

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：34438

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09634

研究課題名(和文)多発性嚢胞腎と男性不妊を合併する新規副甲状腺関連遺伝子KANSL1-Lの解析

研究課題名(英文) Analysis of a novel parathyroid-related gene KANSL1-L complicated of polycystic kidney disease and male infertility

研究代表者

鍵弥 朋子 (Kagiya, Tomoko)

関西医療大学・保健医療学部・助教

研究者番号：50717650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：副甲状腺亢進症に関係するKansl1-L遺伝子欠損マウスは雄性不妊であり、加齢で多発性嚢胞腎になった。Kansl1-Lが嚢胞腎形成にどのように関わるのかを調べた。嚢胞のもととなる尿細管の拡張は雌雄とも生後2週齢から観察され、加齢とともに拡張尿細管数が増えたが、嚢胞の多発、巨大化がみられたのは雄だけだった。多発性嚢胞腎はKO雄の約半数が発症した。Kansl1-LはPkd1、Pkd2とは異なる経路の原因遺伝子であることが示され、線毛との関連性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Kansl1-L欠損多発性嚢胞腎は老齢になって初めて発症すると思われたが、嚢胞のきっかけである尿細管の拡張は生後2週齢からみられた。さらに老年60週齢ころの嚢胞の大型化と多発は雄だけにみられ、この嚢胞腎は雌雄差のある疾患であることがわかった。Kansl1-Lは今までにみつかっていない、発症に性差がある多発性嚢胞腎の原因遺伝子であり、雄性不妊を合併する遺伝性疾患の原因遺伝子の可能性がある。

研究成果の概要(英文)：KO mice lacking the Kansl1-L gene associated with hyperparathyroidism were male infertile, became polycystic kidney with age. We investigated how Kansl1-L is involved in cystic kidney formation. Dilation of the tubules, source of cysts, was observed in both males and females from the age of 2 weeks old. The number of dilated tubules increased with aging, but only in males, multiple cysts and enlargement were seen. Polycystic kidney disease occurred in about half of KO males. Kansl1-L was shown to be a causative gene of a pathway different from Pkd1 and Pkd2, suggesting a relationship with cilia.

研究分野：実験病理学

キーワード：多発性嚢胞腎 男性不妊症 Kansl1-L 線毛

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎疾患は QOL (quality of life) を下げる代表的な加齢性疾患である。腎障害が進行して腎機能が低下、人工透析、腎移植となれば QOL は著しく低下し、医療費は増大する。加齢性腎疾患の中でも多発性嚢胞腎は常染色体優性または劣性遺伝性疾患で、遺伝性腎疾患の中で頻度が高い。

我々のこれまでの研究で、副甲状腺亢進症関連遺伝子として KANSL1-L を同定し、その遺伝子欠損 (KO) マウスを作製した。KANSL1-L KO マウスは多発性嚢胞腎の疾患モデルとなり得る形質を示し、さらに無精子症のために雄性不妊であった。

KANSL1-L 遺伝子が発現している臓器をヘテロ接合体で挿入 LacZ 遺伝子の発現を指標に RT-PCR 法で検索した。精巣、腎で強い発現がみられ (図 1) Kansl1-L の機能と KO マウスの Phenotype とが直接関係していることを示唆した。

