

左右軸決定遺伝子 *inv*(*inversion of embryonic turning*) の機能解析

代田さつき* 芳田 工** 杉浦秀和* 土谷 健
二瓶 宏

Functional analysis of the left-right determinant *inv*(*inversion of embryonic turning*) gene

Satsuki SHIROTA*, Takumi YOSHIDA**, Hidekazu SUGIURA*, Ken TSUCHIYA, and Hiroshi NIHEI

*Department of Medicine IV, **Department of Blood Purification,
Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

We identified the *inv* gene that encodes left and right asymmetry and regulates kidney development based on the information of the *inv* mutant mouse. However, functional properties and the modulator of gene expression of *inv* have been unclear. We used the tissue injury model for assessing the functional roles of *inv* in ischemia reperfusion injury (IRI). The kidney tissue taken from rats with IRI showed reciprocal changes in mRNA expression of *inv* : a 0.25-fold decrease at 6 hours and then a gradual increase to a maximum 1.8-fold rise at 10 days of reperfusion. Next, oxidative stress was induced by exposing mouse inner medullary collecting duct (mIMCD-3) cells to hydrogen peroxide (H₂O₂) in the medium. Real-time PCR showed that mRNA expression of *inv* decreased 0.52-fold at 3 hours with 0.2 mM H₂O₂ in the medium, and then increased 3.1-fold at 24 hours with 0.1 mM H₂O₂ in the medium.

RNA interference (RNAi) is a powerful tool to inhibit gene expression in experimental model systems. We knocked down *inv* gene expression in mIMCD-3 cells using RNAi to investigate the function of the *inv* gene. We designed a small interfering RNA (siRNA) to target the coding region of *inv* (*inv*-siRNA) and random-sequence scrambled siRNA (control siRNA). mIMCD-3 cells transfected with either the *inv*-siRNA or control siRNA were observed by microscopy. The cells transfected with *inv*-siRNA progressively lost cell-to-cell contact and the cell population significantly diminished approximately 48 hours post-transfection. The changes in gene expression profile were observed at time points (36 hours) using real-time PCR-based gene screening with categorized primer sets. Several genes related to structural protein of the matrix were downregulated. In contrast, repairing related genes were upregulated.

In conclusion, gene expression of *inv* was modulated under oxidative stress and the *inv* gene may play a role in repairing and regenerating renal epithelial cells.

Jpn J Nephrol 2004 ; 46 : 676-684.

Key words : cystic kidney, *inv*, ischemia reperfusion injury, RNA interference, real-time PCR

緒言

われわれは先に左右軸決定遺伝子 *inv*(*inversion of embryonic turning*) をクローニングし、その遺伝子構造を決定した¹⁾。*inv* 遺伝子が mutagenesis を起こしたマウスにおいては、ほぼ 100% 内臓逆位が生じるとともに、腎臓に

は多発性の嚢胞が出現する²⁾。腎臓での嚢胞の形成には、ヒトの疾患である常染色体優性多発性嚢胞腎 (ADPKD) の原因遺伝子である *PKD1* および *PKD2* が同定され、その嚢胞発生の機序を含め注目されている³⁻⁵⁾。加えて、アポトーシス抑制遺伝子とされる *Bcl-2* などの欠損でも腎臓に嚢胞が形成されることが知られており⁶⁾、腎臓での嚢胞

* 東京女子医科大学第 4 内科, ** 同 血液浄化療法科

形成は一元的な要因のみでは説明できず、発生過程に関わる遺伝子の異常が、異なった機序により嚢胞を生じる可能性がある。さらに嚢胞形成と体軸との関連については、マウスの自然発症嚢胞形成モデルの原因蛋白とされる polaris⁷⁾ や, polycystin 2⁸⁾ などの腎に嚢胞形成をみる遺伝子異常と左右軸の逆転が指摘され、また *inv* がヒトでの嚢胞性腎の原因遺伝子の一つであることが報告され⁹⁾、本遺伝子と発生および腎の形態形成における関わりが注目される。しかしながら、*inv* 遺伝子およびその発現蛋白である *inversin* の役割については不明な点が多い。

従来の報告より¹⁰⁾、*inv* はその遺伝子情報においてアンキリン構造を有するため、細胞の骨格に関与する可能性がある。本研究では、酸化ストレスによる組織障害を虚血再還流腎モデルにより誘導し、*inv* の発現変化を検討した。また、過酸化水素(H₂O₂)による酸化ストレスでのマウス腎集合管上皮培養細胞における *inv* の発現変化を検討した。さらに、RNA interference (RNAi) にて *inv* 発現を特異的に抑制したマウス腎集合管上皮培養細胞において、遺伝子の発現 profile の変化を real-time PCR 法を用いて検討した。

対象と方法

1. ラット虚血再還流腎 (ischemia reperfusion injury : IRI) における *inv* の発現と腎機能

対象として体重 200~250 g, 12 週齢雄のウィスターラットを用いた。ペントバルビタール (50 mg/kg, 腹腔内投与) (大日本製薬(株), 東京) 麻酔下で開腹し、両腎門部を剝離、血管クランプを用いて両側の腎動脈を 60 分間完全閉塞させた後開放し、腎臓を再還流した群を IRI 群とした。開腹のみ行った群をコントロールの sham 群とした。再還流前、後 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 ないし 240 時間後に採血を行い、血清クレアチニン (Cr) を測定、腎臓を摘出して急速凍結し、-80°C で保存後 mRNA を抽出した。

すべての動物実験は東京女子医科大学動物実験倫理委員会の承認を得て (承認番号 03-07), NIH の実験動物の使用ガイドラインに準拠して施行した。

2. マウス腎集合管上皮細胞 (mouse inner medullary collecting duct cell : mIMCD-3 cell)

