

遺伝学的アプローチに基づく塩分負荷と心血管病発症をつなぐ 新規分子シグナルの解明

大原 浩貴

島根大学医学部病理学講座病態病理学

概要 脳卒中易発症高血圧自然発症ラット(Stroke-prone spontaneously hypertensive rat; SHRSP)は、現在使用されている降圧剤開発などにも広く用いられてきたヒト本態性高血圧モデルである。遺伝的に重症高血圧と脳卒中を自然発症するため、これら心血管病の発症に遺伝的素因が存在することを強く示唆する存在であるが、その原因遺伝子は明らかでない。

我々は独自に、第1および18染色体の2つの染色体領域に、SHRSPの食塩誘発性脳卒中への感受性を決める原因遺伝子の存在を見出してきた。SHRSPは食塩感受性を示す高血圧モデルであり、塩分負荷により脳卒中発症が劇的に早まる。脳卒中発症に至るには腎障害の亢進が重要と考え、本研究では、有力な候補遺伝子の一つであるE3 ユビキチンリガーゼCBLCに焦点を当て、ラット腎尿細管上皮細胞株NRK-52EにおけるTGF- β 1誘導性の線維性変化におけるCBLCの病態生理学的役割について検討した。

NRK-52EをTGF- β 1(10 ng/mL)存在下で3日間培養することで、線維化マーカーの一つである*Colla1*のmRNAおよびタンパク質発現は顕著に増加したが、*Cblc*に対するsiRNAを導入すると、mRNAレベルには影響しないものの、COL1A1のタンパク質発現増加は抑制された。TGF- β 1刺激は α -SMAのタンパク質量も増大させたが、COL1A1とは異なり、*Cblc* siRNAを導入しても α -SMAタンパク質量に変化は見られなかった。

本研究結果から、CBLCは尿細管上皮細胞におけるコラーゲン産生量を制御する因子として働くことが推測された。SHRSPではCBLC活性が高く、それにより腎線維化をもたらすコラーゲン過剰産生が促進され、腎機能が遺伝的に傷害されやすくなっている可能性がある。

1. 研究目的

1950~70年代頃の日本人の死因の第1位は、脳血管障害であった。栄養条件の改善や優れた降圧剤開発などによりその死亡率は大きく減少したが、現在でも第4位に位置する医学的に重要な疾患である。大規模なゲノムワイド関連解析(GWAS)によりヒト脳卒中の原因遺伝子領域についてのゲノムマッピングも行われているが、病態への直接的関与を実証するためには、同定された原因候補遺伝子の機能的意義を評価するモデル系が必要である。

脳卒中易発症高血圧自然発症ラット(Stroke-prone spontaneously hypertensive rat; SHRSP)は、重症の高血圧と脳卒中を遺伝的に自然発症する、優れたヒト本態性

高血圧の疾患モデルである。SHRSPは、京都大学で維持されていたWistar系クローズドコロニーの中から、高血圧を指標とした近親交配により遺伝性高血圧モデルとして確立されたSHRを起源とする。SHRの中で、脳卒中により死亡した親からの仔を選択的に交配することで確立された亜系統の一つであり、脳出血とラクナ梗塞を主体とする脳血管障害を併発するユニークな心血管病モデル動物である。

SHRSPはSHRを起源とし、その遺伝的背景が極めて近いと考えられることから、我々の研究室では両系統の遺伝学的解析を通じてSHRSPにおける脳卒中原因遺伝子の同定を試みてきた。まず、SHRSPとSHRのF2交雑群

を対象に、脳卒中感受性を指標とする量的形質遺伝子座 (Quantitative trait locus; QTL) 解析を行った。この結果、SHRSP の第 1 および 18 染色体に、食塩負荷条件下における主要な脳卒中関連 QTL が存在することがわかった⁽¹⁾。また、この QTL 領域を親系統 (SHRSP, SHR) の間で相互に交換した「コンジュニック系統」を作成し、脳卒中感受性試験を行うことで、QTL 領域の遺伝子型が「SHRSP 型」か「SHR 型」かによって脳卒中感受性が大きく増減することを示した⁽¹⁾。

