

# Sfrp1 遺伝子は急性腎不全において腎線維化の進行を制御している

Secreted Frizzled-related protein 1 regulates the progression of renal fibrosis  
in a mouse model of obstructive nephropathy

松山 誠

Makoto Matsuyama

重井医学研究所 分子遺伝部門

Division of Molecular Genetics, Shigei Medical Research Institute

## ABSTRACT

Renal fibrosis is responsible for progressive renal diseases that cause chronic renal failure. Secreted Frizzled-related protein 1 (Sfrp1) is highly expressed in kidney, although little is known about connection between the protein and renal diseases. Here we focused on Sfrp1 to investigate its roles in renal fibrosis using a mouse model of unilateral ureteral obstruction (UUO). In wild-type mice, the expression of Sfrp1 protein was markedly increased after UUO. The kidneys from *Sfrp1* knockout mice showed significant increase in expression of myofibroblast markers, alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA). *Sfrp1* deficiency also increased protein levels of the fibroblast genes, Vimentin, and decreased those of the epithelial genes, E-cadherin, indicated that enhanced epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). There was no difference in the levels of canonical Wnt signaling; rather the levels of phosphorylated c-Jun and JNK were more increased in the *Sfrp1*<sup>-/-</sup> obstructed kidney. Moreover, the apoptotic cell population was significantly elevated in the obstructed kidneys from *Sfrp1*<sup>-/-</sup> mice following UUO, but was slightly increased in those from wild-type mice. These results indicate that Sfrp1 is required for inhibition of renal damage through non-canonical Wnt/PCP pathway.

## はじめに

日本の腎不全による透析患者は、約30万人とも言われている。透析患者の増加は、莫大な医療費を国が負担することになり、社会的な問題となっている。腎不全の発症の機序を理解し、早期の治療につなげる事が期待されている。

腎不全にいたる過程は腎臓の線維化というプロセスをとり、線維化と腎予後が深く関連する。そのことから、腎線維化が腎不全の治療に値する標的として考えられている。これまで、腎線維化は上皮間葉転換 (EMT) によって起きることが示唆されており、EMT に関する遺伝子として、Wnt や Tgf/ $\beta$  などの増殖因子の関与が明らかになっている (1, 2)。

細胞間のシグナル分子の調節は、形態形成・細胞分化・細胞の機能維持などの制御に不可欠である。Wnt はさまざまなシグナル伝達経路を作動させる。しかし、このシグナルが異常をきたすと、発生異常やがんを引き起こす (3)。一方、Sfrp 分子は直接 Wnt に結合し、Wnt シグナルを阻害する分泌性因子と考えられている (4)。Sfrp 分子種の中でも、Sfrp1, Sfrp2, Sfrp5 はアミノ酸配列の上で相同性が高く、サブ・グループ (Sfrp1 サブ・ファミリー) を構成している (5)。Sfrp1 は、腎臓に強い発現が見られるが、腎臓における Sfrp1 の機能はほとんどわかっていない (6)。そこで本研究では、Sfrp 関連遺伝子 Sfrp1 の腎臓における役割を明らかにすることを目的とした。

## 材料と方法

### 1. 実験動物

C57BL/6 マウスと Sfrp1 欠損マウスを用いた。

片側尿管結紮 (UUO ; 図 1A) はマウスの左側の尿細管を外科的に結紮後、切断した。その後、7 日目に右側 (Sham) と左側 (UUO) の腎臓を摘出して、以下の解析を行った。

### 2. モノクローナル抗体の作製

マウス Sfrp1 リコンビナントタンパクは、pET-28a ベクターと BL21 (codonRP) 株大腸菌を用いて作製した。Sfrp1 マウスモノクローナル抗体は、文献にしたがって作製した (7)。