対象として mIMCD-3 細胞 (ATCC Number : CRL-2123) を用いた¹¹⁾。mIMCD-3 細胞の培養には、FBS (Invitrogen®) (最終濃度 10%), penicillin-streptomycin

(Invitrogen®) (最終濃度 100 units/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin) を添加した DMEM/F12 (Invitrogen) 液体培地を用い、37°C, 5% CO₂ の条件下で培養した。パッセージ 18-22 の細胞を実験に使用した。

3. H₂O₂ 負荷による mIMCD-3 細胞での *inv* の発現

H₂O₂ 添加前日に 60 mm 径の培養ディッシュに 2.6×10⁵ 個の mIMCD-3 細胞を蒔き、37°C, 5% CO₂ 条件下でインキュベートした。80~90%コンフルエントの mIMCD-3 細胞に H₂O₂ (最終濃度 0.1 mM, 0.2 mM) を添加し、培養細胞を 0, 3, 6 および 24 時間後に採取した。培養細胞の採取は、ディッシュ内の液体培地を吸引除去し、PBS で洗浄後、TRIzol (Invitrogen®) を加えて攪拌した後チューブに回収し、mRNA を抽出するときまで -80°C で保存した。

4. RNAi による *inv* 発現抑制下の mIMCD-3 細胞の形態と遺伝子発現プロフィール

A. siRNA の合成および細胞内導入

RNAi に用いる 21 塩基の二本鎖 RNA である small interference RNAs (siRNAs) を設計した。今回の RNAi の標的遺伝子である *inv* のスタートコドンから 100 塩基以上下流の最初の AA を選択し、AA に続く 19 塩基を記録、GC 含有率が 50%前後であることを確認した。選択した 21 塩基を NCBI の BLAST 検索にて、配列が *inv* 遺伝子に対して特異的であることを確認後、3'末端に d(TT) を付け加え、センス鎖 siRNA を設計し、*inv*-siRNA とした。また、*inv*-siRNA の塩基配列の塩基組成をランダムに並び替え、NCBI の BLAST 検索にて *inv* 遺伝子と相同性を持たないことを確認し、これを *inv*-siRNA のコントロールであるコントロール siRNA とした。実際の合成は Dharmacon Research 社 (Lafayette, CO) に依頼した。

標的 mRNA 配列 : AUG ... AAGAGAUGACAC-CUUUGCACC...

inv-siRNA センス鎖 : 5'-GAG AUG ACA CCU UUG CAC CTT-3', アンチセンス鎖 : 5'-GGT GCA AAG GUG UCA UCU CTT-3'

コントロール siRNA センス鎖 : 5'-AUC GAU GCA CGG CAC AUC UTT-3', アンチセンス鎖 : 5'-AGA UGU GCC GUG CAU CGA UTT-3'

遺伝子導入前日に 60 mm 径の培養ディッシュに 1.8×10⁵ 個の mIMCD-3 細胞を蒔き、37°C, 5%CO₂ 条件下でインキュベートした。siRNAs の遺伝子導入は Lipofectamine® 2000 (Invitrogen®) を用いた。*inv*-siRNA とコントロール siRNA の各々で、1,000 pmol の siRNAs を 500 μl の

Table 1. Gene profiles : apoptosis, cytoskeleton and cell adhesion molecules

Acc. NO.	Symbol	Acc. NO.	Symbol	Acc. NO.	Symbol	Acc. NO.	Symbol
AF058797	I4-3-3 beta	AF126056	FKHR	AF052492	A15	AK089523	Mmp12
NM_009652	Akt1	X12801	FODA	M12233	a-Actin	NM_008608	Mmp14
NM_009684	APAF1	L28177	GADD45	X59990	a-Catenin	NM_008610	Mmp2
AB006787	ASK1	M21828	GAS	NM_007462	Apc	NM_010809	Mmp3
NM_007498	ATF3	NM_019827	Gsk3b	NM_007393	b-Actin	NM_010810	Mmp7
M94087	ATF4	NM_010431	Hif1a	XM_127857	Bmp1	NM_008611	Mmp8
NM_007522	Bad	AB009375	ICAD-L	NM_007553	Bmp2	NM_013599	Mmp9
NM_007527	Bax	NM_019777	Ikbke	NM_173404	Bmp3	AB008811	n-Cadherin
NM_009741	Bcl2	AF026524	IKKbeta	NM_007555	Bmp5	AF168466	Nephrin
NM_007537	Bcl-w	AB005663	JNK1	NM_007557	Bmp7	X14480	Nidogen
NM_009743	Bcl-XL	J04064	LAMINNA	NM_007614	b-Catenin	NM_008756	Occludin
NM_007544	Bid	XM_110688	Mafb	MMU251594	CD44	AF515708	Osteopontin
NM_007545	Bid3	U35623	MCL-1	BC042459	Cingulin	Z17804	p120
AF032459	BimEL	U47934	Mdm2	NM_007743	Col1a2	M33960	PAI-1
M64429	B-Raf	L02526	MEK	M15832	Col4a1	NM_133915	Paxillin
AB009377	CAD	U93030	MKK7	NM_138686	Cystin1	NM_008305	Perlecan
NM_009808	Casp12	NM_008689	NFKB1	NM_007584	Ddr1	MMU70209	Pkd1
NM_009810	Casp3	U88984	NIK	NM_022563	Ddr2	AF271381	PkdL
NM_009811	Casp6	NM_009877	p16INK4	NM_007833	Decorin	M90365	Plakoglobin
NM_007611	Casp7	U20497	p19	NM_013504	Desmocollin1	Y13278	Polycystin
XM_129752	Casp8	U24173	p21	NM_013505	Desmocollin2	M87862	Selectin E
NM_015733	Casp9	NM_009875	p27kip	NM_007882	Desmocollin3	U97059	Slug
NM_007631	Ccnd1	M13872	p53	BC033467	Desmoplakin	XM_140321	Symplekin
X16461	CDC2	XM_123003	p90RSK	XM_147262	Dvl3	X15487	Syndecan
U27323	CDC25A	AF072521	PARP	X06115	E-cadherin	NM_011602	Talin
NM_016756	CDK2	AF086625	PDK1	NM_009510	Ezrin	NM_010703	Tcf/lef
AF016583	CHK1	AB008792	PI3K	L33726	Fascin	NM_011607	Tnc
AF086905	CHK2	M25811	PKC-alpha	NM_021457	Fzd1	NM_022312	Tnr
AK033026	c-Maf	AJ224738	RAIDD	XM_133269	Gsk-3	M87276	Tnbs1
NM_009950	Cradd	NM_009029	Rb1	NM_010493	ICAM1	NM_011593	Timp1
M95106	CREB	NM_009068	Ripk1	Y00769	Integrin, beta	NM_011653	Tuba1
X75888	CYCE	NM_009283	Stat1	NM_008396	Integrin, alpha 2	NM_011693	VCAM1
Z26580	CYCLA	BC019168	Stat3	NM_010575	Integrin, alpha 2b	NM_009502	Vinculin
X58708	CYCLB	L35303	TRAF2	NM_010577	Integrin, alpha 5	NM_011707	Vitronectin
NM_007808	Cyca	NM_009516	Wee1	XM_126747	Jup	NM_009523	Wnt4
X72310	DPI			NM_011029	Laminin receptor	D14340	ZO-1
L21973	E2F1A			D89813	Laminin, alpha 4	AF113005	ZO-2
Z14249	ERK1			M60474	MARCKS	AF157006	ZO-3
U43184	FADD			NM_019471	Mmp10		
M83649	FASANT			NM_008606	Mmp11		