最近、①脳卒中 QTL を細断した複数のサブコンジュニック系統を用いた脳卒中感受性試験、②腎臓における cDNA マイクロアレイ解析、③SHRSP, SHR の全ゲノム比較解析を行うことで、第 1 染色体の脳卒中 QTL については約 3 Mbp の領域に絞り込むことに成功した⁽²⁾。本研究では、この領域に存在する *Cblc* (Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence c) 遺伝子に着目した。SHRSP と SHR の *CBLC* 配列には 2 か所のアミノ酸置換が存在し、I-TASSER によるタンパク立体構造予測から両者の構造的差異が推測されたため⁽²⁾、有力候補の一つと考えている。

CBLC は *Cbl* ファミリーと称される多機能性タンパク群に属する。*Cbl* ファミリーは、タンパク機能調節や分解に関わる E3 ユビキチンリガーゼ活性や、リン酸化チロシンに結合する SRC homology-2 (SH2) ドメインを有し、種々の細胞内シグナルの調節因子として機能する⁽³⁾。*CBLC* は、*Cbl* ファミリーの中では最近に同定され、主に上皮細胞で発現するとされる。結合タンパクとしては、上皮細胞増殖因子受容体 (EGFR) などが知られ、受容体活性化後にリン酸化を受け、EGFR に対してその細胞増殖促進作用を抑制するように働く⁽⁴⁾。

2014 年の Desai らのヒト肺由来線維芽細胞 IMR-90 を用いた研究⁽⁵⁾によると、*CBLC* は HIC-5 (Hydrogen peroxide-inducible clone 5), HSP27 (Heat shock protein 27) と複合体を形成し、活性酸素産生酵素である NOX4 をユビキチン化により積極的な分解に導くことで、TGF- β 1 誘導性の線維化マーカー (α -SMA, Fibronectin) や細胞老化マーカー (p16) の発現を抑制するとされる。我々は特に、SHRSP の食塩誘発脳卒中発症において、腎機能障害の進行がその主要な病態生理学的メカニズムであると推測していることから、腎臓由来の培養細胞を用いて、*CBLC*

が TGF- β 1 誘導による線維化に関わる可能性を検討した。

2. 研究方法

2.1 細胞培養

ラット近位尿管由来上皮細胞株である NRK-52E は JCRB 細胞バンクより購入した。継代培養は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) + 10% fetal bovine serum (FBS) に、ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシン B 懸濁液 (Wako) を加えたものを基本培地として用いた。

2.2 NRK-52E における TGF- β 1 処理と *Cblc* に対する siRNA 導入

ヒト組換え型 TGF- β 1 は Wako より購入した。NRK-52E における TGF- β 1 処理による線維化誘導については、Li らの報告⁽⁶⁾を参考に条件検討を行った。NRK-52E を 50% 程度の細胞密度となるように播種し、翌日より DMEM + 0.5% FBS の低血清培地に置換した。16~24 時間後、コントロール群は DMEM + 0.5% FBS, TGF- β 処理群にはこれに 10 ng/mL の TGF- β 1 を加え、3 日間処理を行った後に、RNA・タンパク質抽出に供した。

Cblc siRNA (si*Cblc*) および Negative control siRNA (siControl) は、ThermoFisher Scientific より購入し、Lipofectamine RNAi MAX reagent (ThermoFisher Scientific) を用いて導入した。導入は、細胞播種翌日に 10 nM の濃度で行った。

