

平成 29 年 4 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14873

研究課題名(和文) 新たに見出した慢性腎臓病発症マウスの変異遺伝子スクリーニング

研究課題名(英文) Screening of candidate genes associating with the progression of chronic kidney disease in mice

研究代表者

市居 修 (Ichii, Osamu)

北海道大学・獣医学研究科・准教授

研究者番号：60547769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病(CKD)は現代の国民病となり、患者数の増加、医療経済の圧迫は深刻である。本研究において、我々はCKDの病理発生に関する遺伝子座をDBA/2マウスの第12番染色体上に発見し、DBA/2 renal cyst “drecy” と命名した。病理学的解析から、drecy 遺伝子座はDBA/2マウスの遠位尿細管上皮の小胞やイオンの輸送又は細胞接着に関連する分子の変化に関与していた。これらのイベントは遠位尿細管上皮細胞の表現型異常を、遂には嚢胞形成を誘導していると考えられた。遺伝子発現解析から、その発症にはD12Mit182-83領域に含まれる遺伝子群、特にGreb1が強く関連すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Chronic kidney disease (CKD) is a serious problem from the points of increase of the patients with CKD as well as medical economy. In the present study, we discovered the candidate locus associating with the progression of CKD in DBA/2 mouse inbred strain. We named this locus as DBA/2 renal cyst “drecy”. From the pathological analysis, drecy locus related to the alternation of molecules associating with the transportations of ion or vesicle and cell-adhesion in the epithelial cells of distal tubules. We considered that these alternations would lead the abnormal phenotypes of distal tubules, including cyst formation. Furthermore, gene expression analysis suggested that the genes encoded on DBA/2-type chromosome 12 (D12Mit182-83), in particular Greb1, associate with the progression of these phenotypes.

研究分野：獣医学、腎臓病学、分子形態学

キーワード：慢性腎臓病(CKD) 嚢胞 原因遺伝子 遺伝子座 ゲノム 病理 マウス 遠位尿細管

1. 研究開始当初の背景
慢性腎臓病 (CKD) の診断・治療標的分子をコードする原因遺伝子

現在の問題点：新たな国民病、慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease; CKD) の急増

CKD は日本国民の 8 人に 1 人が罹患する現代の国民病であり、1) 明らかな腎障害の存在、2) 腎機能の低下のいずれか、又は両方が慢性的に持続する病態である。CKD は心血管疾患のリスクファクターとして患者の死亡率を増加させる。CKD を導く原因には糖尿性腎症、腎炎、嚢胞性腎疾患等があり、各疾患の原因遺伝子はいずれも診断・治療の標的分子となる。腎臓は再生しにくい臓器であり、このような標的分子を利用した早期診断と治療が最善の CKD 対策である。

これまでの研究成果と着想への経緯：新規の CKD 原因遺伝子を保有するマウスを発見

DBA/2 マウスは難聴、てんかん、動脈硬化症に感受性を示し、その原因はゲノム異常にある。一方、申請者は DBA/2 マウスが加齢性に嚢胞性の尿管病変を形成することを発見した (市居：第 157 回日本獣医学会学術集会, 2014)。特に病変は遠位尿管に主座し、上皮傷害マーカーの発現増加、上皮細胞の接着異常と脱落、管腔の拡張と嚢胞化、尿管周囲への細胞浸潤と線維化を特徴とする。つまり、DBA/2 マウスの遺伝学的背景には CKD 発症を規定する未知のゲノム異常が存在する。

2. 研究の目的

何をどこまで明らかにするのか：CKD 発症の新規原因遺伝子とその異常を同定する

DBA/2 マウスの CKD 原因遺伝子とその異常を明らかにし、原因遺伝子が関与する CKD の分子病態を解明する。研究期間内に以下の項目を明らかにする。

- ① DBA/2 マウスの尿管嚢胞関連遺伝子を同定し、CKD へと導く病理メカニズムを明らかにする。
- ② 尿管嚢胞関連遺伝子の動態と腎病理の相関、関連する細胞内イベントを明らかにする。