また、ヒトでも多発性嚢胞腎の腎外症状として、男性不妊症、精嚢嚢胞が報告されており、これが Kansl1-L の働きである可能性も示された。

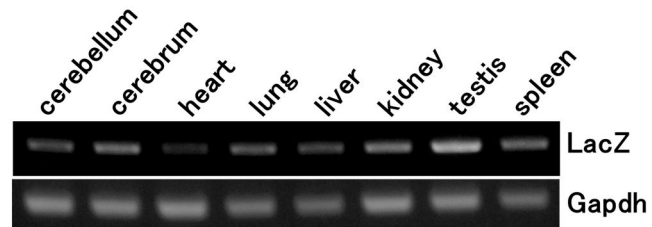


図 1 KANSL1-L ヘテロ型マウスにおける臓器別 LacZ 遺伝子

2. 研究の目的

KANSL1-L KO マウスの雄では雄性不妊と多発性嚢胞腎を合併する一方で KO 雌マウスは妊孕性が保たれた。本研究では、このような病態と、我々が Kansl1-L の発現を最初に同定した副甲状腺の関係の研究することで、ヒトの多発性嚢胞腎と男性不妊症の発生機序解明を目的とする。また KANSL1-L が腎嚢胞形成にどのように関係するのか、副甲状腺機能との関係、精巣造精機構との関係を解明することで、加齢性腎疾患の進行抑制物質や新たな男性不妊の遺伝的メカニズムの発見に結びつけることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 腎重量と加齢および血中尿素窒素 BUN の関係

Kansl1-L KO マウス及び野生型マウスの 2、4、9、16、32、64、72、96 週齢の腎重量と血中尿素窒素を測定した。嚢胞腎になると腎が腫大し、重量が増加する。また腎機能を測る指標として BUN を測定した。

(2) 加齢と腎組織形態の変化

Kansl1-L KO マウス及び野生型マウスの 2、4、9、16、32、64、72、96 週齢の腎組織標本作製し、形態学的に検討した。

(3) Kansl1-L と抗老化遺伝子 Klotho の関係の解明

抗老化遺伝子 Klotho は主として腎尿細管、PTH ホルモンを分泌している副甲状腺の主細胞、脳脈絡膜などに発現し、生体内もしくは組織でのカルシウム代謝に深く関わっている可能性が示唆されている。Kansl1-L 遺伝子 KO マウス腎で Klotho 遺伝子の発現の有無を調べた。遺伝子発現の確認は腎臓組織を用いて、RT-PCR 法で mRNA を、ウェスタンブロッティング法で蛋白質を、免疫組織化学染色で蛋白質の局在を調べた。

(4) 高リン食負荷における無機物代謝と副甲状腺機能

Kansl1-L KO マウスと野生型マウスに高リン食を与えて飼育し、血中カルシウム濃度、リン濃度を測定することで、副甲状腺機能の異常がないかを調べた。

(5) Pkd1、Pkd2 と Kansl1-L の関係解明

常染色体優性多発性嚢胞腎 ADPKD の病態を引き起こす遺伝子 PKD1、PKD2 と Kansl1L の関係を Real time PCR 法で調べた。また ADPKD は肝臓や膵臓など他の臓器にも嚢胞や変化が合併する症例が多い。他の臓器を検索し、Kansl1-L 遺伝子が他臓器に与える変化の有無を調べた。

4. 研究成果

(1) 腎重量と加齢および血中尿素窒素 BUN の関係

腎重量と加齢の関係は、雄の KO マウスのみ、32 週齢、64 週齢ころから指数関数的な増加がみられた。雌は野生型、KO 型に急激な重量増加はみられない (図 2)。BUN と加齢の関係は、雄の KO 型のみ、64 週齢以降に BUN の急激な増加を示す個体があった。雌の KO 型は野生型と変化なかった (図 3)。

