

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K11141

研究課題名(和文) 食事性刺激に起因するDNA変異に基づく多発性嚢胞腎症発症機序の検証

研究課題名(英文) Validation of a mechanism for the pathogenesis of multiple cystic kidney disease based on DNA mutations induced by dietary stimulation.

研究代表者

釘田 雅則 (Kugita, Masanori)

藤田医科大学・病態モデル先端医学研究センター・講師

研究者番号：50440681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：多発性嚢胞腎症(PKD)は、PKD1遺伝子などの責任遺伝子に変異が入ることにより発症する。PKD1遺伝子の変異は、約11%が翻訳が止まるナンセンス変異であり、残りの大多数はアミノ酸置換型の変異である。ナンセンス変異の方がPKDの病態が重くなることは報告されているが、アミノ酸置換型の変異はどの部位が病態に影響を及ぼすかはわかっていなかった。そこで、Pkd1遺伝子に1アミノ酸変異が入るノックインマウスを複数作成して、解析することにより、PKDの病態への影響を調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎臓に多数の嚢胞ができる多発性嚢胞腎症(PKD)は、PKD1及びPKD2遺伝子に変異が入ることにより発症する。本研究では、PKD1及びPKD2遺伝子産物を作る複合体の構造とヒトPKD患者のデータベースを参照することに各種Pkd1ノックインマウスを作成して、1アミノ酸を変えるだけでPKDの病態が異なることを示した。これらPkd1ノックインマウスを用いてPkd1遺伝子の機能解析を進めていけば、PKDの発症機序や新規治療薬の開発につながると思われる。

研究成果の概要(英文)：Polycystic kidney disease (PKD) is caused by mutations in the PKD1 gene. Approximately 11% of PKD1 mutations are nonsense mutations, which stop translation, and the majority of the rest are amino acid substitution mutations. Nonsense mutations cause more severe PKD. However, it was not known which sites of amino acid substitution mutations influence the pathogenesis of PKD. Therefore, we generated several knock-in mice carrying a single amino acid mutation in the Pkd1 gene and analyzed them to determine the effect of the mutation on the pathogenesis of PKD.

研究分野：Molecular biology

キーワード：polycystic kidney animal model

1. 研究開始当初の背景

多発性嚢胞腎症 (PKD) は、腎臓をはじめとする多数の臓器に嚢胞を多発する。腎臓では高頻度で発症する遺伝性の疾患の 1 つであり、常染色体優性 (AD) PKD と常染色体劣性 (AR) PKD の 2 種類に分けられる。その責任遺伝子として、ADPKD は PKD1、PKD2、ARPKD は PKHD1 が報告されている。ARPKD のほとんどの患者は乳幼児期に発症し、お亡くなりになることが多い。一方、ADPKD 患者の病態の発症時期や進行速度は、人それぞれである。一般的に、ADPKD 患者は、50 代で ADPKD の確診を受け、病態進行に伴い最終的には腎不全に至る。しかし、30 代で ADPKD を発症する患者もいれば、お亡くなりになるまで気が付かない程 ADPKD の進行が遅い患者もいる。

ADPKD の発症時期や進行速度が異なる原因として、食生活の影響と体細胞変異の影響が考えられている。ADPKD は慢性腎臓病 (CKD) に含まれており、他の CKD と同じく食生活 (塩分やタンパク質など) の影響を受けると考えられている。そのため、患者の食生活の違いによる腎臓に対する負荷の違いが病態に現れていると考えられている。もう一つの体細胞変異の影響は、ADPKD のツーヒット説に由来する。ツーヒット説とは、生殖細胞由来の PKD 責任遺伝子の変異 (1 ヒット) に体細胞由来の変異 (2 ヒット) が加わり、PKD 責任遺伝子の両対立遺伝子が機能しなくなることにより病態が発症する考えである。この説で考えると、体細胞変異の蓄積量に依存して、PKD の発症時期や病態の進行速度が異なると考えられる。

食生活の影響は、腎臓への生理的な負荷や高血圧などにより二次的な負荷がメインであり、分子レベルでの影響は考慮されていなかった。また、ツーヒット説における体細胞変異についても PKD 責任遺伝子のどの部位の変異がどのくらいの影響を及ぼすかが不明瞭なままであった。これらを解明することは、PKD の発症機序や病態の進行速度を解明する上で重要と考えられた。