3. 研究の方法

DBA/2 マウスの尿管嚢胞関連遺伝子を突き止め、その遺伝子異常に起因する病態を精査する。

A. DBA/2 マウスの尿管嚢胞を解析する

DBA/2 マウスの腎病理組織像を経時的に観察し、病変の局在を同定する。また、電子顕微鏡観察や BrdU による細胞増殖評価等を行う。これらについて、嚢胞病変を示さない C57BL/6 マウスと比較する。また、このような嚢胞形成について他の動物種でも検討する。

B. DBA/2 マウスの尿管嚢胞と実験的腎障害等の関連性を解析する

DBA/2 マウスと C57BL/6 マウスに STZ 誘導性糖尿病、片側尿管結紮による閉塞性腎障害、葉酸誘導性急性腎障害あるいはグリオキサール誘導性尿石症を誘導し、計画 A と同様に腎病理を比較解析する。また、自然発症型の尿管炎-水腎症モデルマウスにおける当該尿管嚢胞の出現を解析する。

C. DBA/2 由来尿管嚢胞関連遺伝子座を狭め、コンジュニック系統を樹立する

DBA/2 マウスと C57BL/6 マウスの交配より、F1、F2 交雑、N2 バッククロス世代の産子を得、尿管嚢胞の有無を表現型として連鎖解析を行う。結果を基に、DBA/2 マウスの尿管嚢胞関連遺伝子座と C57BL/6 マウスの遺伝学的背景を有するコンジュニックマウスを作成する。

D. DBA/2 由来尿管嚢胞関連遺伝子を同定する

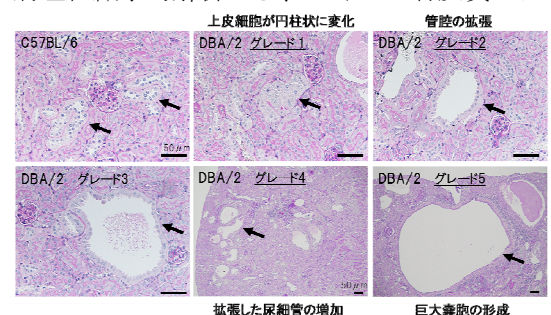
計画 C で同定した遺伝子座に存在する蛋白コード遺伝子から原因遺伝子を絞り込む。C57BL/6 マウスと DBA/2 マウスのゲノムを網羅的に解析し、遺伝子の発現量、塩基配列、出現バリエーションの違いを調べる。両マウス間で発現量、塩基配列、あるいは出現バリエーションに差がみられ、かつ尿管嚢胞で発現する遺伝子を原因遺伝子候補として絞り込む。原因遺伝子候補のコード蛋白の腎臓内局在を両マウスで比較する。

E. *in vitro* ツールを用いて尿管嚢胞関連遺伝子の病理学的意義を探る

マウス腎上皮細胞株に原因遺伝子の発現ベクターを導入して過剰発現させ、対照コントロールと形態変化、ならびに導入後の遺伝子発現変化を解析する。

4. 研究成果

病理組織学的解析から、DBA/2 の腎皮質には

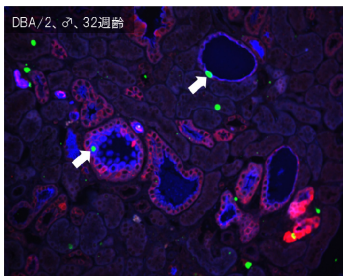


上皮が円柱状を呈し、拡張傾向にある尿管が散在性に認められ、嚢胞状を呈する上皮は扁平化した。このように尿管は C57BL/6 マウスと DBA/2 マウスの F2 世代の一部にも出現したが、F1 世代には認められなかった。

嚢胞の拡張程度の組織計測において、DBA/2 マウスの雄が雌よりも有意に高スコア

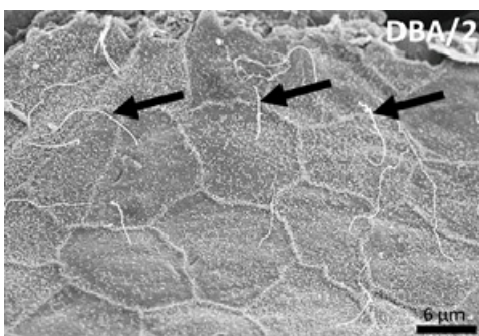
を示し、雄で加齢性に増加傾向にあった。DBA/2 マウスにおいて、腎障害による嚢胞形成の増加は見出せなかった。尿管炎-水腎症モデルにける DBA/2 マウスのような尿細管嚢胞形成の増加も認められなかった。