腎重量と BUN の関係は図 4 のようになり、腎重量の著しく大きい腎は BUN も異常高値となり、多発性嚢胞腎と腎機能低下が相関していた。

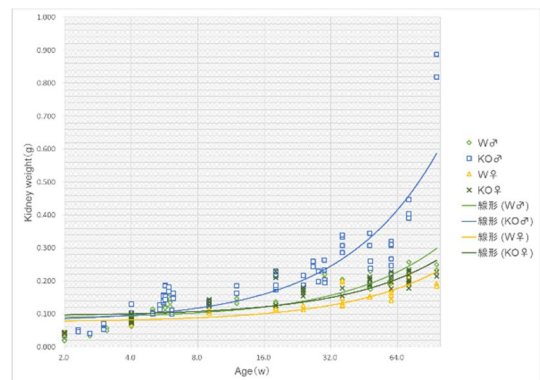


図 2 腎重量と加齢

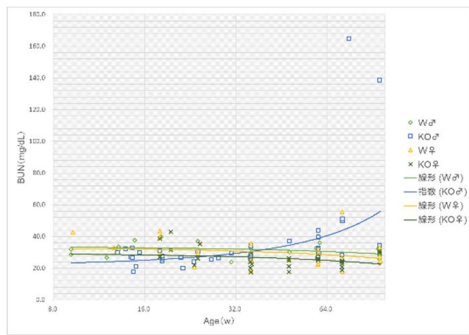


図3 BUNと加齢

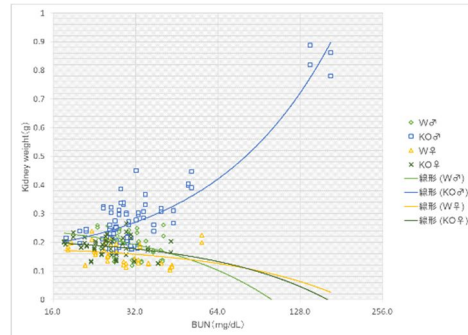


図4 腎重量とBUN

(2) 加齢と腎組織形態の変化

KO腎の尿細管の拡張は雌雄とも生後2週齢からみられた(図5印)。時間経過しても保たれ、時間経過とともに拡張尿細管が増加していた。一部のKO型雄は生後60週齢頃から嚢胞化が進行し、腎実質のほとんどない多発性嚢胞腎の組織像を呈していた。野生型は尿細管拡張の所見は観察されず、72、96週齢の老齢で一部の尿細管に拡張がみられた(印)。60週齢以降は尿細管拡張だけでなく、ボーマン嚢の拡張も散見された。この野生型の尿細管拡張、ボーマン嚢拡張は加齢による変化と考えられた。なお、野生型、KO型とも、光顕的に糸球体の変化は観察されなかった。

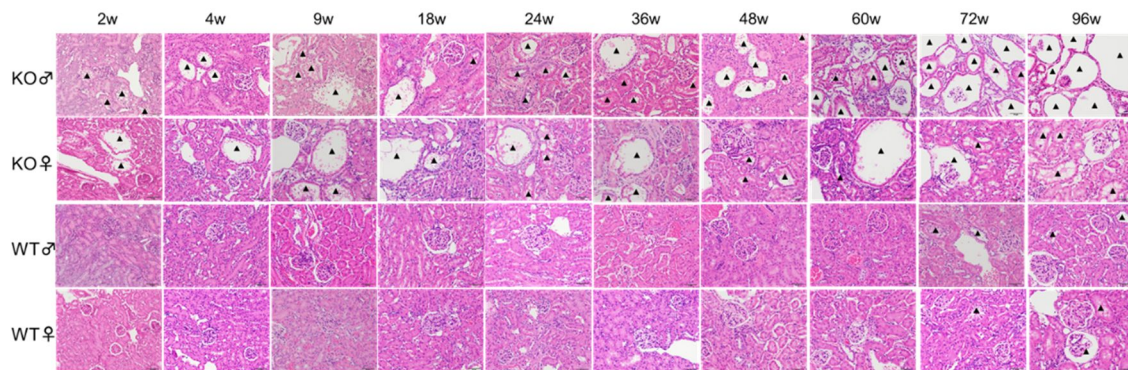


図5 加齢と腎組織

(3) Kans11-L と抗老化遺伝子 Klotho の関係の解明

9週齢の腎組織からRNA抽出し、RT-PCR法でKlotho遺伝子発現を調べた。野生型、KO型、ヘテロ型ともKlotho遺伝子が発現していた(図6左上)。4週齢、9週齢の腎組織からウェスタンブロッティング法でKlotho蛋白発現を調べた。野生型、KO型ともKlotho蛋白の発現がみられた(図6右上)。局在性を調べるため抗Klotho抗体を用いて免疫組織化学染色をおこなうと、野生型、KO型とも近位尿細管、遠位尿細管の一部が陽性となり、局在性の差はみられなかった(図6下)。以上から、KlothoとKans11-Lとの直接関連は見出されなかった。