2. 研究の目的

体細胞変異 (DNA 変異) の主な原因は、紫外線や活性酸素などによる DNA 損傷時の修復ミスである。活性酸素は、脂質の過剰摂取や高タンパク質による腎臓の過負荷によっても発生する。そのため、栄養素比率の異なる食事性刺激は DNA 変異に影響を及ぼすことが期待される。そこで本研究では、食事性刺激が腎臓にどのような影響を与えるか、また、PKD 責任遺伝子の変異箇所により病態にどのような影響を与えるかを新規 PKD モデル動物を作成することにより、逆遺伝学的に DNA 変異と PKD の病態の関連性を検証することとした。

3. 研究の方法

(1) 食事性刺激が腎臓に与える影響について

CD-1 (ICR) マウスを 4 群に分け、7-20 週齢まで同一カロリー (380kcal/100g) で栄養素比率の異なる以下の飼料を等量与えた。CONT 群: コーンスターチ 62%、スクロース 10%、大豆油 4%、セルロース 5% の AIN93M 試料、LARD 群: コーンスターチ 31%、スクロースなし、ラード油 28%、セルロース 28% の AIN93M 試料、SOY 群: コーンスターチ 31%、スクロースなし、大豆油 28%、セルロース 5% の AIN93M 試料、SUCUROSE 群: コーンスターチ 31%、スクロース 41%、大豆油 4%、セルロース 5% の AIN93M 試料。糖尿病を誘発し、腎臓への負荷を大きくするために、17 週齢及び 18 週齢にてストレプトゾトシンを 100mg/kg 体重にて腹腔内投与を行なった。20 週齢にて動物を安楽死後、血清及び腎臓を回収した。血清は、インスリン、トリグリセリド、総コレステロール、アラニントランスアミナーゼ、アスパラギン酸トランスアミナーゼ、クレアチン、尿素窒素量の測定に使用した。腎臓はパラフィン包埋後、薄切を行い、ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色及びリソソームのマーカーである LAMP1 で免疫染色を行なった。統計的有意差は、一元配置分散分析と Tukey 検定によって決定した。

(2) 新規 PKD モデル動物作成による PKD 責任遺伝子の変異箇所と病態の関連性について

薬剤投与により過排卵を誘起した C57BL/6J のメスマウスから卵子、オスマウスから精子を回収し、体外受精を行なった。媒精 6 時間後、正常な受精卵を回収し、凍結保存を行なった。凍結受精卵を融解後、Cas9 タンパク質、切断部位を指定する crRNA と Cas9 認識部位である tracrRNA を融合させた sgRNA、ノックイン用の ssDNA を TAKE 法を用いて導入した。ssDNA は Pkd1 遺伝子に以下の変異が入るように設計した。RC: 3277 番目のアルギニン (R) をシトシン (C) に変換する変異 (AGA TGC)、RE: 3277 番目の R をグルタミン酸 (E) に変換する変異 (AGA GAA)、WR: 3263 番目のトリプトファン (W) を R に変換する変異 (TGG CGG)、WC: 3263 番目の W を C に変換する変異 (TGG TGT)。Cas9 タンパク質などを導入した受精卵は培養を行い、2 細胞期胚まで成長させた。正常な 2 細胞期胚を選別し、ICR の偽妊娠マウスに移植した。出産日に自然分娩していない個体については帝王切開を行い、胎児を回収、蘇生後、里親に預

けた。この際、胎生致死と思われる胎児がいた場合、体部を回収した。胎生致死胎児の体部はパラフィン包埋後、薄切を行い、HE染色を行なった。得られた胎児及び胎生致死の胎児の Pkd1 遺伝子の変異箇所はシークエンスにより確認した。繁殖適齢期まで成長したノックインマウスは、C57BL/6J と交配を行い、維持・繁殖を行なった。

20 週齢にてノックインマウスを安楽死後、血清と腎臓を回収した。血清は、クレアチニン及び尿素窒素量の測定に使用した。腎臓はパラフィン包埋後、薄切を行い、HE 染色及びシリウスレッド染色を行い、嚢胞面積及び線維化領域の測定に使用した。

4. 研究成果

(1) 食事性刺激が腎臓に与える影響について

CONT 群、LARD 群、SOY 群、SUCROSE 群において、最終体重、総エネルギー摂取量、総水分摂取量、測定した各種生化学的な血液マーカーに有意差はなかった。ただし、インスリンについては、検出限界値以下の群があったため、統計解析が行えなかった。

