

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16606

研究課題名（和文）慢性腎臓病抵抗性遺伝子の同定とその機能解析 -末期腎不全の予防へ向けて-

研究課題名（英文）Identification of genes associated with resistance to chronic kidney disease

研究代表者

佐々木 隼人（SASAKI, HAYATO）

北里大学・獣医学部・助教

研究者番号：20768048

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）：慢性腎臓病患者の増加は深刻な医療問題となっている。申請者はマウス遺伝学的手法により、これまでに腎機能低下の原因であるポドサイト傷害と、末期の腎障害である尿細管間質傷害に対する2つの抵抗性遺伝子座を見出していた。本研究では腎症感受性マウスと抵抗性マウスを用いた連鎖解析により、新規ポドサイト傷害抵抗性遺伝子座を見出した。さらに発現比較解析及びエクソーム解析により、それら遺伝子座における候補遺伝子の絞り込みを行った。これら責任遺伝子の同定は慢性腎臓病の予防法及び治療法の開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Increasing numbers of patients with chronic kidney disease has emerged as a social problem. Using mouse genetic method, I have identified two genetic loci resistant to podocyte injury and tubulointerstitial injury, respectively. In this study, a genome-wide linkage analysis of backcrosses between susceptible FVB/NJ- and resistant C57BL/6J-derived mouse strains to podocyte injury detected a novel major modifier locus on chromosome 10. To identify candidate genes for these genetic loci, I performed exome and transcriptome analyses comparing susceptible and resistant mouse strains. The identification of these responsible genes could lead to the development of new treatment strategies for chronic kidney disease.

研究分野：実験動物学

キーワード：慢性腎臓病 ポドサイト傷害 糸球体傷害 尿細管間質傷害

## 1. 研究開始当初の背景

腎臓の機能的な構成単位ネフロンは生後から増えることはなく、加齢に伴い徐々に減少する。すなわち、腎機能は加齢に伴い低下する。さらに、ネフロンの血液濾過機能を担うポドサイトは高度に分化した細胞であり、その恒常性は脆弱である。ネフロン減少や高血圧等の機能的負荷及び高血糖等の血液異常はポドサイトの傷害因子であり、ポドサイト傷害は腎機能の更なる低下を引き起こす。このようにして加齢や環境要因、さらに遺伝的要因により生じうる慢性的なポドサイト傷害は、腎障害を徐々に進行させ、最終的に腎臓は生理的な役割を果たすことができない末期腎不全に至る。腎機能停止までのこの過程が慢性腎臓病 (CKD) であり、ほぼ全ての腎症に共通する病態である。多様な多因子疾患である CKD の治療において、疾患原因に対して治療的なアプローチをすることよりも、CKD の進行を直接止める治療が広く効果的であると見込まれる。しかし、CKD の病態メカニズムは完全に解明されておらず、そのような治療法は確立されていない状況であった。

## 2. 研究の目的

ICGN マウスは腎症を自然発症し、最終的に末期腎不全となる CKD モデルマウスであり、疾患原因は *tensin2* 遺伝子の欠失によるポドサイトの傷害であることが明らかとなっている。ヒトの CKD において著しい人種差がある様に、本変異が引き起こす腎症の悪性度はマウス系統によって著しく異なることが報告されている。特に C57BL/6J (B6) マウスは実験マウスとして広く用いられている系統である一方、様々な腎症モデルに対して抵抗性を示すことで知られ、本変異が引き起こす腎症も例外ではなかった。これらの知見から CKD の進行を抑制する抵抗性因子を B6 マウスが有していると示唆されている。そこで本研究では、CKD の予防及び治療の研究基盤を確立することを目的として、マウス遺伝学的手法を用いて B6 マウスが有する CKD 抵抗性遺伝子の同定を試みた。

## 3. 研究の方法

これまでに、CKD 抵抗性系統である B6 マウスと ICGN マウスの交配群を用いた全ゲノム連鎖解析および B6 の染色体に由来する部分断片を ICGN マウスに導入したコンジェニック系統の解析により、マウス第 2 染色体上に、ポドサイト傷害に対して抵抗する遺伝子座と、CKD の終末病態である尿細管間質傷害に対して抵抗する遺伝子座が別々に存在することが判明している。

しかし、第 2 染色体上のポドサイト傷害抵抗性遺伝子座に関して、B6 由来のそれ単独では B6 マウス本体の様にポドサイト傷害をほぼ完全に抑えることはできず、第 2 染色体以外にポドサイト傷害抵抗性遺伝子座が存

