

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15468

研究課題名(和文)腎臓可視化透明モデル動物を用いた先天性腎疾患に対するオーファンドラッグの創薬

研究課題名(英文) Drug discovery of orphan drug for congenital kidney disease using kidney visualization transparent model animal

研究代表者

丸山 彰一 (MARUYAMA, Shoichi)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10362253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓可視化透明ゼブラフィッシュを作出してin vivo表現型解析を基本技術とした先天性腎疾患治療薬の創薬基盤の創出を目指した。その結果、従来系統よりも丈夫で透明度の高い新規系統を作出できた。ゲノム編集による先天性ネフローゼ症候群モデルは研究期間内に作出できなかったが、リン輸送体変異体システムを用いて先天性全身石灰化モデル腎臓可視化透明ゼブラフィッシュを作出できた。稚魚を用いて化合物投与実験を行ったところ、化合物の腎毒性に応じて用量依存的な浮腫の発生、腎奇形、ネフロンの消失などを観察でき、腎臓可視化透明ゼブラフィッシュを利用した創薬基盤の実行可能性を確認できた。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop a novel drug discovery platform for medicine for congenital renal disease which was based on in vivo phenotype screening using kidney-visualized-transparent-zebrafish. As a result, we bred a new line of transparent zebrafish that is more growth efficiency and more transparency than conventional lines. Although, the gene editing-based congenital nephrotic syndrome model lines could not be generated during study period, the congenital whole-body calcification model transparent kidney visualized line was generated using a phosphorus transporter mutant line. As a result of a compound administration experiment using fry fish, it was possible to observe dose-dependent occurrence of edema, kidney malformation, disappearance of nephron, etc. according to the nephrotoxicity of the compound. These data demonstrated the feasibility of in vivo screening system using kidney visualized transparent zebrafish.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：透明モデル動物

1. 研究開始当初の背景

- (1) 急性腎障害および慢性腎臓病を問わず腎臓疾患対策領域には、多くのアンメットメディカルニーズが潜在する。他の疾患分野と同様に技術的限界、時間的限界およびコスト的限界が新規医薬品開発のボトルネックとなっている。これらの律速因子は、旧来から医学研究で汎用されている候補化合物のヒト培養細胞を用いた大規模 in vitro スクリーニングおよびマウスやラットなどの哺乳モデル動物を用いた in vivo 実験を組み合わせた創薬プロセスの限界とも言い換えることができる。このような旧来の創薬プロセスでは、候補化合物から製品となる医薬品が誕生する確率は数万分の1以下で、10年以上の時間とコストを要す。しかも、哺乳動物を大量に消費するため動物愛護の観点からも問題が少なくない。一方、近年、様々な生物の全ゲノムDNA配列が解読されたことを受け、多種多様な動植物が医学実験ツールとして利用できるようになっている。
- (2) 近年、インド原産の小型コイ科魚類の一種であるゼブラフィッシュは、マウス、ラットに次ぐ第三のヒトモデル実験動物として注目を集めており、発生学だけでなく、毒性学や医学創薬などの分野への利用が近年益々盛んになってきている。ゼブラフィッシュの実験ツールとしての特徴としては、飼育や取り扱いが簡便であること、解剖学的な臓器の構造が哺乳動物と非常に類似していること、全ゲノム情報が公開されていること、ヒトと比較的高い遺伝子相同性があること、多産で発生段階が同期した個体を容易に準備できること、個体発生が速いこと、体が小さいため一個体あたりの飼育コストや実験コストが格段に安いこと、体外から臓器を観察できる色素欠損透明系統がいること、各種分子生物学的介入実験が容易に実施でき近年開発されたゲノム編集も適応可能なこと、などが挙げられる。このような特徴からゼブラフ

ィッシュは新しい創薬基盤として大変注目されている。

- (3) 研究代表者らは、ゼブラフィッシュがもつ腎臓研究モデルとしての長所をフルに活かして本研究プランを立案した。すなわち、ゼブラフィッシュの腎臓は、受精2日後に完成し、3日後から排尿が始まるため、形態的にも機能的にも実験的な評価を高速に実施できること(図1)、低浸透圧環境に生息するため、軽度の腎機能低下でも明瞭な浮腫を呈して腎機能を外観から評価できること、腎臓可視化透明ゼブラフィッシュでは腎臓の形態形成異常を生産にわたって体外から詳細に観察できること、さらに、ゼブラフィッシュのゲノム編集は実施可能なこと、などを踏まえて、研究代表者らはこれらの長所を統合して先天性腎疾患モデルフィッシュを用いた腎臓の形態的・機能的フェノタイプアッセイ系を構築して実践することで、哺乳動物個体を用いたときより圧倒的なスピードとコストでドラッグスクリーニングを実施できる新しい創薬研究基盤の開発を目指して本研究を着想した。