DMEM/F12 液体培地に添加し、20 μ l の Lipofectamine[®] 2000 を 500 μ l の DMEM/F12 液体培地に添加し、これらを 5 分以内に混和、室温にて 15 分間インキュベートし、siRNAs と Lipofectamine[®] 2000 の複合体を作製した。50%コンフルエントになった mIMCD-3 細胞の培養ディッシュから培養液を吸引除去し、滅菌 PBS で細胞を洗浄、siRNAs と Lipofectamine[®] 2000 の複合体を均一に分布するよう添加し、遺伝子導入した。37°C、5%CO₂ 条

件下でインキュベートし、12 時間後に FBS(最終濃度 10%)、penicillin-streptomycin(最終濃度 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin)を添加した DMEM/F12 液体培地に交換した。以後、光学顕微鏡にて経時的に培養細胞の形態を観察し、細胞数を実測した。遺伝子導入から 12、24 および 36 時間後に培養細胞を採取した。培養細胞の採取は、ディッシュの液体培地を吸引除去し PBS で洗浄後、TRIzol(Invitrogen[®])を加えて攪拌した後チューブ

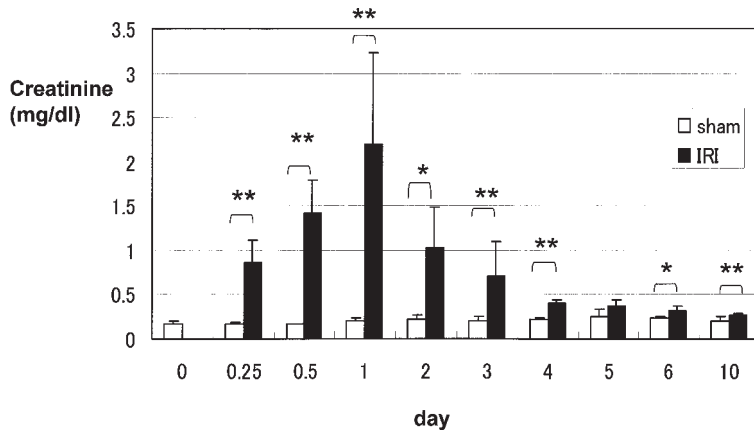


Fig. 1. Changes in serum creatinine after re-perfusion of the kidney in the Wistar rat

Values are expressed as the means \pm SEM in each group. n=5. **p<0.01, *p<0.05 vs. sham group.

に回収し、mRNAを抽出するときまで -80°C で保存した。

B. siRNAによる発現遺伝子プロファイルの変化

inv-siRNAの遺伝子導入により発現遺伝子の変化を検討するためにreal-time PCRを施行した。その際に、あらかじめTable 1のような細胞外マトリックス、アポトーシスなどに関わる既知の遺伝子群のreal-time PCR用のprimerセットを作製した。

5. mRNAの抽出

ラットの腎臓およびmIMCD-3の培養細胞はTRIzolを用い、プロトコールに準じてmRNAの抽出を行い、実験に用いるまで -20°C で保存した。

6. Primerの作製

inv mRNA発現の評価のためマウスおよびラットの*inv* cDNAの塩基配列からprimerを設計した。

マウス *inv* primer, forward(Fw); 5'-AGGTGCCCT-CAGAGACTCA-3', reverse(Rv); 5'-TCCACTCTGT-CTGCCAACAC-3'

ラット *inv* primer, Fw; 5'-CCTGTGAGATGG-GACACAAA-3', Rv; 5'-CTGGCAGACATCAG-CATTTTC-3'

細胞外マトリックス、アポトーシスなどに関わる既知の遺伝子群のreal-time PCR用のprimerは、マウスにて各々のモチーフを保存している既知の塩基配列より、各部位が増幅するよう5'側と3'側にprimerを設計した。またinternal controlとしてGAPDH primerを利用した。