### 3. マウス腎臓の免疫染色

採取した腎臓は、4%パラホルムアルデヒド溶液を用い1晩4°Cで固定した。固定後、パラフィンブロックを作製し、3 $\mu$ mの厚さで切片を作製した。作製した切片は、過酸化水素水処理 (0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/MeOH; 室温 30分)・クエン酸処理 (1mM クエン酸 (pH=6.0); マイクロウェーブ 15分)・ブロッキング (5%血清/TBST; 室温 30分)を行った後、1次抗体 (SMA, Vimentin, E-cadherin) を1晩4°Cで反応させた。洗浄後、二次抗体を室温1時間で反応させたのち、DABを用いて発色反応を行った。

## 結果

### 1. Sfrp1 モノクローナル抗体を用いた腎臓における Sfrp1 タンパクの解析

はじめに、Sfrp1 リコンビナントタンパクを用いて、Sfrp1 モノクローナル抗体を作製した。作製した今回作成した Sfrp1 モノクローナル抗体は、他の Sfrp タンパクには反応しない抗体であ

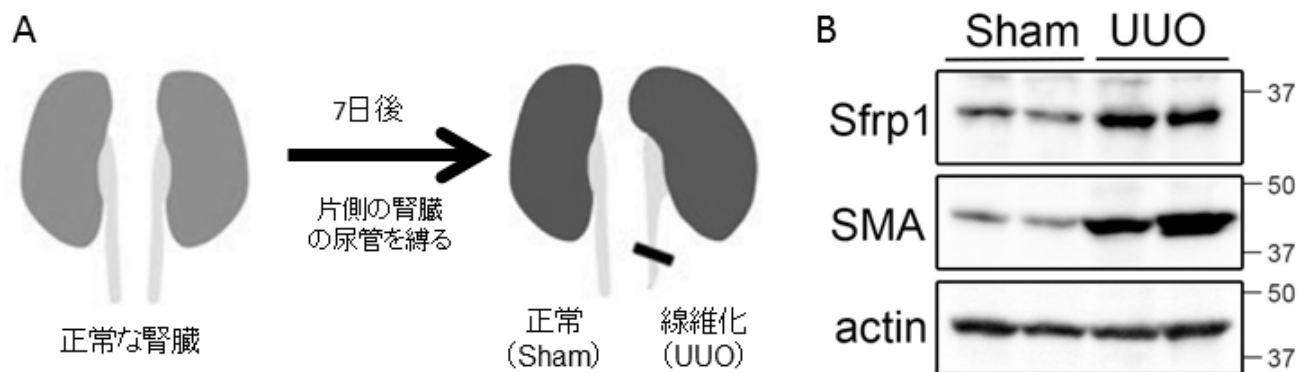


図1 腎不全時 *Sfrp1* 遺伝子が増加する

(A) 片側尿管結紮 (UUO) を用いた腎不全の模式図 (B) 腎不全時における *Sfrp1* タンパクの挙動

った。片側尿管結紮 (UUO) を施したマウスを用いて、腎臓における *Sfrp1* タンパクの量を検討したところ、腎不全を起こさせない腎臓に比べ、腎不全を起こさせた腎臓では、有意に *Sfrp1* タンパクの発現量の増加が認められた (図1B)。以上の結果から、*Sfrp1* が腎線維化時に何らかの役割を果たしていることが示唆された。

## 2. *Sfrp1* ノックアウトマウスを用いた腎不全における *Sfrp1* の機能解析

最初に正常時における野生型と *Sfrp1* ノックアウトマウスの腎臓を比較したところ、ほとんど違いが見られなかった。次に、急性腎不全における *Sfrp1* の役割を解析するために、*Sfrp1* ノックアウトマウスを用いて片側尿管結紮 (UUO) を行った。UUO によって腎不全を起こさせた時、野生型と比べ *Sfrp1* が欠損したマウスでは、腎不全の特徴である上皮の線維化が重篤化していることが明らかになった (図2)。これらの結果から、*Sfrp1* は腎線維化の修復を制御している事が強く示唆された。