2.3 RNA 抽出と定量的 RT-PCR 解析

RNA 抽出は Sepasol RNA-I Super G (ナカライテスク) を用いて行った。PrimeScript RT Reagent with gDNA Eraser (タカラバイオ) を用いて逆転写し、SYBR Premix ExTaqII (タカラバイオ) および StepOnePlus リアルタイム PCR システム (ThermoFisher Scientific) を用いて定量的 RT-PCR を実施した。同一サンプルの *Gapdh* の Ct 値を内部標準として、 $2^{-\Delta Ct}$ 法で相対的発現量を算出した。各ラット遺伝子に対するプライマー配列は、以下の通りである。

Cblc: Forward 5'-GGCCACGTGTCTGTCTTTGAG-3',

Colla1: Forward 5'-ACATGTTTCAGCTTTGTGGACCTC-3',

Reverse 5'-TCAGGTTTCCACGTCTCACCA-3',

α -SMA: Forward 5'-GAGATCTCACCGACTACCTCATGA-3',

Reverse 5'-TCATTTTCAAAGTCCAGAGCGACA-3',

Gapdh: Forward 5'-CGTCTCATAGACAAGATGGTGAAG-3',

Reverse GACCATGTAGTTGAGGTCAATGAAG

2. 4 ウェスタンブロッティング

タンパク抽出はRIPA buffer(ナカライテスク)を用いて行い、Protein Assay BCA Kit(Wako)でタンパク定量した。Sample buffer 中で熱変性後、急冷し、SDS-PAGE(分離ゲル濃度 10%)で分離した。PVDF 膜に転写後、各種抗体を用いて検出を行った。抗原抗体反応には、Toyokuniらによるマイクロウェーブ装置MI-77型(東屋医科器械)による間欠照射法を用いた⁶⁾。検出に用いた抗体と希釈濃度は以下の通りである。Anti-CBLC (1:500, Proteintech, 13104-1-AP), Anti-COL1A1 (1:1000, GeneTex, GTX112731), Anti- α -SMA (1:400, Dako, clone1A4), Anti-NOX4 (1:500, Proteintech, 14347-1-AP), Anti-GAPDH (1:1000, Wako, clone5A12), Anti-FLAG (1:1000, Sigma, clone M2), Goat anti-rabbit Ig/HRP (1:2000, Dako), Sheep anti-mouse IgG/HRP (1:5000, GE Healthcare)。

2. 5 哺乳類細胞発現用ベクター構築とトランスフェクション

SHRSP および SHR の腎 cDNA は2. 3で述べた方法で調製し、これを鋳型として *Cblc* coding region を KOD-Plus-Neo (TOYOBO)を用いて増幅した。増幅断片および哺乳類細胞発現ベクターpIRES2 DsRed-Express2(Clontech)を制限酵素処理し、ライゲーション反応によりクローニングサイトに組み込んだ。シーケンスエラーがないことを BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific)を用いたシーケンシングにより確認した。トランスフェクションには Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific)を用いた。

3. 研究結果

3. 1 NRK-52E における線維性変化誘導条件の検討 (Fig. 1)

3 日間の TGF- β 1 処理により、NRK-52E における *Col1a1* mRNA 発現は有意に増大したが、 α -SMA の発現量は変化しなかった。代表的な線維化マーカーである *Col1a1* 発現の明らかな増大が見られたこと、また、コントロール群では見られない spindle-like morphology を示す細胞が TGF- β 1 処理群では観察されたことから(データ非提示)、当該条件が NRK-52E において fibrotic change を誘導する条件に適していると判断し、各種検討を行うことにした。

3. 2 *Cblc* siRNA 導入の線維化マーカー遺伝子発現に対する効果の検討(Fig. 2)

Cblc siRNA 導入により、siControl 投与群と比較して、

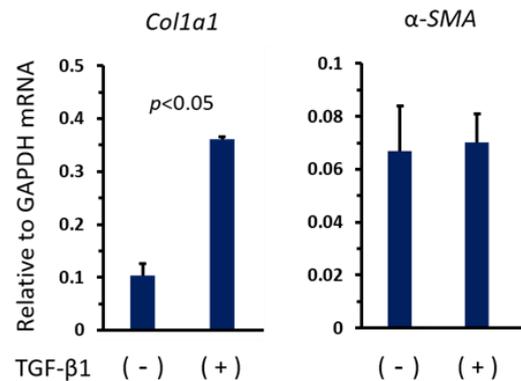


Fig.1. Quantitative RT-PCR analysis for fibrotic marker genes in NRK-52E treated by TGF- β 1. Mean \pm S.D. are shown in each column (n=3)