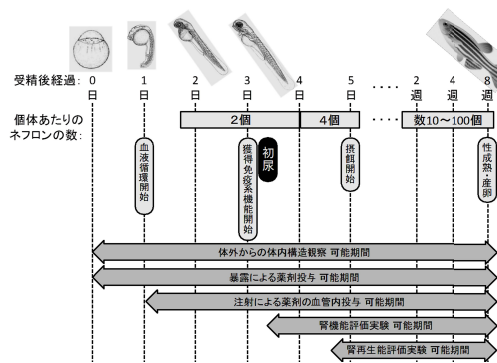


図1.ゼブラフィッシュの腎発生と実施可能な各種アッセイ系

ゼブラフィッシュは受精2日後で腎臓が完成し、3日後に排尿が始まるため、腎の形態形成と腎機能に影響を与える分子のドラッグスクリーニングを高速で実施できる。

2. 研究の目的

本研究では、アンメットメディカルニーズのある腎疾患に対するオーファン

ドラッグ候補分子の超低コストかつ超高速な創薬プロセスの実現に挑戦することを目的として、腎臓可視化透明ゼブラフィッシュをゲノム編集または変異体との交配を利用して先天性腎疾患モデル腎臓可視化透明ゼブラフィッシュを用意し、96 ウェルマイクロプレートと自動撮影顕微鏡を用いた腎臓表現型解析に基づいたハイスループット *in vivo* ドラッグスクリーニングを実践して、実験系のフィジビリティを検証する。

3. 研究の方法

(1) 先天性腎疾患モデルゼブラフィッシュの作成と評価

CRISPER/Cas9 システムにより腎臓可視化透明ゼブラフィッシュにゲノム編集を行って、先天性腎疾患モデルゼブラフィッシュの作成に取り組んだ。既に原因遺伝子が明らかにされているファミリー病、アルポート症候群、多発性嚢胞腎、ポンペ病などに注目し、原因遺伝子の配列情報に基づいてゼブラフィッシュのオソログ遺伝子に対して設計・合成したガイド RNA を Cas9 タンパク質と共に受精直後の胚にマイクロインジェクションしてゲノム編集を行った。初期腎臓が完成する受精 2 日後に、蛍光顕微鏡下で腎臓の形態を観察するとともに、ゲノム DNA 配列を確認して、標的遺伝子に変異が導入されてタンパク質レベルで機能破壊が生じていること(ノックアウト個体の作成成功)を調べた。

(2) 薬剤投与試験と表現型解析

腎臓可視化透明ゼブラフィッシュの稚魚を 96 ウェルプレートに収容して、各ウェルに飼育水で所定濃度に希釈した評価対象化合物を加えて、28 下で一定期間飼育し、原則として投与 48 時間後に表現型を観察した(図 2)。評価化合物は、まずは腎毒性物質として知られるゲンタマイシンなどを中心に投与した。

表現型の観察は腎構成細胞の GFP の分布と強度を観察した。また、体外から観察したときの腎臓の形状についても評価できる。併せて、浮腫の発生を形態学的に解析することで腎機能を間接的に評価することを試みた。

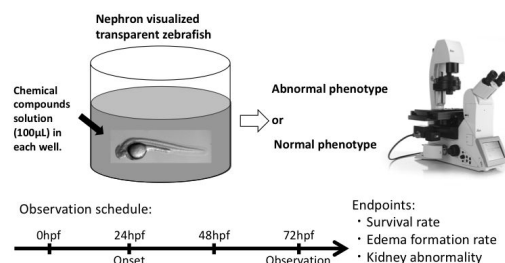


図 2. 薬剤投与と試験の概要

(3) 色素を用いた腎機能解析

稚魚または成魚の血管内に蛍光標識 70kDa デキストランを注射してから、化学物質の投与試験を行うことで、化学物質による腎臓機能への影響を色素の漏出量として評価することを試みた(図 3)。

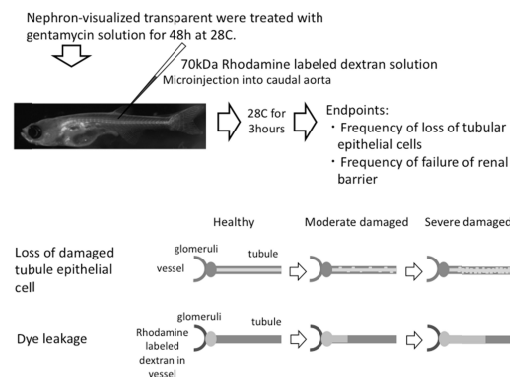


図 3. 色素を用いた腎機能評価

4. 研究成果

(1) 先天性腎疾患モデルゼブラフィッシュの作成と評価

研究開始直後から研究代表者らが所有していた Casper 種の産卵量や発生期生残率が Wildtype と比べて大きく劣るようになり、Casper 種から受精卵を取得して実験を進めることが困難になった。そこで、Casper 種に Wildtype のゴール

デン種を交雑して産卵量や生残率を回復させる為の品種改良に取り組んだ(図4)。その結果、Casper種とGolden種を交雑して得たGoldenCasper種は、通常のCasper種に比べて産卵量や生残率が大幅に回復し、Wildtypeと遜色のない飼育成績が得られた。さらに、GoldenCasper種はCasper種よりも体幹の透明度が高く、蛍光顕微鏡下での自家蛍光量も悪くなかった。