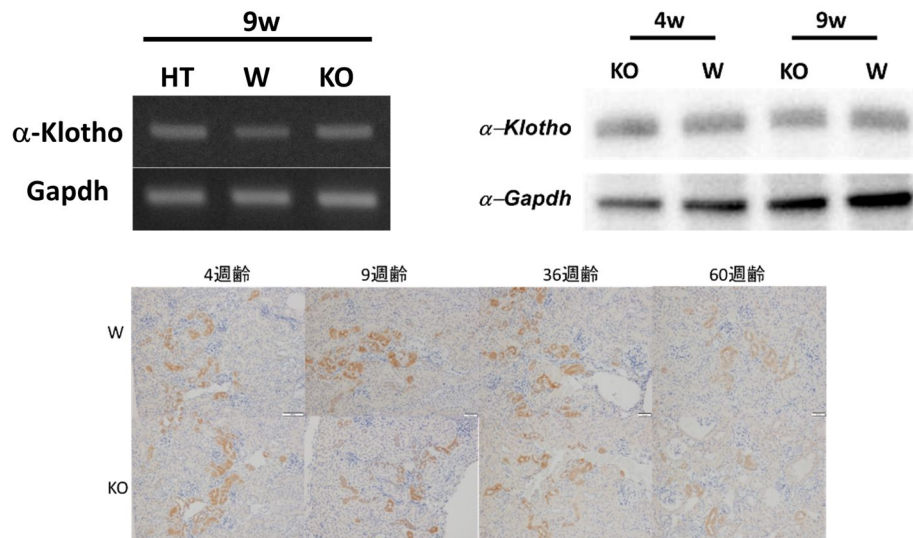


図6 Klotho 遺伝子と Kans11-L の関係

(4) 高リン食負荷における無機物代謝と副甲状腺機能

血中リン濃度は負荷群が対照群より高値を示した(図7)。また野生型ではリン負荷、対照ともに週齢とともに血中リン濃度が増加するのに対し、KOでは減少した。しかしながら値は個体差が大きく、遺伝子型間に相関があるとはいえなかった。血中カルシウム(Ca)濃度はリン負荷KO型がやや低値を示した(図8)。ADPKDでは尿細管壁の繊毛に存在するポリシスチン1(PC1)、ポリシスチン2(PC2)の異常により尿細管中液体から細胞内にCaを流入させる機能が低下し、体内Ca濃度が低値になる。負荷KO型は負荷野生型や対照KO型よりもCa濃度が低い傾向にあったのは、PC1、PC2の異常が関係している可能性がある。