7. Real-time PCR法による検出

ラットの腎臓およびmIMCD-3細胞のtotal RNA(2 μg)を鋳型とし、Superscript II (Invitrogen[®])を用いて逆転写酵素反応(RT)を行い、cDNAを合成した。Superscript IIのプロトコールに準じてこのcDNAを鋳型として、ポリ

メラーゼ反応(PCR)によるcDNA合成を行った。

Real-time PCRは各々のcDNAを鋳型とし、SYBR green PCR反応液(PE Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて、one step法にて、PRISM 7700 sequence detection system(PE Applied Biosystems, Foster City, CA)で施行した。mRNAのレベルはGAPDHを用いて標準化した。

8. 生化学のパラメータの測定

血液サンプルは、遠心し(5,000 rpm, 10分間)、血清を採取した。血清creatinine(Cr)濃度は、自動分析器(SRL, 東京)にて測定した。

9. 統計

測定値はすべて平均値 \pm 標準誤差で示した。統計解析はStatView ver 5.0(SAS Institute Inc., NC)を使用し、群間の変化はun-paired Student's *t*-testで検討した。p<0.05を統計学的に有意差ありとした。real-time PCRの結果はp<0.05の遺伝子を示した。

結 果

1. ラットIRIにおける*inv*の発現と腎機能の変化

A. IRIラットの腎機能の変化(Fig. 1)

虚血前のCrはsham群とIRI群で明らかな差を認めなかった。虚血再還流後24時間におけるCrは、sham群の $0.21 \pm 0.02 \text{ mg/dl}$ と比較してIRI群で $2.20 \pm 1.03 \text{ mg/dl}$ と有意に上昇した(p<0.05)。IRI群では、虚血再還流後24時間においてCrが最も上昇し、以後は徐々に減少した。虚血再還流後240時間ではsham群で $0.20 \pm 0.02 \text{ mg/dl}$ 、IRI群では $0.27 \pm 0.02 \text{ mg/dl}$ とIRI群でCrの改善が認められた。

B. IRIにおける*inv* mRNAの発現変化(Fig. 2)

腎における*inv* mRNAの発現の変化を比較した。IRI

Inv/GAPDH

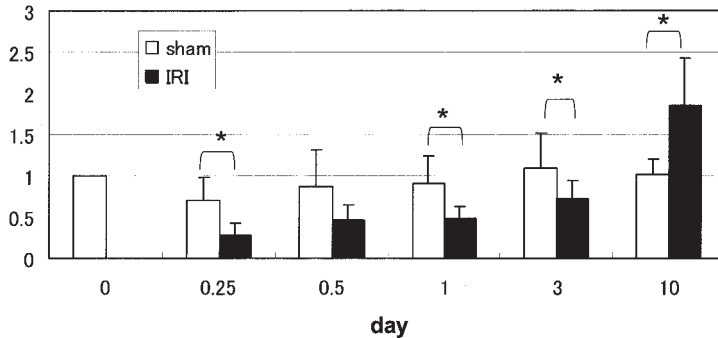


Fig. 2. Changes in expression of *inv* mRNA in the kidney

Expression of *inv* mRNA was analyzed by semi-quantitative real-time PCR, as described in the method. Values are means \pm SEM percentage changes in expression of mRNA. $n=5$. * $p < 0.05$ vs. sham group.

Inv relative ratio

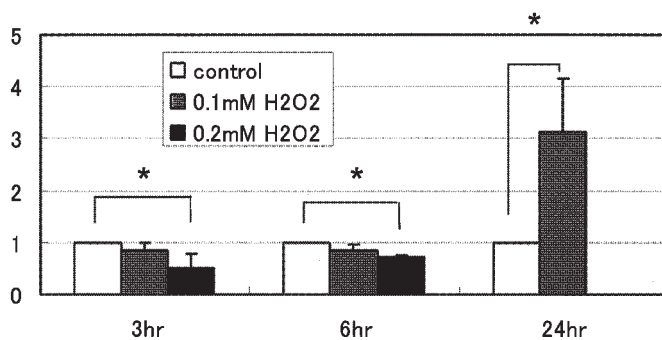


Fig. 3. Changes in expression of *inv* mRNA in mIMCD-3 cell

Expression of *inv* mRNA was analyzed by semi-quantitative real-time PCR, as described in the method. Values are means \pm SEM percentage changes in expression of mRNA. $n=4$. * $p < 0.05$ vs. control group.

後6時間で、sham群と比較してIRI群で有意に発現の低下を認めた(sham vs. IRI: 0.71 ± 0.26 vs. 0.28 ± 0.15 , $p < 0.05$)。IRI群ではIRI後6時間でmRNAの発現が最も減弱したが、その後徐々に発現が回復し、240時間で 1.86 ± 0.58 と発現が増強していた。

2. mIMCD-3細胞におけるH₂O₂負荷での*inv* mRNAの発現変化(Fig. 3)

H₂O₂負荷でのmIMCD-3細胞における*inv* mRNAの発現の変化を検討した。H₂O₂負荷後3時間、6時間でコントロール群と比較して0.2 mMのH₂O₂負荷群でそれぞれ 0.52 ± 0.26 ($p < 0.05$), 0.73 ± 0.03 ($p < 0.05$)と有意に発現の低下を認めた。H₂O₂負荷後24時間では0.2 mMのH₂O₂負荷群では細胞が全滅したが、0.1 mMのH₂O₂負荷群ではコントロール群と比較して 3.13 ± 1.02 ($p < 0.05$)と有意に発現が増強していた。