Uromodulin と Calbindin の免疫染色の結果、嚢胞を呈する尿細管は遠位直~曲尿細管であることを確認した。高度に拡張した尿細管は尿細管傷害マーカー(IL-1F6/IL-36a)に陽性を示し、一部の嚢胞上皮細胞の核は BrdU 取り込み像を示した(矢印)。また、このような遠位尿細管の形態異常や嚢胞形成は加齢の進んだイヌやコトナラットの腎臓でも認められた。



電顕観察では、嚢胞上皮の細胞質内に高電子密度顆粒、ミトコンドリア内層板状構造、馬蹄状小胞構造が認められ、管腔には層板状構造の脱落が認められた。

DBA/2 マウスの正常な遠位尿細管において、小胞の融合・輸送に重要な CD9、細胞接着関連分子及び Na⁺/K⁺ ATPase の免疫染色陽性反応は基底側にみられた。一方、嚢胞上皮では CD9 陽性反応が減弱し、細胞接着関連分子及び Na⁺/K⁺ ATPase は上皮細胞間の細胞膜に強く局在した。特に、DBA/2 マウスの腎臓における CD9、E-cadherin 及び Occludin の遺伝子発現が C57BL/6 のそれよりも低かった。嚢胞上皮細胞の一次線毛は嚢胞の拡大と共に伸長した。



C57BL/6 マウスと DBA/2 マウスの F2 世代および N2 世代を用いた連鎖解析から、本表現型は劣性遺伝様式であり、DBA/2 型ゲノムの第 12 番染色体(約 5-10cM)に位置することを突き止め、本遺伝子座を DBA/2 renal cyst、"drecy" と名付けた。この drecy 遺伝子座上には約 30 個の蛋白コード遺伝子が存在する。

drecy 遺伝子座を包含する B6. D2-(D12Mit182-83) コンジェニックマウスは低頻度ながら尿細管嚢胞を形成した。本系統の congenic 領域に含まれる遺伝子の中

で、growth regulation by estrogen in breast cancer 1 (*Greb1*) の腎臓内発現量が C57BL/6 マウスよりも B6. D2-(D12Mit182-83) マウスで顕著に高く、その蛋白は遠位尿細管上皮に局在した。DBA/2 マウスと C57BL/6 マウスの *Greb1* 遺伝子の間には、アミノ酸置換を伴う SNP が 5 ヶ所存在した。

Greb1 をマウス腎由来 M1 培養細胞に過剰発現させると、CD9 と E-cadherin の遺伝子発現は減少し、Vimentin のそれは上昇した。

以上、DBA/2 マウスでは、遠位尿細管上皮の小胞やイオンの輸送又は細胞接着に関連する分子の変化が上皮細胞の表現型異常を、遂には嚢胞形成を誘導し、その発症には *D12Mit182-83* 領域に含まれる遺伝子群、特に *Greb1* が強く関連すると考えられた。

drecy 遺伝子座上の原因遺伝子は遠位尿細管の嚢胞化に関与することがわかった。尿細管の嚢胞化は「線毛の機能形態を担う分子群の異常 = ciliopathy である」という考えは定説であり、嚢胞性腎疾患の原因遺伝子 (*PKHD*, *PKD*, *NPHP* 等) は、いずれも線毛関連分子をコードする (Gascue ら: *Pediatr Nephrol*, 2011)。しかし、*drecy* 遺伝子座上に既知の線毛関連遺伝子を見出せなかった。

病理学的特徴から、DBA/2 マウスの病態はネフロン癆というヒトの CKD 原因疾患に似る。本症は 30 歳までに末期腎不全に至る疾患中最も多く、*NPHP* 遺伝子変異を主因とするが、原因遺伝子不明の症例が多く、未だ有効な治療法はない。*drecy* 遺伝子座は、ciliopathy 説では説明できない CKD 関連疾患、特にネフロン癆の病態解明において興味深い。

drecy 遺伝子座上の原因遺伝子は遠位尿細管の傷害に関与する。腎病変は糸球体病変と尿細管間質病変に大別され、特に後者は CKD の悪化と強く関連し、腎機能廃絶、ついには血圧・代謝調節異常を引き起こす。尿細管上皮の細胞学的性質は近位と遠位で全く異なるにも関わらず、これまで尿細管間質病変の病理発生論は近位尿細管のデータによって構築されてきた。申請者は遠位尿細管傷害の重要性を指摘し、免疫介在性疾患や糖尿病において、遠位尿細管傷害が CKD の初期病変になることを報告してきた(市居: *Lab Invest* 2010, *ASN* 2014)。