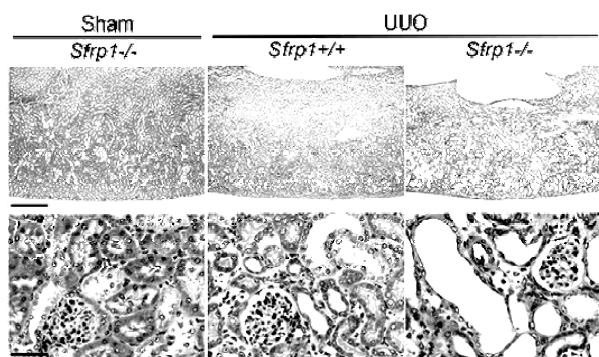


図2 *Sfrp1* の欠損したマウスは腎不全の症状が重くなる。  
*Sfrp1* ノックアウトマウスの正常な腎臓 (左: Sham-*Sfrp1*) と腎不全時の野生型 (中央: UUO-*Sfrp1*) と *Sfrp1* ノックアウトマウス (右: UUO-*Sfrp1*) の腎臓  
スケールバー: 500 $\mu$ m (上), 50 $\mu$ m (下)

## 3. *Sfrp1* は EMT を介した腎線維化に関与する

腎不全時において *Sfrp1* の欠損が線維化を悪化させることから、腎不全時における *Sfrp1* ノックアウトマウスの線維化の状況を、上皮間葉転換 (EMT) の遺伝子マーカーを用いて検討した。その結果、線維化のマーカーである SMA や間質細胞のマーカーである Vimentin が、野生型と比べ *Sfrp1* が欠損したマウスの腎臓では増加していることが分かった。逆に、上皮のマーカーである E-cadherin は減少していた。

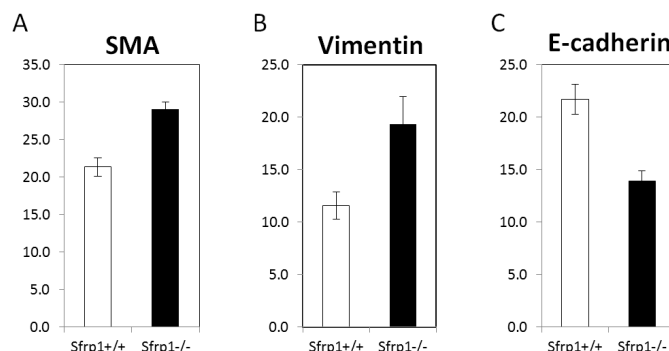


図3 *Sfrp1* は EMT を介した腎線維化に関与する  
(A-C) 腎不全時における野生型 (*Sfrp1*<sup>+/+</sup>) と *Sfrp1* ノックアウトマウス (*Sfrp1*<sup>-/-</sup>) におけるタンパク量の比較 (A) SMA, (B) Vimentin, (C) E-cadherin で腎臓の切片を免疫染色後、陽性の領域をパーセンテージで表した。有意差:  $P < 0.05$

以上の結果から、腎不全時における *Sfrp1* の欠損により、EMT が亢進していることが示唆された。

## 考察

*Sfrp* 関連遺伝子は、以前からシグナルの抑制因子という観点から重要性が認識されていた。たとえば過去の筆者らの研究による *Sfrp* 遺伝子変異マウスの解析から、初期発生 (8, 9), 腸管形成 (10, 11) などに重要であることが示されている。しかし、*Sfrp* 分子は分泌性の因子であり技術的な困難を伴うことから、病態との関連に関する研究が遅れていた。しかし近年、*Sfrp5* が肥満に伴う

代謝異常の病態解明に関する新たな標的分子になりうることを示された(12). また, 腎臓癌をはじめとする主要ながんにおいて, Sfrp1 の関連性が指摘され, 新しいがん標的薬として脚光を浴びている(13). 今回の研究も含め, 今後も Sfrp 遺伝子と病態との関連の解明がより一層進んでいくことが期待される.

今回の研究から, Sfrp1 遺伝子が急性腎不全時において重要な役割を果たしていることが強く示唆された. 今後, 本研究のような腎臓病の研究が発展すれば, 透析を必要とする患者が減少, もしくは透析回数を減らすことができる可能性があり, 医療に貢献できると思われる. 最終的には, Sfrp1 が腎臓病に対する治療薬の新規標的候補になることを想定し研究を進めているところである.