3. RNAiによる*inv*発現抑制下のmIMCD-3細胞の変化

A. 光学顕微鏡的所見(Fig. 4A)および細胞数の変化(Fig. 4B)

inv-siRNAおよびコントロールsiRNAを各々遺伝子導入したmIMCD-3細胞の形態を光学顕微鏡にて比較した。

遺伝子導入後12時間は2群間で細胞の密集度の相違は認めなかった。遺伝子導入後48時間においてはコントロールsiRNAを導入したmIMCD-3細胞に比較して、*inv*-siRNAでは細胞-細胞間の接合が消失し、細胞の球状化、密集程度の低下が観察された(Fig. 4A c, f)。実測した細胞数でも、遺伝子導入後48時間において*inv*-siRNAで細胞数の減少が認められた(Fig. 4B)。

B. mIMCD-3細胞におけるsiRNA導入後の*inv* mRNAの発現変化(Fig. 5)

inv-siRNAおよびコントロールsiRNAを各々遺伝子導入したmIMCD-3細胞での*inv* mRNAの発現の変化を比較した。遺伝子導入後12時間からコントロールに比較して*inv*-siRNA導入群で0.55と発現量が低下し、遺伝子導入後36時間もコントロールに比較して50%以下の発現であった($p < 0.05$)。

C. RNAiによる*inv*発現抑制下のmIMCD-3細胞における遺伝子の発現プロフィールの変化

inv-siRNAおよびコントロールsiRNAを各々遺伝子導入後36時間のmIMCD-3細胞で、real-time PCR法を用いて定量比較した。有意に発現の変化が認められた遺伝子群をTable 2および3に示した。発現の亢進を認めた群に

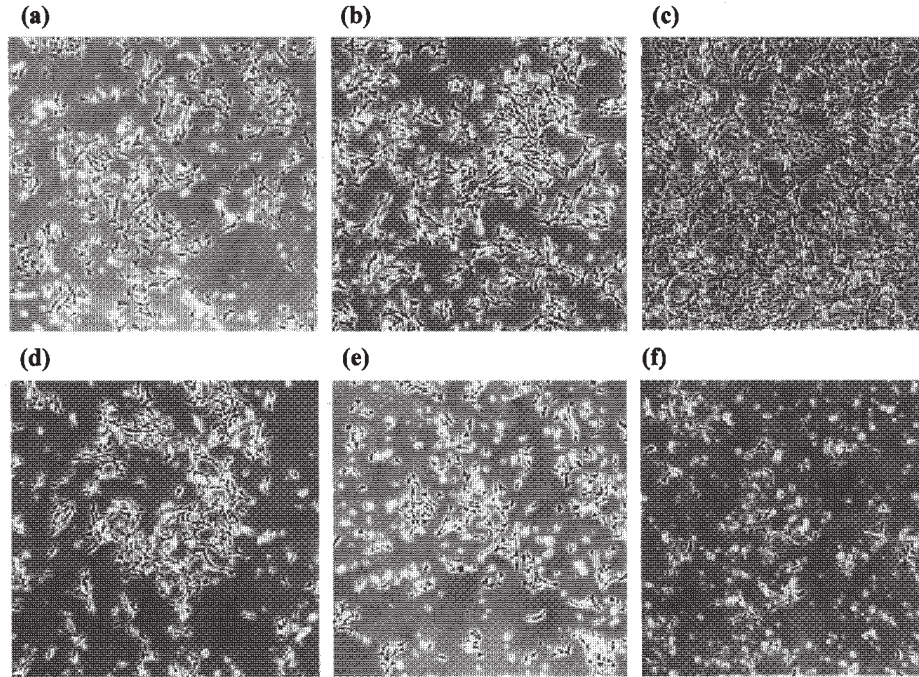


Fig. 4A. Light microscopic findings of mIMCD-3 cell after transfection with siRNA (a) at 12 hours, (b) at 24 hours, (c) at 48 hours after transfection with control siRNA, (d) at 12 hours, (e) at 24 hours, (f) at 48 hours after transfection with *inv*-siRNA.

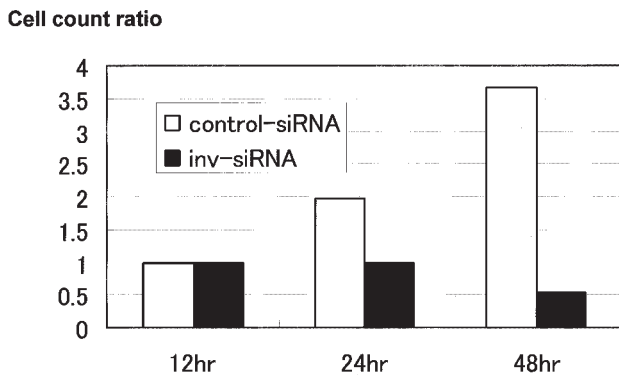


Fig. 4B. Changes in cell count ratio after transfection with siRNA

は, metalloproteinase(Mmp)8, tenascin R(Tnr), selectin E および bone morphogenetic protein(Bmp)5 などがみられた。また, 発現が抑制された群には, talin, β -catenine, N-cadherin, type IV collagen(col 4 a1) および actin などの骨格蛋白群が含まれていた。アポトーシス関連の遺伝子群では, 有意な発現の変化を認めなかった。

考 察

生物の形態形成において, 体軸の決定は幾つかの遺伝子群のカスケードによってなされることが明らかにされてお

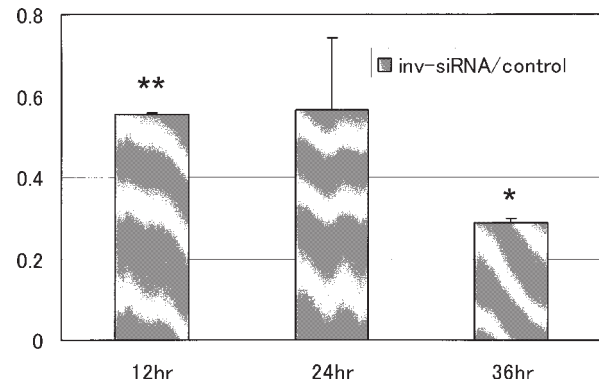


Fig. 5. Effect of RNAi on the expression of *inv* mRNA in mIMCD-3 cells

Expression of *inv* mRNA was analyzed by semi-quantitative real-time PCR, as described in method.