在することが示唆されていた。これは先に行った連鎖解析において、CKD の病態が進行した高齢のマウスを表現型解析に用いており、さらに末期腎不全の病態を想定した表現型を量的形質に設定していたことが原因だと考えられた。そこで、尿細管間質傷害を呈する前の早期の病態において、ポドサイト傷害の指標である尿中アルブミン量を表現型とした連鎖解析を新たに実施し、未知のポドサイト傷害抵抗性遺伝子座の検出を行った。続いて、検出した遺伝子座を B6 由来に有するコンジェニックマウスの作出に着手した。また、抵抗性系統と感受性系統の糸球体における遺伝子発現を解析し、さらに位置的候補遺伝子の中から候補遺伝子を選定した。尿細管間質傷害抵抗性遺伝子座については、抵抗性系統と感受性系統の腎臓における遺伝子発現を解析した。初代培養尿細管上皮細胞及び尿細管上皮細胞株を用いて、候補遺伝子について *in vitro* の解析を行った。さらに候補遺伝子のノックアウトマウスを作出した。ICGN マウスはゲノム配列が未同定なため、発現比較解析で結果が得られない場合に備え、ICGN のエクソーム解析も行った。

## 4. 研究成果

*tensin2* 遺伝子の欠失を有する感受性系統と B6 系統マウスを用いて、8 週齢の早期病態における尿中アルブミン量を表現型として連鎖解析を行った。感受性系統は腎症に対して感受性が比較的高いと知られる FVB/NJ (FVB) マウスを用いた。B6 由来の親系統の尿からアルブミンがほとんど検出されなかったのに対し、FVB 由来の親系統の尿からは病的な量のアルブミンが検出された。一方、両系統の F1 マウスの尿からはアルブミンはほとんど検出されなかった。腎臓の組織学的解析では、B6 由来の親系統はほとんどの糸球体が正常であったが、一部の糸球体ではメサンギウム基質の増加がある程度見られた。FVB 由来の親系統は多くの糸球体で顕著な糸球体基底膜の肥厚とメサンギウム基質の増加が見られた。F1 マウスにおいては、正常な糸球体、メサンギウム基質が増加した糸球体、糸球体基底膜が肥厚した糸球体の存在が認められた。したがって、ポドサイト傷害を評価する上で、糸球体の組織学的評価は尿中アルブミン量より精度の高い方法だと言える。しかし、定量性の点において糸球体の複雑な組織学的傷害をスコア化することは困難であると判断し、尿中アルブミン量を連鎖解析の表現型に設定した。F1 マウスを FVB 由来の親系統に戻し交配し、174 匹の N2 マウス群の遺伝子型解析ならびに尿中アルブミン量の測定を行った。N2 マウス群の尿中アルブミン量は検出以下から極めて病的なレベルまで連続的な値を示し、約半数のマウスは B6 由来の親系統及び F1 マウスの尿中アルブミン量と同程度であった。連鎖解析の結果、第 10 染色体の 41 cM 付近の遺伝

マーカーに有意な連鎖が検出され、第2染色体の71 cM付近の遺伝マーカーにも示唆的な連鎖が検出された。後者の領域は先の研究で同定されたポドサイト傷害抵抗性遺伝子座と一致していた。そこで、第10染色体の領域と第2染色体の領域をいずれかヘテロで有するか否かの遺伝型で検定を行ったところ、より強い連鎖が認められた。第2染色体と第10染色体の領域のそれぞれの遺伝型について、ともにFVB/FVBホモ型のN2マウス群よりいずれかFVB/B6ヘテロ型のN2マウス群の方が尿中アルブミン量は低く、ともにヘテロ型のN2マウス群はさらに低い尿中アルブミン量を示した。第2染色体の領域のみヘテロ型とともにホモ型のN2マウス群の尿中アルブミン量の間に有意な差は認められなかったが、前者の中央値(0.71 g/g クレアチニン)は後者の中央値(2.4 g/g クレアチニン)の約3分の1であり、減少傾向を示した。以上の結果より、ポドサイト傷害抵抗性遺伝子座として第2染色体の領域に加えて第10染色体の領域が新たに見出され、これら遺伝子座はいずれかB6由来であれば、抵抗性に働き、ともにB6由来であればB6マウス本体に類する強力な抵抗性を発揮することが示唆された。現在、これら遺伝子座をB6由来に有するFVBコンジェニックマウスを作製中である。また、4週齢のB6由来の親系統とFVB由来の親系統から糸球体を回収し、RNA-seq解析による網羅的な遺伝子発現解析を行った。FVB由来の親系統の糸球体で発現が有意に高い遺伝子群についてGO解析を行ったところ、アクチン架橋の形成やアクチン線維束の形成、細胞間結合や細胞遊走等、細胞骨格に関与する遺伝子群が多く含まれていた。これはポドサイトの早期の変性を反映していると推察される。2つの遺伝子座の位置的候補遺伝子のうち、両系統の間で発現量の差異が認められたのはそれぞれ十数個である。このうち、他の腎症モデルやヒトのCKDでも発現変動が見られる遺伝子はいくつか含まれており、それらはポドサイトの傷害マーカーだと考えられる。残りの発現差異遺伝子群については、糸球体のRT-PCR解析において野生型のB6とFVBマウスの間でも発現量の差が有るものと無いものに分かれた。後者は*tensin2* 遺伝子の欠失に特異的なポドサイトの変化だと考えられる。今後は作製中のコンジェニックマウスの解析を行い、ポドサイト細胞株を用いた解析により候補遺伝子のさらなる絞り込みを行う予定である。