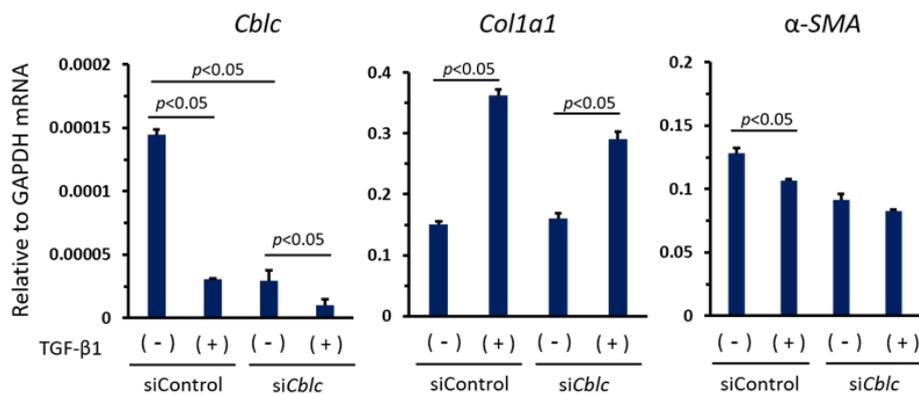


Fig.2. Influence of *Cblc* knockdown to mRNA expression of *Col1a1* and α -SMA. Mean \pm S.D. are shown in each column (n=3)

Cblc mRNA 発現が顕著に抑制されることを確認した。また興味深いことに、siControl 単独投与群と比較して、siControl + TGF- β 1 投与群では *Cblc* 発現の顕著な抑制が見られた。TGF- β 1 下流シグナルが転写レベルでの *Cblc* 発現抑制を引き起こすことを示唆する結果であるが、今後詳細な検討を要する。これと一致するように、si*Cblc* + TGF- β 1 投与群では si*Cblc* 単独投与群よりも有意に *Cblc* 発現が抑制されていた。

Coll1 α , α -SMA の発現比較において、*Cblc* mRNA 発現抑制はこれらの mRNA 発現レベルに対する影響を示さないことがわかった。

3.3 線維化マーカータンパクの Western blotting による発現評価 (Fig. 3)

siControl 単独投与と比して、siControl + TGF- β 1 投与群では顕著な COL1A1 発現の増大が見られた。興味深いことに、mRNA レベルでの発現抑制は観察されなかったにも関わらず (Fig. 2), *Cblc* siRNA 導入により、この COL1A1 増大は有意に抑制された。一方、 α -SMA 発現は TGF- β 1 処理で増加傾向を示したが、COL1A1 と異なり、

Cblc siRNA 導入による抑制は見られなかった。

上述の通り、Desai らのヒト由来肺線維芽細胞を用いた報告では、CBLCは活性酸素産生酵素であるNOX4のプロテアソーム系による分解を亢進することで線維化マーカーの発現を抑制するとされている⁽⁶⁾。ラット腎尿管上皮細胞であるNRK-52EでもNOX4を介する機序が関与するかを調べるため、NOX4発現を検討したが、群間で有意差は認められなかった。

3.4 各種 *Cblc* 過剰発現系の構築 (Fig. 4)