遠位尿細管は塩類再吸収の主体、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の中樞であるが、相対的に短く、その再生は未だ不明である。一方、近位尿細管は腎臓に豊富に存在し、一定の再生能力を示す。つまり、短く弱いが機能的に極めて重要な遠位尿細管の傷害こそが CKD 進行の舵を取る病理プロセスであり、ゲノムに規定される遠位尿細管傷害は CKD のトリガーとなるという病理学的考察は興味深い。

本研究で同定した *drecy* 遺伝子座に関連する臨床症例が存在するならば、現在も原因不明の腎障害に苦しむ当該患者あるいは動物における重要な知見となりうるだろう。今後

の更なる解析が必要である。

5. 主な発表論文等
(研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. Ichii O, Chihara M, Lee SH, Nakamura T, Otsuka-Kanazawa S, Horino T, Elewa YH, Kon Y. Hydronephrosis with ureteritis developed in C57BL/6N mice carrying the congenic region derived from MRL/MpJ-type chromosome 11. *Autoimmunity*. 2017. 50(2): 114-124. doi: 10.1080/08916934.2016.1261831. 査読有.
2. Ichii O, Nakamura T, Irie T, Kouguchi H, Nakamura D, Nakamura S, Sato S, Yokoyama K, Horino T, Sunden Y, Elewa YH, Kon Y. Female cotton rats (*Sigmodon hispidus*) develop chronic anemia with renal inflammation and cystic changes. *Histochem Cell Biol*. 2016. 146:351-362. doi: 10.1007/s00418-016-1438-3. 査読有.
3. Shiozuru D, Ichii O, Kimura J, Nakamura T, Elewa YH, Otsuka-Kanazawa S, Kon Y. MRL/MpJ mice show unique pathological features after experimental kidney injury. *Histol Histopathol*. 2016. 31:189-204. doi: 10:14670/HH-11-662. 査読有.

[学会発表] (計4件)

1. 市居 修、中村 鉄平、矢吹 映、堀野 太郎、昆 泰寛. マウス遠位尿細管の嚢胞形成に関与する新規原因遺伝子座の役割. 第159回 日本獣医学会学術集会 獣医解剖分科会. 2016年9月7日. 神奈川県藤沢市.
2. 市居 修、中村鉄平、岡村匡史、木村純平、堀野太郎、昆 泰寛. 遠位尿細管上皮細胞の形態機能を制御するIL-1F6/IL-36 α . 日本解剖学会第62回 東北・北海道連合支部学術集会. 2016年9月4日. 北海道帯広市.
3. 中村 鉄平, 市居 修, 入江 隆夫, 孝口 裕一, 寸田 祐嗣, 堀野 太郎, 昆 泰寛. 雌性コットンラット (*Sigmodon hispidus*) にみられる腎性貧血. 第9回 日本獣医腎泌尿器学会学術集会. 2016年8月21日. 東京都千代田区.
4. 市居 修、中村 鉄平、堀野 太郎、木村 純平、岡村 匡史、昆 泰寛. 遠位尿細管傷害を知らせるマーカー分子 “IL-1F6/IL-36a” の有用性. 第158回 日本獣医学会学術集会 獣医解剖分科会. 2015年9月9日. 青森県十和田市.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

1. 北大・獣医・解剖学教室ホームページ (<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/anat/index.html>)
2. 北海道大学大学院獣医学研究院・獣医学部 ホーム ページ (<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/>)
3. 北海道大学学術成果コレクション: HUSCAP (<http://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/index.jsp>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市居 修 (ICHII OSAMU)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号: 60547769

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

堀野 太郎 (HORINO TARO)

高知大学・医学部・講師

研究者番号: 90448382

(4) 研究協力者

なし