## 要 約

Sfrp 分子は直接 Wnt に結合し, Wnt シグナルを阻害する分泌性因子と考えられている. 本研究では Sfrp サブファミリーの中でも腎臓に強い発現が見られる Sfrp1 に注目して, マウス成獣の腎臓における役割を明らかにすることにした. 片側尿管結紮 (UUO) を施したマウスを用いて, 腎臓における Sfrp1 タンパクの量を検討したところ, 腎不全を起こさせない腎臓に比べ, 腎不全を起こさせた腎臓では, 有意に Sfrp1 タンパクの発現量の増加が認められた. 次に, UUO により腎不全を起こさせた時, 野生型と比べ Sfrp1 が欠損したマウスでは腎不全の特徴である上皮の線維化が重篤化していた. また, UUO を施した Sfrp1 ノックアウトマウスでは, 線維化のマーカーである SMA や間質のマーカーである Vimentin の発現量が増加し, 上皮のマーカーである E-cadherin の発現量が減少していた. 以上の結果から, 腎不全時において Sfrp1 が腎臓の修復において必要な役割をしていることが示唆される. 現在, Sfrp1 が腎臓病に対する治療薬の新規標的候補になることを想定し研究を進めているところである.

## 文 献

- Boor, P., Ostendorf, T., and Floege, J. (2010) Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets. *Nat Rev Nephrol* **6**, 643-656
- Kawakami, T., Ren, S., and Duffield, J. S. (2013) Wnt signalling in kidney diseases: dual roles in renal injury and repair. *J Pathol* **229**, 221-231
- Clevers, H. (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**, 469-480
- Kawano, Y., and Kypta, R. (2003) Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* **116**, 2627-2634
- Cruciat, C. M., and Niehrs, C. (2013) Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a015081
- Trevant, B., Gaur, T., Hussain, S., Symons, J., Komm, B. S., Bodine, P. V., Stein, G. S., and Lian, J. B. (2008) Expression of secreted frizzled related protein 1, a Wnt antagonist, in brain, kidney, and skeleton is dispensable for normal embryonic development. *J Cell Physiol* **217**, 113-126
- Sado, Y., Inoue, S., Tomono, Y., and Omori, H. (2006) Lymphocytes from enlarged iliac lymph nodes as fusion partners for the production of monoclonal antibodies after a single tail base immunization attempt. *Acta Histochem Cytochem* **39**, 89-94
- Satoh, W., Gotoh, T., Tsunematsu, Y., Aizawa, S., and Shimono, A. (2006) Sfrp1 and Sfrp2 regulate anteroposterior axis elongation and somite segmentation during mouse embryogenesis. *Development* **133**, 989-999
- Satoh, W., Matsuyama, M., Takemura, H., Aizawa, S., and Shimono, A. (2008) Sfrp1, Sfrp2, and Sfrp5 regulate the Wnt/beta-catenin and the planar cell polarity pathways during early trunk formation in mouse. *Genesis* **46**, 92-103
- Matsuyama, M., Aizawa, S., and Shimono, A. (2009) Sfrp controls apicobasal polarity and oriented cell division in developing gut epithelium. *PLoS Genet* **5**, e1000427
- Matsuyama, M., and Shimono, A. (2012) The embryonic mouse gut tube as a model for analysis of epithelial polarity. *Methods Mol Biol* **839**, 229-237
- Ouchi, N., Higuchi, A., Ohashi, K., Oshima, Y., Gokce, N., Shibata, R., Akasaki, Y., Shimono, A., and Walsh, K. (2010) Sfrp5 is an anti-inflammatory adipokine that modulates metabolic dysfunction in obesity. *Science* **329**, 454-457
- Cooper, S. J., von Roemeling, C. A., Kang, K.H., Marlow, L. A., Grebe, S. K., Menefee, M.E., Tun, H.W., Colon-Otero, G., Perez, E. A., and Copland, J. A. (2012) Reexpression of tumor suppressor, sFRP1, leads to antitumor synergy of combined HDAC and methyltransferase inhibitors in chemoresistant cancers. *Mol Cancer Ther* **11**, 2105-2115