図4. 透明ゼブラフィッシュの改良育種手順

続いて、先行論文や成書を参考にしてCRISPER/Cas9システムによるゼブラフィッシュのゲノム編集に取り組んだが、期待通りには進まなかったため、研究1年目第三4半期頃にゲノム編集に加えて変異体との交雑による腎疾患モデルゼブラフィッシュの調達にも取り組んだ。すなわち、研究代表者らの研究室に所有していたリン酸トランスポーターであるSLC遺伝子の発現量に異常を来した変異体系統は若年齢で全身が石灰化する症状を呈し、成魚の早い時期に全身の浮腫が生じて、Wildtypeと比べて寿命が短い。この変異体系統は腎臓の細胞がGFPでラベルされていて、これをCasper種およびGoldenCasper種と交雑して、選抜育種を経て、透明系統である腎可視化疾患(石灰化)モデル透明ゼブラフィッシュを樹立した。

(2) 薬剤投与と試験と表現型解析

樹立した腎可視化石灰化モデル透明ゼブラフィッシュ稚魚を用いて、図5に示すようなスキームで薬剤投与時における腎臓関連指標の表現型解析を行った。図6には腎毒性物質であるゲンタマイシンを投与したときの浮腫発生率と死亡率を結果の一例として示した。ゲンタマイシンの濃度依存的に浮腫の重症

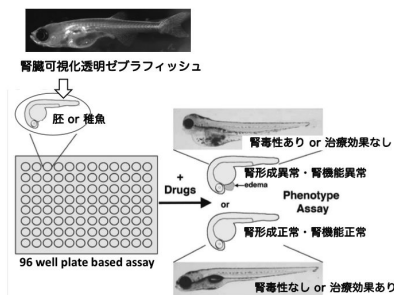


図5. 評価系の基本スキーム

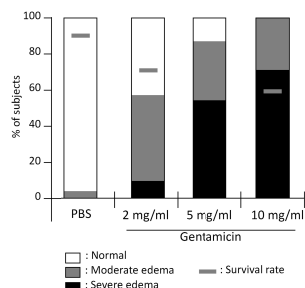


図6. 薬剤投与と実験の結果の一例

化と発生率の上昇、および死亡率の増加が認められた。重症化した個体では、腎臓の形態に異常を呈していた。浮腫および腎臓の形態を問わず、一度の観察または撮影で複数の表現型を一斉観察することができた。

(3) 色素を用いた腎機能解析

腎可視化石灰化モデル透明ゼブラフィッシュの稚魚および成魚を用いて、血管内に赤色標識70kDaデキストラン溶液を注射した後に化学物質を投与して、腎機能のin vivo評価に取り組んだところ、腎毒性物質(ゲンタマイシン)投与後に尿管上皮細胞が管腔内へ剥離脱落している様子を顕微鏡で観察することができた(図7A)。さらに、腎毒性を呈した糸球体からは赤色標識70kDaデキストランが近位尿管後端へ漏出し、その後、再吸収されている様子を観察できた。この観察から腎毒性は各ネフロンに対して一斉に及ぼすのではなく、ネフロンによって腎毒性を示すタイミングに時間的なズレがあることが示唆された(図7B)。

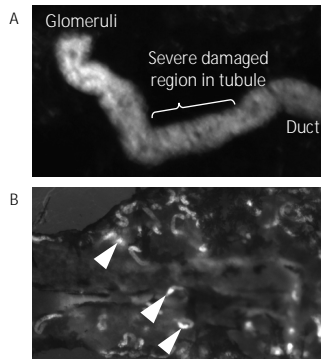


図7.色素を用いた腎機能解析の一例
 A: 薬剤障害による尿細管上皮細胞の脱落、B: 糸球体からの標識デキストランの漏出と再吸収(:漏出点)

(4) まとめ

本研究では、計画していたゲノム編集による病態モデル魚の作出を研究期間内に完了できなかったが、腎臓可視化透明ゼブラフィッシュを評価プラットフォームとした腎を標的とする化学物質の一斉 in vivo スクリーニング技術のフィジビリティは確認できた。今後は、病態モデル魚の調製、薬剤投与実験系の最適化、表現型観察の自動化などについて検討して課題を克服し、アンメットメディカルニーズのある先天性腎疾患に対して本システムを活用した創薬研究が進むことが期待される。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Shin'ichi Akiyama, Shoichi Maruyama,
 Development of Method for Assessing
 Chemical-Induced Toxicity against Kidney
 Cells by In Vivo Live Imaging Technique
 Using
 Nephron-Visualized-Transparent-Zebrafish,
 50th Annual Meeting of the American Society

of Nephrology (New Orleans, USA),
 2017/10/31-11/5.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

丸山 彰一 (MARUYAMA, Shoichi)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号: 10362253

(2)研究分担者

秋山 真一 (AKIYAMA, Shinichi)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師
 研究者番号: 20500010