Values are means \pm SEM percentage changes in expression of mRNA. n=4. **p<0.01, *p<0.05 vs. the control siRNA group.

り¹²⁾, *nodal* や *lefty* など多くの遺伝子群が関与する。*inv* はこのカスケードの上流に位置することが知られており, マウスおよびヒトでの遺伝子配列がわれわれの報告を含めて明らかにされている^{1,10,13)}。

従来, 遺伝子配列が決定されても, その発現する蛋白の機能が解明されるのには, さらに次の過程が必要とされる。ノックアウトマウスの作製や発現実験などの, 分子生

Table 2. Genes up-regulated at 36 hours in response to transfection with *inv*-siRNA when compared to transfection with control siRNA in mIMCD-3 cell

Symbol	Accession No.	Definition	Forward Primer	Reverse Primer	Ratio
Mmp8	NM_008611	Mus musculus matrix metalloproteinase 8	aattccggtcttcgaggaat	agcgtgcatctctttaaagc	4.6
Tnr	NM_022312	Mus musculus tenascin R	cagcgatgtgacgtccttta	actctcccagggtttagc	3.9
Selectin E	M87862	Mus musculus E-selectin protein	aacgccagaacaacaattcc	tttcatccaggcgcttagact	3.1
Bmp5	NM_007555	Mus musculus bone morphogenetic protein 5	aaggctacggaacctgaga	ctgtgaggcaaacccaaat	2.6
Mmp3	NM_010809	Mus musculus matrix metalloproteinase 3	ctcttcacaccccttcttc	ttcgtgtcccactttctca	2.3
Mmp2	NM_008610	Mus musculus matrix metalloproteinase 2	ccagatcacctgaccacctt	tgcatgtgagtggaactg	2.1
Bmp7	NM_007557	Mus musculus bone morphogenetic protein 7	aagacgcaaaagaaccaaga	tctggtcactgctgtgtt	1.9

Values of ratio are means of four individual experiments.

Table 3. Genes down-regulated at 36 hours in response to transfection with *inv*-siRNA when compared to transfection with control siRNA in mIMCD-3 cell

Symbol	Accession No.	Definition	Forward Primer	Reverse Primer	Ratio
Talin	NM_011602	Mus musculus talin	tgtagatgatgaccccaaa	cccatttcggagcatgtagt	0.15
b-Catenin	NM_007614	Mus musculus catenin beta	cttgctgaacctcacaga	tgtagctcaggaaattgcac	0.15
b-Actin	NM_007393	Mus musculus actin, beta, cytoplasmic	ccctgaagtaccctattgaa	ctttcactggtggccttag	0.21
a-Catenin	X59990	M. musculus alpha-catenin gene	cgcaggcaacataaacttca	tcaacagatgcagccaaaac	0.22
n-Cadherin	AB008811	Mus musculus mRNA for N-cadherin	caggaaaagtggcagtagc	cactggtcttgcaagttgt	0.22
Col4a1	M15832	Mouse alpha-1 collagen type IV	cgctcaaggaacgactact	aaccgcacacctgtaatg	0.26
a-Actin	M12233	Mouse skeletal muscle alpha-actin	aagtgcagatcgacatcag	atccatctgctggaaggt	0.34
Thbs1	M87276	Mouse thrombospondin 1	cttgtcgtgccaagtgtga	atgccatttcactgtagcc	0.36

Values of ratio are means of four individual experiments.

物学上の手法で解明が試みられるのが常であり、アプローチされる。*inv* は、本来その発見が insertional mutation により発生したマウスからクローニングされたため、ホモ欠損マウスの表現型において、situs inversus に加えて、心臓や腸の回転異常、胆道閉鎖、腎、膵臓の多発性の嚢胞形成などが観察された。このことは、*inv* の働きが左右軸の決定のみならず形態形成にも関与することを示唆するものであった。*inv* を責任遺伝子とする蛋白である *inversin* はその構造において、アンキリンモチーフを有している。アンキリンは通常、スペクトリン binding domain を有し、細胞骨格として働くことが多い¹⁴⁾。*inversin* はアンキリンモチーフの繰り返しは 15~16 個と少なく、スペクトリン binding domain もないが、C 末端側のこの構造上の特徴、また、マウスの *in situ* hybridization では、皮質から髄質にかけて尿細管および集合管の細胞質でのシグナルが同定されている点(未発表データ)など細胞骨格に関わる可能性が高い¹⁵⁾。しかしながら、*inv* の細胞生物学的な働きには依然として不明な点が多い。