Sucrose 群と LARD 群の腎臓では他の群と比べて、主に近位尿細管の上皮細胞に空胞が多数観察された。Sucrose 群 (61.5 ± 21.3 個/視野) は、CONT 群 (21.3 ± 5.8 個/視野) 及び SOY 群 (20.2 ± 8.6 個/視野) と比べて有意に増加していた。LARD 群 (50.0 ± 28.5 個/視野) は、SOY 群と比べて有意に増加していた。一方、CONT 群と比べて差は大きい有意差は $P=0.057$ であった。これらの空胞はリソソームのマーカーである LAMP1 陽性であった。

高脂肪食や高スクロース食を与えた動物では、腎臓の尿細管領域に脂質が蓄積することが報告されている。また、この原因として、オートファジー - リソソーム分解経路の機能不全が報告されており、その際に液胞が LAMP1 で陽性になることが報告されている。これらの研究はコントロールよりも高カロリー食を与えた結果、もしくは肥満になりやすい動物を用いた結果である。本研究により、正常マウス(非肥満マウス)においても腎臓に液胞が見られたことから、腎臓に与える影響はカロリーではなく栄養素に依存することが示唆された。また、オイルの種類によって、液胞の個数が異なる点も腎臓への影響が栄養素に依存していることを示唆する。これらの結果をまとめ、論文として報告した。

(2) 新規 PKD モデル動物作成による PKD 責任遺伝子の変異箇所と病態の関連性について

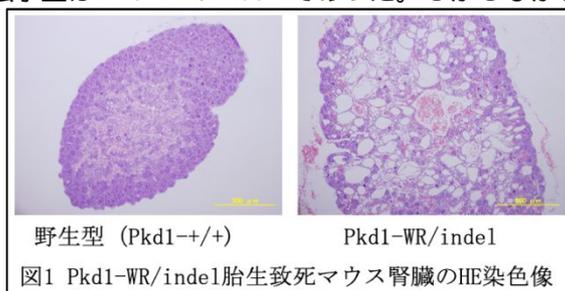
PKD モデル動物作成のために、様々な Pkd1 ノックアウトマウスが作られてきた。これらの Pkd1 ノックアウトマウスの特徴として、ヘテロ ($Pkd1+/-$) では腎臓にほとんど病態が現れず、ホモ ($Pkd1-/-$) では胎生致死になることが挙げられる。そのため、ホモでの胎生致死を避けるためにコンディショナルノックアウトマウスも作成されている。しかし、これらのマウスでは、Pkd1 遺伝子の変異箇所と病態の関連性を検討することはできなかった。その後、ヒト PKD 患者のデータベースを参考にして Pkd1 遺伝子の 3277 番目の R を C に変化させる変異 (AGA TGC) を加えたノックインマウスが作成された。このマウスのヘテロ ($Pkd1-RC/+$) はノックアウトマウス同様、ほとんど病態を示さないが、ホモ ($Pkd1-RC/RC$) は 3 ヶ月齢から発症し、約 1 年で明らかな病態を示す。このノックインマウスが開発されたことにより、この変異を中心に病態との関連性を調べることにした。

PKD の責任遺伝子 PKD1 及び PKD2 の産物である PC1 及び PC2 は複合体を形成する。この複合体の立体構造は報告されているため、3277 番目の R を中心に立体構造への影響が予測される変異を加えたノックインマウスを作成した。Pkd1-RC マウスは PKD の発症が報告されているため、ポジティブコントロールとして作成した。Pkd1-RE マウスは 3277 番目の変異箇所が病態にどのような影響を与えるかを調べるために作成した。立体構造の専門家より 3263 番目の W が 3277 番目の R と構造的に相互作用がある知見を得た。また、この部位はヒト PKD 患者のデータベースに変異が登録されていた。そこで、PKD を発症する新たな変異箇所になり得るかを検証するために、Pkd1-WR 及び Pkd1-WC マウスを作成した。

CRISPR-Cas9 によるゲノム編集は、DNA 修復時のミスに依存するため、確率論になる。そのため、対立遺伝子の片方はノックインされているが、もう片方は DNA 修復が上手くいかず、塩基の挿入/欠失 (indel) によるフレームシフトが起こることもある。

Pkd1-WR マウス作成時に胎生致死と思われるマウスを得た。このマウスの腎臓を解析した結果、嚢胞が多発していた (図 1 参照)。遺伝子型は Pkd1-WR/indel であった。しかしながら、