SHRSPとSHRの*Cblc* coding sequenceには2か所のアミノ酸置換が存在し⁽²⁾、これがタンパク質の立体構造を変化させることでその活性に影響する可能性がある。NRK-52E細胞でこの両者の機能的違いを評価することを目的とし、SHRSPおよびSHR由来*Cblc* cDNA配列を組み込んだ発現ベクターを構築した。一過性導入により、NRK-52EでのCBLC過剰発現を確認した。また、共免疫沈降による相互作用タンパク解析を目的として、CBLCのC末端側にFLAG配列を付加したベクター系も構築し、一過性導入による過剰発現を同様に確認した。

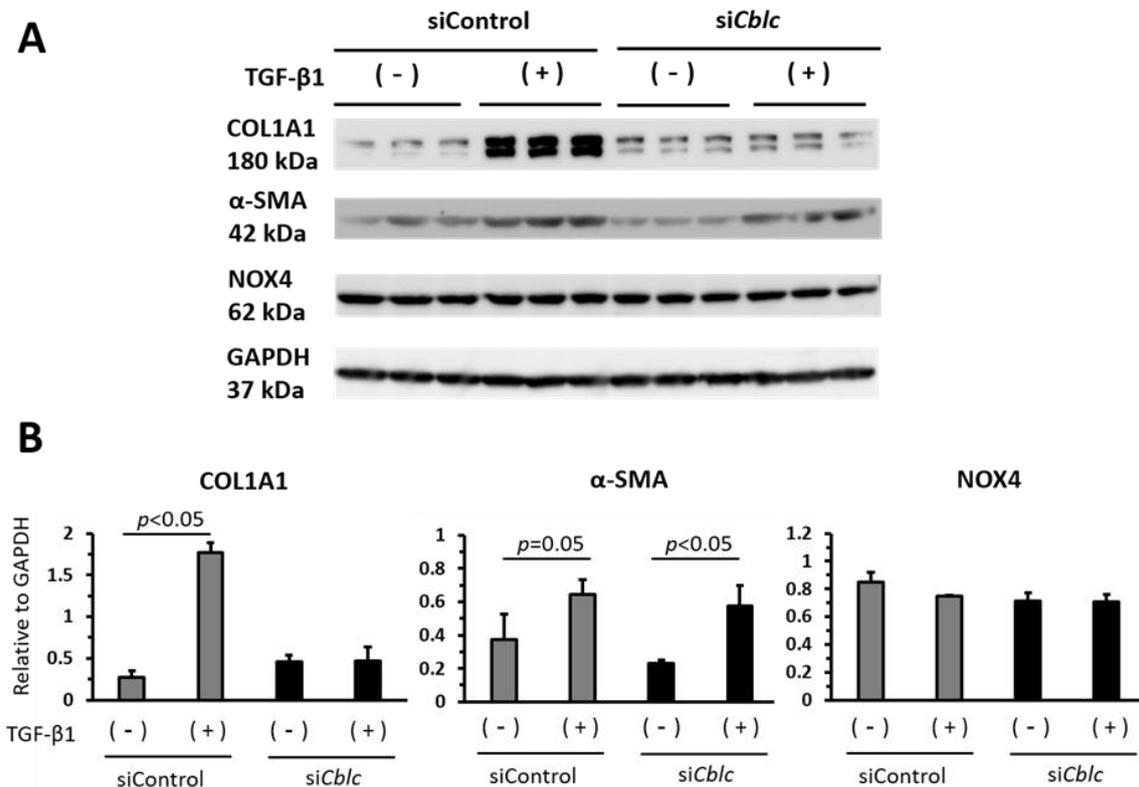


Fig.3. (A) Representative images of western blot analysis. (B) Densitometry analysis of COL1A1, α -SMA and NOX4 proteins. Each image was analyzed by Image J software. Mean \pm S.D. are shown in each column (n=3)