本研究では、*inv* の発現に影響を及ぼす因子と関連する遺伝子群の検索を行った。*inv* の腎臓における局在に關す

る詳細な報告はないが、*inv* のホモ欠損マウスにおける検討から¹⁾、遠位尿細管および集合管における発現が予測されたため、*in vitro* の実験においては mIMCD-3 細胞を使用した。また、虚血再還流腎による主な障害部位は近位尿細管 S3 部位であるが、遠位尿細管および集合管への影響もあるため、*inv* の発現を検討する *in vivo* の実験として行った。まず、*inv* の発現調節に関わる因子についての検討では、虚血再還流腎での *inv* mRNA の経時的発現を観察した。虚血後 6 時間の早期から有意に発現は低下し、3 日後まで低下が確認され、次第に回復して 10 日後にはコントロールを凌駕して過剰発現となった。*in vitro* の検討においても、酸化ストレスの負荷により 3 時間、6 時間後に有意に *inv* の発現が低下し、24 時間後にはコントロールを凌駕して過剰発現となることが確認された。このことより、*inv* は酸化ストレスによる組織、細胞の障害に対していったんは発現が低下するが、その後発現が亢進しており、修復過程に関与している可能性が推測された。

in vivo においては、ノックアウトマウスの作製はその遺伝子の機能解析に有用な手段であるが、細胞レベルでの検討には RNAi が最近注目されている。本法は、二本鎖

RNA が trigger となって配列特異的に mRNA が分解される機序によって、目的とする遺伝子の発現を抑制するため、遺伝子の機能解析に有効である¹⁶⁾。本法では、その導入遺伝子サイズが小さいことや、薬剤のような他の過程への影響が少ないとされており、より生理的な状況下での作用を検討できる利点がある。実際に導入した細胞での形態上の変化では、48時間後において *inv*-siRNA を導入した細胞では細胞形態の変化と密集度および細胞数の低下が観察された (Fig. 4A, 4B)。内在の *inv* mRNA の発現を real-time PCR で確認すると有意に低下しており (Fig. 5)、実際の RNA の発現が抑制された状態であると考えられた。

さらに、RNAi による *inv* 遺伝子抑制下での他の遺伝子群の発現への影響を検討した。最近では、gene chip などによる網羅的な発現遺伝子のスクリーニングが技術的に可能ではあるが、検索した遺伝子の評価、発現レベルの絶対的な変化の判定はかならずしも容易ではない。今回は、関連すると推測される細胞骨格、基質、アポトーシス関連などの既知の遺伝子群にあらかじめ焦点を絞って primer set を設定し、各遺伝子発現を real-time PCR で検討した。real-time PCR 法は、従来の PCR base の mRNA 発現量の測定法に比して信頼性が高く、また手技的にも容易となっている。結果に記したように、*inv* 遺伝子抑制下において、*mmp*, *bmp* など細胞の修復にかかわる遺伝子の有意な増加があり、細胞骨格、細胞外マトリックス関連遺伝子の減少がみられた¹⁷⁾。Nurnberger らは、*inversin* が細胞の junction 部、および核、核周囲に局在することを免疫染色によって報告している¹⁸⁾。さらに、 β -catenin, N-cadherin との相互作用が指摘されており、細胞内成分の骨格もしくは情報伝達への関与が推測される。今回の実験でも *inv* の発現低下時に β -catenin, N-cadherin の遺伝子発現の低下が確認された。これに反して、IRI で重要な病態を担うアポトーシスの直接的な関連遺伝子群には変化が乏しかった。

inv 遺伝子と形態形成への関わりについては、最近幾つかの報告がみられる。左右軸の決定に関しては、発生期の神経 node に存在する cilia の回転異常が軸索流の停滞を促し、サイトカイン物質の体軸の左側への流れが障害され、カスケードの下流に発現する *lefty* や *nodal* などの遺伝子発現の左側への局在が障害される可能性が指摘されている。しかし、*inv* のノックアウトマウスでは node の cilia の動きは緩慢ではあるが、停止はしておらず、この軸索流の障害のみでは説明ができない¹⁹⁻²¹⁾。一方、腎臓の嚢胞形

成との関連については、ヒト *inv* 遺伝子変異が nephronophthisis (NPHP) という幼少児の常染色体劣性遺伝の嚢胞性腎疾患で報告された⁹⁾。*inversin* は β -tubulin, NPHP1 の蛋白である nephrocystin²²⁾ とともに尿細管細胞の cilia の構成成分として局在していることが指摘されており、*inversin* の cilia の機能を介する嚢胞形成への関与が推測される。実際に嚢胞が形成される機序については、この cilia の機能異常から、細胞内シグナル伝達、細胞外もしくは細胞間環境の変化が複雑に組み合わさった結果と考えるのが、現在、妥当であると考えられている²³⁾。

今回の結果でも、*inv* 遺伝子の抑制は、培養細胞レベルで形態の変化や発現遺伝子プロファイルが変動した。今後、*inversin* の機能解析は、体軸や器官形成の機序の解明のみならず、上皮細胞を中心とした細胞レベルでの役割を明らかにしていくものと考えられる。

結 論

酸化ストレスによる *inv* の発現変化を *in vivo* および *in vitro* の系から検討を行った。虚血再還流腎において *inv* の発現は初期に低下し、徐々に発現の増強を認めた。同様の経時的な *inv* の発現変化を mIMCD-3 細胞の H₂O₂ 負荷においても認めた。以上のことから、組織および細胞障害により *inv* の発現は最初抑制されるが、その後増強し、傷害された腎の修復過程において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、培養細胞での、RNAi による目標遺伝子 mRNA の抑制で、細胞形態の変化が誘導され、発現遺伝子プロファイルにても細胞増殖や細胞骨格形成に関与する遺伝子群の発現量に変化が生じ、*inv* 蛋白の機能を示唆する結果であった。

謝 辞

本研究の遂行にご協力いただいた坪井真由子、寺岡敦子研究補助員に感謝いたします。

本研究の費用の一部は日本学術振興会科学研究費基盤研究(C) (15590862, 土谷 健) による。なお、本研究の一部はアメリカ腎臓学会, San Diego 11/12~17, 2003 において発表した。

文 献

1. Mochizuki T, Saijoh Y, Tsuchiya K, Shirayoshi Y, Takai S, Taya C, Yonekawa H, Yamada K, Nihei H, Nakatsuji N, Overbeek PA, Hamada H, Yokoyama T. Cloning of *inv*, a