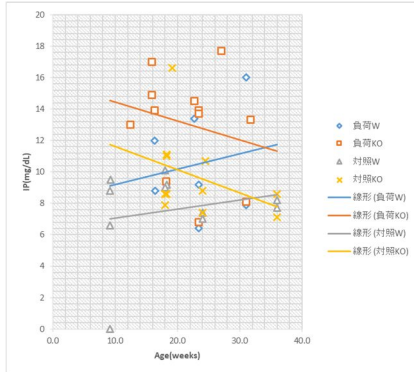


図7 血中リン濃度と週齢

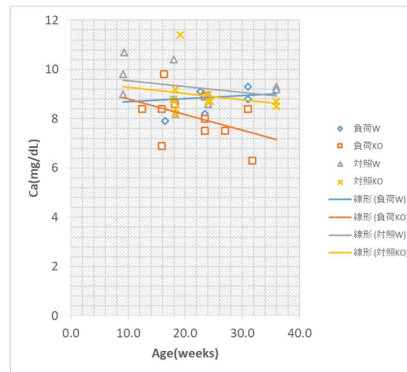


図8 血中カルシウム濃度と週齢

(5) Pkd1、Pkd2 と Kans1-L の関係説明

Pkd1、Pkd2の発現をKans1-L KO型、野生型で比較した。両者に有意差はなく、雌雄差もみられなかった(図9)。

ただ嚢胞形成時期の腎と精子形成開始時期の精巣についてcDNAマイクロアレイ解析をおこなったところ、いずれの臓器においてもKans1-L KO型は野生型に比して、Pkd1/2と関連する深い線毛形成に関係する複数の遺伝子の発現が有意に減少していた。

さらに精巣、腎臓以外の臓器の形態異常がないか検索したところ、肺組織の線維化、精嚢の肥大化、精巣上体、精管上皮の細胞異型がみられた。これらが遺伝子異常によるものか、機能的形態変化かはまだ明らかでない。

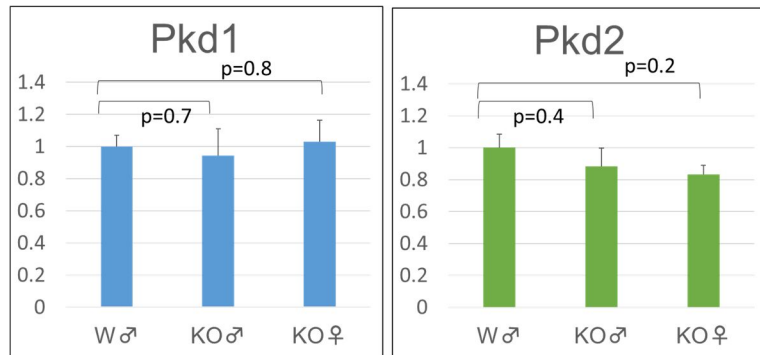


図9 Kans1-L と Pkd1、Pkd2 の関係

以上、Kans1-L KO型マウス雄の腎臓は野生型と比較して加齢とともに腫大、増大し、約半数は多発性嚢胞腎の病態を示した。多発性嚢胞腎の形態になると腎機能の低下がみられた。組織学的に検討すると、嚢胞腎の形成初期の所見である尿細管拡張は、若年である2週齢からすでにみられた。尿細管拡張の像は雌雄ともにみられ、加齢とともに拡張尿細管の増加、拡張増大化がみられたが、雄の進行は雌に比べて有意に著明であり、雌の多発性嚢胞腎はみられなかった。これより、遺伝性のKans1-L KO型多発性嚢胞腎症は進行に性差のある腎疾患の可能性はある。

Kans1-L KO型多発性嚢胞腎は、今まで知られている常染色体優性多発性嚢胞腎ADPKDの原因遺伝子であるPKD1、PKD2と直接の関係は少ないと考えられた。ただPKD1、PKD2のコードする蛋白PC1、PC2蛋白の存在する尿細管線毛の機能が低下している可能性が示唆された。マイクロアレイ解析からも線毛との関連性が示されており、今後はKans1-Lと線毛の関係を解析したい。

Kans1-Lは今までにみつかっていない、発症に性差がある多発性嚢胞腎の原因遺伝子であり、雄性不妊を合併する遺伝性疾患の原因遺伝子の可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鍵弥 朋子、伊藤俊治、畑村育次
2. 発表標題 精子形成関連遺伝子Psp KOマウスの腎嚢胞形成は若年から始まる
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会・福岡
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 俊治、鍵弥 朋子、荒川 裕也、畑村 育次
2. 発表標題 新規精巢形成因子Pspの欠損は精巢ヒストンのアセチル化に影響しアポトーシスを引き起こす
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	伊藤 俊治 (Itoh Shunji) (50275351)	関西医療大学・保健医療学部・准教授 (34438)	
研究分担者	畑村 育次 (Hatamura Ikuji) (80336883)	関西医療大学・保健医療学部・教授 (34438)	