20 週齢の Pkd1-WR/+マウスの腎臓では、管の拡張らしきものは観察されるが顕著な病態は見られなかった。同じ箇所の変異である Pkd1-WC/+マウスの 20 週齢の腎臓では、管の拡張らしきものも観察されなかった。これらのことは、同じ部位でも変異するアミノ酸が異なることにより病態が異なることを示唆する。また、Pkd1-WR/indel が胎生致死になっていることより、1 アミノ酸を変えるだけでも、ノックアウトと同

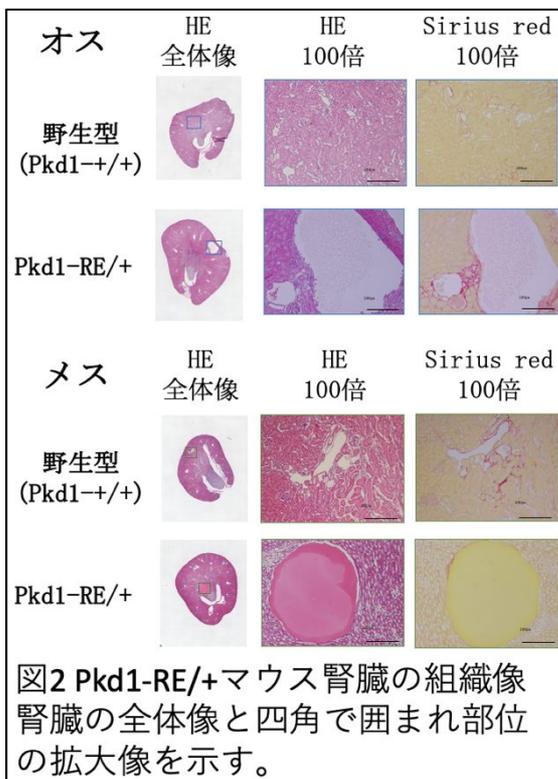


様の機能消失が起こっていると考えられる。

20週齢 Pkd1-RE/+マウスの腎臓では、オスでは皮質側に、メスでは髄質側に大きな管の拡張が観察された(図2参照)。病態の指標として、腎体重比、嚢胞面積、線維化領域、腎機能の指標としてクレアチン、尿素窒素量を調べたが、正常動物と比して有意な差はなかった。また、Pkd1-RE/RE マウスは生まれてこないため、耐性致死と考えられる。これらの結果も、Pkd1-RC マウスと異なる病態を示しているため、同じ部位でも変異するアミノ酸が異なることにより病態が異なることを示唆する。

Pkd1-RE マウス作成時に、予想通りの変異である RE と予想外の変異である 3278 番目のバリン (V) を E に変える変異 (GTC GAG) が入った Pkd1-RE/VE マウスを得た。このマウスから Pkd1-VE/+ 及び Pkd1-VE/VE マウスを作成し、腎臓を観察したが、管の拡張は観察されなかつた。そのため、PC1 及び PC2 の複合体の構造に影響を与える部位のみ病態に影響すると考えられる。