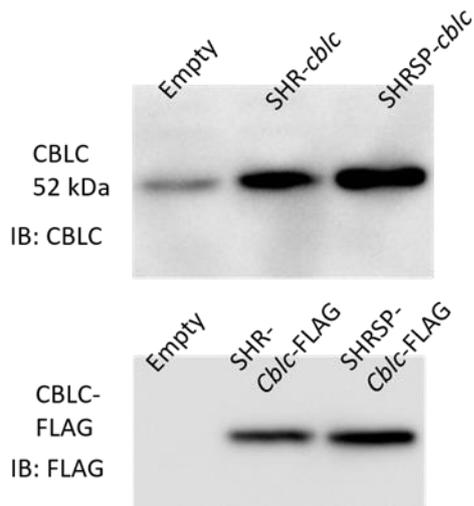


Fig.4. Transient expression of SHR- or SHRSP-CBLC with or without C-terminal FLAG tag in NRK-52E. Mammary expression vectors were transfected into NRK-52E cells and the cells were harvested for protein extraction after 24h of transfection. Empty: Expression vectors without both *Cblc* and FLAG sequences

4. 考察

本研究では、我々が順遺伝学的アプローチにより独自に同定した SHRSP の食塩誘発性脳卒中の原因候補遺伝子 *Cblc* に焦点を当てて、培養系による尿細管上皮細胞の線維性変化への CBLC の影響を検討した。興味深いことに、*Cblc* の発現抑制は COL1A1 タンパク量の発現抑制に寄与することが示唆された (Fig. 3)。腎線維化は慢性腎臓病に至る病的変化であり、尿細管で発現する CBLC がコラーゲン産生量を調節する mediator として機能することで、腎線維化の進行を制御するのかもしれない。

CBLC が COL1A1 を直接の基質としてユビキチン化する場合、*Cblc* の抑制によりむしろ、COL1A1 タンパク量は増加すると推測される。そのため、COL1A1 の安定的な産生・分泌を促進するような分子の機能修飾を介して、間接的に COL1A1 の蓄積による線維化プロセスに寄与している可能性がある。コラーゲンの細胞外分泌機構においては、小胞体からの分泌小胞形成に必要な COPII タンパクがユビキチン化されると、巨大分子であるコラーゲンの輸送を可能とする「大型の」分泌小胞が形成される。Kawaguchiらにより、USP8-STAM1 による COPII の脱ユビキチン化により、小胞体での大型分泌小胞の形成が阻害

され、コラーゲン分子の細胞外分泌が抑制されるとの報告がなされた⁽⁸⁾。もし CBLC が COPII をユビキチン化するのであれば、*Cblc* の発現抑制は USP8-STAM1 による COPII の脱ユビキチン化を促進する方向に働き、結果として COL1A1 産生・分泌を負に制御する可能性がある。まだ推測の域を出ず、今後多くの検討が必要であるが、CBLC が腎機能障害に関わる分子機序の可能性を示唆するには至った。

5. 今後の課題

本研究では、培養細胞実験により推定される分子機構を一部明らかにできた。今後は、①CBLC が TGF- β 1 下流の COL1A1 産生を制御するとして、SHR と SHRSP の CBLC 配列の違いが実際に当該タンパクの活性に影響するだけでなく COL1A1 産生にも影響するのかどうか、また②食塩負荷をかけた SHR・SHRSP の腎組織サンプルにおいても同様に COL1A1 の産生量に差異が見られるのか、といった点を検討する必要がある。ここでの紹介は割愛したが、第 1 染色体の脳卒中 QTL をさらに細かく分けた新たなサブコンジェニック系統を複数、本研究期間中に作成した。これらのサブコンジェニック系統は、食塩誘発脳卒中への感受性試験により候補領域をさらに絞り込むための評価系として利用できる。培養細胞系での分子メカニズム探索とコンジェニック系統を用いた *in vivo* 解析を並行して実施することで、多機能タンパク CBLC による腎機能制御を起点とする脳卒中発症機序を明らかにしていきたい。