- gene that controls left/right asymmetry and kidney development. *Nature* 1998 ; 395 : 177-181.
2. Yokoyama T, Copeland NG, Jenkins NA. Reversal of left-right asymmetry : a situs inversus mutation. *Science* 1993 ; 260 : 679-681.
 3. The International Polycystic Kidney Disease Consortium. Polycystic kidney disease : The complete structure of the PKD1 gene and its protein. *Cell* 1995 ; 81 : 289-298.
 4. Burn TC, Connors TD, Dackowski WR, Petry LR, Van Raay TJ, Miliholland JM, Venet M, Miller G, Hakim RM, Landes GM, Klinger KW, Qian F, Onuchic LF, Watnick T, Germino GG, Doggett NA. Analysis of the genomic sequence for the autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD1) gene predicts the presence of a leucine-rich repeat. *Hum Mol Genet* 1995 ; 4 : 575-582.
 5. Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, Xenophontos SL, Veldhuisen B, Saris JJ, Reynolds DM, Cai Y, Gabow PA, Pierides A, Kimberling WJ, Breuning MH, Constantinou Deltas C, Peters DJM, Somlo S. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 1996 ; 272 : 1339-1342.
 6. Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 1993 ; 75 : 229-240.
 7. Taulman PD, Haycraft CJ, Balkovetz DF, Yoder BK. Polaris, a protein involved in left-right axis patterning, localized to basal bodies and cilia. *Mol Biol Cell* 2001 ; 12 : 589-599.
 8. Pennekamp P, Karcher C, Fischer A, Schweickert A, Skryabin B, Horst J, Blum M, Dworniczak B. The ion channel polycystin-2 is required for left-right axis determination in mice. *Curr Biol* 2002 ; 12 : 938-943.
 9. Otto EA, Schermer B, Obara T, O'Toole JF, Hiller KS, Mueller AM, Ruf RG, Hoefele J, Beekmann F, Landau D, Foreman JW, Goodship JA, Strachan T, Kispert A, Wolf MT, Gagnadoux MF, Nivet H, Antignac C, Walz G, Drummond IA, Benzing T, Hildebrandt F. Mutations in INVS encoding inversin cause nephronophthisis type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination. *Nature Genet* 2003 ; 34 : 413-420.
 10. Morgan D, Turnpenny L, Goodship J, Dai W, Majumder K, Matthews L, Gardner A, Schuster G, Vien L, Harrison W, Elder FF, Penman-Splitt M, Overbeek P, Strachan T. Inversin, a novel gene in the vertebrate left-right axis pathway, is partially deleted in the *inv* mouse. *Nat Genet* 1998 ; 20 : 149-156.
 11. Rauchman MI, Nigam SK, Delpire E, Gullans SR. An osmotically tolerant inner medullary collecting duct cell line from an SV40 transgenic mouse. *Am J Physiol* 1993 ; 265 : F416-424.
 12. Mercola M. Left-right asymmetry determination in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001 ; 17 : 779-805.
 13. Schon P, Tsuchiya K, Lenoir D, Mochizuki T, Guichard C, Takai S, Maiti AK, Nihei H, Weil J, Yokoyama T, Bouvagnet P. Identification, genomic organization, chromosomal mapping and mutation analysis of the human INV gene, the ortholog of a murine gene implicated in left-right axis development and biliary atresia. *Hum Genet* 2002 ; 110 : 157-165.
 14. Peter LL, Lux SE. Ankyrins : Structure and function in normal cells and hereditary spherocytes. *Semin Hematol* 1993 ; 30 : 85-118.
 15. Morgan D, Goodship J, Essner JJ, Vogan KJ, Turnpenny L, Yost HJ, Tabin CJ, Strachan T. The left-right determinant inversin has highly conserved ankyrin repeat and IQ domains and interacts with calmodulin. *Hum Genet* 2002 ; 110 : 377-384.
 16. Tabara H, Grishok A, Mello CC. RNAi in *C. elegans* : soaking in the genome sequence. *Science* 1998 ; 282 : 430-431.
 17. Basile DP, Fredrich K, Weihrauch D, Hattan N, Chillan WM. Angiostatin and matrix metalloprotease expression following ischemic acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004 ; 286 : F893-902.
 18. Nurnberger J, Bacallao RL, Phillips CL. Inversin forms a complex with catenins and N-cadherin in polarized epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2002 ; 13 : 3096-3106.
 19. Okada Y, Nonaka S, Tanaka Y, Saijoh Y, Hamada H, Hirokawa N. Abnormal nodal flow precedes situs inversus in *iv* and *inv* mice. *Mol Cell* 1999 ; 4 : 459-468.
 20. Nonaka S, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S, Harada A, Kanai Y, Kido M, Hirokawa N. Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extra embryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* 1998 ; 95 : 829-837.
 21. Watanabe D, Saijoh Y, Nonaka S, Sasaki G, Ikawa Y, Yokoyama T, Hamada H. The left-right determinant inversin is a component of node monocilia and other 9+0 cilia. *Development* 2003 ; 130 : 1725-1734.
 22. Hildebrandt F, Otto E, Rensing C, Nothwang HG, Vollmer M, Adolphs J, Hanusch H, Brandis M. A novel gene encoding an SH3 domain protein is mutated in nephronophthisis type 1. *Nat Genet* 1997 ; 17 : 149-153.
 23. Morgan D, Eley L, Sayer J, Strachan T, Yates LM, Craighhead AS, Goodship JA. Expression analyses and interaction with the anaphase promoting complex protein Apc2 suggest a role for inversin in primary cilia and involvement in the cell cycle. *Hum Mol Genet* 2002 ; 11 : 3345-3350.