尿細管間質傷害抵抗性遺伝子座については、この遺伝子座をB6由来に持つICGNコンジェニックマウスと尿細管間質傷害を呈するICGNマウス(両系統はともに重度のタンパク尿を発症している)から腎臓を採取し、位置的候補遺伝子についてRT-PCR解析を行った。位置的候補遺伝子のうち、発現量に有意な差があったのはコーディング遺伝子

では1個のみ、長鎖ノンコーディング(lnc)RNA遺伝子では3個であり、いずれもICGNマウスで発現が高かった。lncRNA遺伝子は3個中1個のみクローニングに成功したが、そのlncRNAは発現差があったコーディング遺伝子のアンチセンスRNAであった。当該コーディング遺伝子がコードするタンパクに対する腎臓の免疫組織染色では、尿細管上皮に発現が認められ、ICGNマウスでは染色性が低下していた。このことから、当該タンパクの翻訳はアンチセンスRNAによって抑制を受けていることが示唆された。次に、B6及びICGN、FVBマウスから回収した初代培養尿細管上皮細胞及びB6系統マウスから樹立した尿細管上皮細胞株に当該コーディング遺伝子を標的とするsiRNAを導入したところ、いずれの実験でも間葉系マーカーである $\alpha$ -SMAの上昇がウェスタンブロッティングにより確認され、当該タンパクのノックダウンにより尿細管上皮細胞の上皮間葉転換が誘導されることが示唆された。続いて、CRISPR/Cas法により当該コーディング遺伝子のノックアウトマウスをB6マウスから作出し、ノックアウト系統が2系統得られた。しかし、作出したノックアウト系統において*in vitro*実験から予想される近位尿細管上皮の異常は認められなかった。現在、ノックアウト系統における実験的なCKDモデルの解析に着手している。

一方、ICGNマウスはゲノム配列が未同定であるため、本研究を進める上で都合が悪かった。そこで、ICGNのエクソーム解析を行ったところ、B6の配列をレファレンスとしてミスセンス変異がある尿細管間質傷害抵抗性遺伝子座の位置的候補遺伝子は18個存在した。そのうち17個は、ICGNマウスとICGNコンジェニックマウスの両系統の腎臓において発現が確認されている。さらにその17個のうち、他の腎症モデルやヒトのCKDにおいて発現が上昇する遺伝子は2個存在した。それらの遺伝子について、ミスセンス変異はFVB等、他の感受性系統と一致しており、そのうち1個の遺伝子は上皮間葉転換との関連が報告されている。尿細管間質傷害抵抗性の原因がタンパクの機能変化である場合、当該遺伝子が候補遺伝子として有力である。現在、この候補遺伝子について尿細管上皮細胞における*in vitro*解析を進めている。

今後、いずれの遺伝子座も最終的に遺伝子改変マウスの作出及び腎症モデルにおける表現型解析により責任遺伝子を同定する予定である。責任遺伝子の同定は慢性腎臓病の予防法及び治療法の開発に貢献することが期待される。

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1件)

Takahashi Y, Sasaki H, Okawara S, Sasaki N. Genetic loci for resistance to podocyte injury caused by the tensin2 gene deficiency in mice. *BMC Genetics* 19:24, 2018. 査読有  
DOI: 10.1186/s12863-018-0611-1

〔学会発表〕(計3件)

佐々木隼人 他、Trp53 ノックアウトマウスを用いた新規近位尿細管上皮細胞株の樹立、日本実験動物学会、2018

高橋悠記、佐々木隼人 他、Tns2 欠損に起因する腎症に対する抵抗性遺伝子座の同定、日本獣医学会、2017

佐々木隼人 他、C57BL/6J マウスが有する尿細管間質傷害抵抗性遺伝子の検索、日本獣医学会、2016

出願状況 (計3件)

名称：近位尿細管上皮細胞株及びその使用  
発明者：佐々木宣哉、佐々木隼人  
権利者：北里大学  
種類：特許  
番号：特許願 2018-93479 号  
出願年月日：平成 30 年 5 月 15 日  
国内外の別： 国内

名称：腎繊維症の治療又は予防剤及びスクリーニング方法  
発明者：佐々木宣哉、佐々木隼人  
権利者：北里大学  
種類：特許  
番号：特許願 2016-238229 号  
出願年月日：平成 28 年 12 月 8 日  
国内外の別： 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 隼人 (HAYATO, Sasaki)  
北里大学・獣医学部獣医学科・助教  
研究者番号：20768048

(4)研究協力者

高橋 悠記 (YUKI, Takahashi)  
大川原 志織 (SHIORI, Okawara)