、②尿細管上皮細胞はTGF- $\beta$ 分泌を介し、線維化と密接に関わる筋線維芽細胞を生み出す点を考慮すると、腎線維化病態の進展におけるRor2シグナルの解析は大変興味深いと考えられる。

尿細管上皮細胞にてWnt5a-Ror2シグナルがMMP-2発現制御を担うことを厳密に証明するために、遺伝子改変マウスを用いた解析は重要である。そこで、UUO操作後のRor2<sup>+/+</sup>およびRor2<sup>-/-</sup>マウスを用いて、MMP-2発現分布の比較およびLaminin染色による基底膜破壊等について解析する。以上の解析により、Wnt5a-Ror2シグナルを介したMMP-2発現制御および腎線維化病態への関与について明らかにできると考えている。

今回、免疫染色法により、 $\alpha$ SMAは間質で、Ror2は尿細管上皮で検出された。しかしながら、少ないながらも、Ror2陽性上皮細胞において $\alpha$ SMA発現が検出された。この結果により、Ror2シグナルが尿細管基底膜の破壊以外だけでなく $\alpha$ SMA陽性筋線維芽細胞の分化に関わる可能性が想定される。最近、マウスの腸細胞においてWnt5a-Ror2シグナルがTGF $\beta$ /Smad3シグナルと協調的に作用することが報告された<sup>5)</sup>。元々、TGF $\beta$ /Smad3シグナルは腎線維化の発生に大変重要であり、細胞外基質の構成成分であるコラーゲンの発現誘導に関わることが報告されている<sup>6)</sup>。そのため、Ror2シグナルとTGF $\beta$ /Smad3シグナルに関する解析を通し、腎線維化の発生および進展における作用について調べることは大変興味深いと考えられる。またCanonical Wntシグナルも腎線維化に促進的に作用することが報告されている<sup>7)</sup>。興味深いことに、多様な細胞種において、Non-canonical Wnt5aシグナルがCanonical Wntシグナルを抑制することが知られている。そのため、腎線維化におけるWnt5a-Ror2シグナルの全貌を解明することにより得られる知見は、異なる組織の線維症に関する研究にもたらす波及効果も大きいと考えている。

## 5. 参考文献

- 1) Genes Cells 16: 304, 2011.
- 2) Arch. Pharm. Res. 32: 1653, 2009.
- 3) Oncogene 28: 2513, 2009.
- 4) Lab. Invest. 92: 1149, 2012.
- 5) Science 338: 108, 2012.
- 6) J. Am. Soc. Nephrol. 13: 2600, 2002
- 7) PLoS Biol. 4: e115, 2006.