PKD の病態は、Pkd1 遺伝子の翻訳が止まる truncated 型の変異 (ナンセンス) の方が、翻訳が続く nontruncated 型の変異 (アミノ酸置換) より悪化することが報告されている。しかし、PKD1 の変異の内、ナンセンスが占める割合は約 11% と少ない。PKD1 遺伝子と病態の関係性を調べる上では、大多数を占めるアミノ酸置換型の変異が病態にどのような影響を与えるかが重要である。本研究により、PC1 及び PC2 の複合体の構造に影響を与える部位及びヒト PKD 患者のデータベースを参照して Pkd1 遺伝子に変異を入れることにより、病態の異なるマウスを作成できることを示した。本研究では組織学的解析が主であったが、今後、これらのマウスを用いて、分子生物学的解析を行い Pkd1 遺伝子の機能解析を進めていけば、PKD の発症機序の解明や新規治療薬の開発につながると考える。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 YOSHIMURA Aya, YAMAGUCHI Tamio, KUGITA Masanori, KUMAMOTO Kanako, SHIOGAMA Kazuya, OGITSU Naomichi, YONEDA Misao, MIURA Toshihiro, NAGAMURA Yoichi, NAGAO Shizuko	4. 巻 67
2. 論文標題 High Levels of Dietary Lard or Sucrose May Aggravate Lysosomal Renal Injury in Non-Obese, Streptozotocin-Injected CD-1 Mice Provided Isocaloric Diets	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 243 ~ 248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3177/jnsv.67.243	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagao Shizuko, Kugita Masanori, Kumamoto Kanako, Yoshimura Aya, Nishii Kazuhiro, Yamaguchi Tamio	4. 巻 14
2. 論文標題 Increased salt intake does not worsen the progression of renal cystic disease in high water-loaded PCK rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0207461	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Aya Yoshimura, Masanori Kugita, Hisateru Yamaguchi, Kazuki Nakajima, Kanako Kumamoto, Tamio Yamaguchi, Kazuo Takahashi, Yukio Yuzawa, Shizuko Nagao
2. 発表標題 3. Altered cellular signaling pathways identified by proteomics and phosphor-proteomics in a rat model of diabetic kidney disease.
3. 学会等名 Kidney Week 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tamio Yamaguchi, Aya Yoshimura, Masanori Kugita, Kanako Kumamoto, Kazuya Shioyama, Kyongtae T. Bae, Shizuko Nagao
2. 発表標題 Comparison of the effect of calorie matched high saturated-fat and high unsaturated-fat diets on lysosomal renal injury in non-obese, streptozotocin-injected CD-1 mice
3. 学会等名 Kidney week 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉村 文、釘田 雅則、熊本 海生航、坂田 美和、長尾 静子
2. 発表標題 食塩感受性高血圧の遺伝的背景を持つ新規ARPKDモデル動物
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉村 文、山口 太美雄、釘田 雅則、熊本 海生航、塩竈 和也、荻津 直通、三浦 俊宏、米田 操、長村 洋一、長尾 静子
2. 発表標題 同一摂取カロリーでラードとスクロースの比率を高めた場合の非肥満糖尿病マウスの血糖動態と腎傷害発現
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 釘田 雅則、熊本 海生航、吉村 文、中嶋 和紀、高橋 和男、湯澤 由紀夫、長尾 静子
2. 発表標題 ネフロン癆モデル動物pcyマウスの多発性嚢胞腎における代謝産物の網羅的解析
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 釘田 雅則、熊本 海生航、吉村 文、中嶋 和紀、高橋 和男、湯澤 由紀夫、長尾 静子
2. 発表標題 2種類の繊毛病モデル動物を用いた多発性嚢胞腎における代謝産物の網羅的解析
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 釘田 雅則、熊本 海生航、吉村 文、長尾 静子
2. 発表標題 多発性嚢胞腎症モデル動物PCKラットにおける嚢胞形成関連代謝産物の探索
3. 学会等名 第90回東海実験動物研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shizuko Nagao, Masanori Kugita, Kanako Kumamoto, Aya Yoshimura, Tamio Yamaguchi, Kazuki Nakajima, Kazuo Takahashi, Yukio Yuzawa
2. 発表標題 Glucose metabolic profiles in renal tissue of an orthologous PCK rat model of human PKD using metabolic and proteomic analyses.
3. 学会等名 Kidney week 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yu Ishimoto, Akira Shimizu, Masanori Kugita, Shizuko Nagao, Kenjiro Honda, Reiko Inagi, Masanomi Nangaku, Saori Nishio, Haruna Kawano, Shigeo Horie, Tomoko Kasahara, Kenji Osafune, Junichi Hoshino, Yoshifumi Ubara
2. 発表標題 Mitochondrial Morphological Abnormality in Cyst Epithelial Cells of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Patients.
3. 学会等名 Kidney week 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 釘田雅則、熊本海生航、吉村 文、中嶋和紀、高橋和男、湯澤由紀夫、長尾静子
2. 発表標題 多発性嚢胞腎症モデル動物PCKラットの腎臓における代謝産物解析～中心炭素代謝経路について～
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 釘田雅則、熊本海生航、吉村 文、山口太美雄、長尾静子
2. 発表標題 多発性嚢胞腎症モデルPCKラットの腎臓におけるメタボローム解析 グルコース代謝経路についてー
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊本海生航、吉村 文、釘田雅則、長尾静子
2. 発表標題 嚢胞性腎疾患モデルラットの腎臓における嚢胞形成と一次繊毛長の関係
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018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	熊本 海生航 (Kumamoto Kanako) (10469322)	藤田医科大学・病態モデル先端医学研究センター・講師 (33916)	
研究 分担者	吉村 文 (Yoshimura Aya) (90466483)	藤田医科大学・病態モデル先端医学研究センター・講師 (33916)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------