6. 文献等

- Gandolgor TA, Ohara H, Cui ZH, Hirashima T, Ogawa T, Saar K, Hübner N, Watanabe T, Isomura M, Nabika T. Two genomic regions of chromosomes 1 and 18 explain most of the stroke susceptibility under salt loading in stroke-prone spontaneously hypertensive rat/Izm. *Hypertension* 2013; 62:55-61.
- Niiya K, Ohara H, Isono M, Sheikh AM, Matsuo H, Fujikawa K, Isomura M, Kato N, Nabika T. Further dissection of QTLs for salt-induced stroke and identification of candidate genes in the stroke-prone

- spontaneously hypertensive rat. *Sci Rep.* 2018; 8: 9403.
3. Swaminathan G, Tsygankov AY. The Cbl family proteins: ring leaders in regulation of cell signaling. *J Cell Physiol.* 2006; 209: 21-43.
 4. Keane MM, Ettenberg SA, Nau MM, Banerjee P, Cuello M, Penninger J, Lipkowitz S. cbl-3: a new mammalian cbl family protein. *Oncogene* 1999; 18: 3365-3375.
 5. Desai LP, Zhou Y, Estrada AV, Ding Q, Cheng G, Collawn JF, Thannickal VJ. Negative regulation of NADPH oxidase 4 by hydrogen peroxide-inducible clone 5 (Hic-5) protein. *J Biol Chem* 2014; 289: 18270-18278.
 6. Li JH, Zhu HJ, Huang XR, Lai KN, Johnson RJ, Lan HY. Smad7 inhibits fibrotic effect of TGF- β on renal tubular epithelial cells by blocking Smad2 activation. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1464-1472.
 7. Toyokuni S, Kawaguchi W, Akatsuka S, Hiroyasu M, Hiai H. Intermittent microwave irradiation facilitates antigen-antibody reaction in Western blot analysis. *Pathol Int.* 2003; 53: 259-261.
 8. Kawaguchi K, Endo A, Fukushima T, Madoka Y, Tanaka T, Komada M. Ubiquitin-specific protease 8 deubiquitinates Sec31A and decreases large COPII carriers and collagen IV secretion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; 499: 635-641.

Elucidation of Novel Molecular Signaling between Salt-Loading and Cardiovascular Diseases Based on a Genetic Approach

Hiroki Ohara

Department of Functional Pathology, Faculty of Medicine, Shimane University

Summary

The stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP) is a representative disease model of essential hypertension and cerebral stroke. Our genetic approach using a series of congenic strains between SHRSP and SHR (a stroke-resistant hypertensive strain) have identified that two major quantitative trait loci (QTL) responsible for a salt-induced stroke in SHRSP were located on chromosome (chr) 1 and 18. Recently, we showed that an approximately 3 Mbp fragment on the chr1 QTL had possible candidate genes. In the present study, we focused on the *Cblc* (Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence c), coding an E3 ubiquitin ligase, as a promising candidate because it was computationally predicted that its 3D structure would be different between SHRSP and SHR due to variations of amino acids sequence. CBLC belongs to Cbl family and is thought to participate various signaling pathways through its E3 ubiquitin ligase activity and phosphorylated tyrosine binding domain SH2. Because it was reported that CBLC had a suppressive role in fibrotic changes induced by TGF- β 1 in human lung fibroblasts, we hypothesized that CBLC would play a role in fibrotic changes of renal tubular cells as well.

TGF- β 1 induced *Colla1* (a fibrotic marker gene) mRNA and protein expression in NRK-52E cells, a rat renal proximal epithelial cell line. Interestingly, transfection of *Cblc* siRNA reduced COL1A1 protein expression with no change in mRNA level. This result suggested that CBLC may regulate COL1A1 stability. TGF- β 1 also induced α -SMA protein expression, a fibrotic/EMT marker, while the expression level was not affected by *Cblc* knockdown.

In conclusion, the present results raised a possibility that CBLC causes excess accumulation of COL1A1 resulting renal fibrosis. Therefore, CBLC may play a pathophysiological pivotal role in salt-induced stroke of SHRSP by accelerating renal injury under salt-loading.