

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22618

研究課題名（和文）蛋白尿可視化透明モデル動物による特発性巣状分節性糸球体硬化症の液性病因の解明

研究課題名（英文）Screening of humoral pathogenesis of idiopathic focal segmental glomerulosclerosis by proteinuria visualized 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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：特発性巣状分節性糸球体硬化症（FSGS）は、腎移植しても半数の患者が数日で再発する極めて治療が難しい腎疾患である。本研究では、FSGSの病態理解に向けて、過去の知見から患者血中にその存在が予想されているFSGSの責任分子となる液性病因の同定に挑戦した。本研究では、申請者らが発明したネフロン可視化透明ゼブラフィッシュを用いたin vivoアッセイを技術的基盤として液性因子の探索を行った。その結果、研究期間内に液性因子の同定には至らなかったが、FSGSや他腎疾患の患者血漿の一部は当該ゼブラフィッシュに蛋白尿を誘導することを見出し、患者血中に液性因子が存在することの傍証を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、糸球体バリア透過性亢進に係る未知の液性因子の探索に申請者らが発明した新規モデル動物であるネフロン可視化ゼブラフィッシュを用いたin vivoスクリーニングシステムが有用であることのフィジビリティを確立できた点、ならびに、FSGSや他腎疾患の患者血液にゼブラフィッシュの糸球体バリア透過性を亢進させる液性因子が存在することの傍証が得られた点である。本研究はFSGSの液性因子同定に資するものであり、今後の診断法や治療法の開発に貢献した点で社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：Idiopathic focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) is an extremely difficult-to-treat renal disease in which half of patients relapse within a few days after kidney transplantation. To understand the pathogenesis of FSGS, this study challenged the identification of the humoral etiologic agent responsible for FSGS, the molecule predicted to be present in patient blood based on previous findings. In this study, the in vivo assay using nephron-visible transparent zebrafish, which was invented by us, was used as the technical basis for the search for the humoral factors. As a result, although we could not identify the liquid factor within the study period, we found that a part of plasma from patients with FSGS and other renal diseases induced proteinuria in the said zebrafish, providing collateral evidence for the presence of the liquid factor in the patients' blood.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：巣状分節性糸球体硬化症 液性因子 巣状分節性糸球体硬化症

1. 研究開始当初の背景

- (1) 過去の知見から特発性巣状糸球体硬化症 (FSGS) の液性病因が患者血液に存在することが確実視されている。特発性 FSGS は、難治性ネフローゼ症候群の代表的原疾患であり、腎移植しても半数の患者が数日で再発する極めて治療が難しい腎疾患である。液性因子は糸球体バリアの透過性を亢進する分子とされている。2010 年代前半に suPAR が FSGS の液性因子として有望視されたことがあるが、現在では否定されている。その後も、分析科学が飛躍的に進歩したにもかかわらず液性因子の同定は一向に進んでいない。
- (2) ゼブラフィッシュはインド原産の小型コイ科魚類の一種で、ハイスループット in vivo 実験に適応できるヒトモデル実験動物として注目を集めており、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ること、などが挙げられる。
- (3) 申請者らは、早くから魚類を腎臓病研究のモデル動物として利用することに注目してきた。ゼブラフィッシュが腎臓病研究のモデル動物として優れている点は、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するので外観から腎機能を評価できること、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誕にわたって体外から詳細に観察できること、さらに、ゼブラフィッシュは遺伝子改変が実施可能なこと、などが挙げられ、腎臓の研究モデル動物として優れた特徴を持っている (図 1)。全身が透明で腎臓を蛍光タンパク質で可視化した“ネフロン可視化透明ゼブラフィッシュ”を用いた腎ドラッグスクリーニング研究を実践してきた (平成 27 年度日本腎臓学会総会優秀演題賞)。本研究では、ゼブラフィッシュを用いた in vivo スクリーニングの実験手法を応用して特発性 FSGS の液性病因を同定することを着想した。事前検討の結果、“ネフロン可視化透明ゼブラフィッシュ”を用いて糸球体から漏出する蛋白量を可視化定量する技術の基礎を開発できたことから本申請に至った。

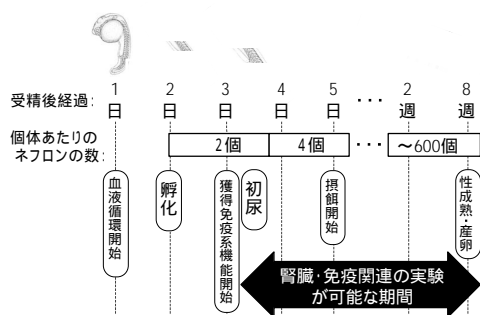


図 1. ゼブラフィッシュはヒト腎臓病研究のモデルとなり得る。

2. 研究の目的

独自に開発した新規腎毒性評価バイオアッセイ法である“ネフロン可視化透明ゼブラフィッシュによる in vivo スクリーニング”を基盤技術として採用し、患者血清の構成成分の中から特発性 FSGS の液性因子の探索と同定を目指した。

3. 研究の方法

(1) ネフロン可視化透明ゼブラフィッシュの生産安定化検討

ネフロン可視化透明ゼブラフィッシュは、申請者らが作出したトランスジェニックフィッシュである。透明系ゼブラフィッシュである Casper を、尿細管上皮細胞に特異的に発現する遺伝子のプロモーターに蛍光タンパク質の cDNA を連結したコンストラクトで形質転換して、選抜育種により、固定したものである。ネフロン可視化透明ゼブラフィッシュの特徴として、産卵数が少なく、初期発生時の正常発生率が野生型予比べて低い弱点があった。そこで、育種的手法によりネフロン可視化透明ゼブラフィッシュの産卵数と正常発生率の改善を試みた。また、並行して、飼育システムとアッセイシステムの改良を検討した。

(2) ネフロン可視化透明ゼブラフィッシュを用いた糸球体バリア透過性亢進物質評価モデルの最適化検討

ゼブラフィッシュは受精後 2 日に一對のネフロンが形成され、その後、発生過程の進行に応じてネフロン数が増加する (図 1)。申請者らが考案したネフロン可視化透明ゼブラフィッシュを用いた糸球体バリア透過性亢進物質のスクリーニングシステムでは、試薬や血清などの被検体を所定濃度で含む水溶液に蛍光標識デキストランを加えた混合液を、ガラスキャピラリーによるマイクロインジェクションにて受精後 2 日以降のネフロン可視化透明ゼブラフィッシュの血管内に投与して、マイクロプレートやシャーレに収容して 28 下

で3~72時間培養した後に以下の3つの評価法で糸球体バリアの透過性亢進活性を評価する(図2)。評価法1:糸球体の血管から尿細管腔へ蛍光標識デキストランが漏出する量を顕微鏡下にて観察する。ネフローゼ症候群レベルが強いほど、多くの蛍光標識デキストランが漏出するため、漏出量に応じて蛍光標識デキストランにより変色した尿細管の長さが変わるため、その距離を糸球体バリア透過性亢進スコアとして評価した。評価法2:ネフローゼ症候群の発生に伴って現れるゼブラフィッシュの胸部浮腫の大きさを測定して評価する。ネフローゼ症候群レベルが強いほど、浮腫の大きさが大きくなるため、浮腫の直径や撮影後の面積を糸球体バリア透過性亢進スコアとして評価した。評価法3:飼育水中へ漏出する蛍光標識デキストランの量をプレートリーダーを用いて測定し、測定値を糸球体バリア透過性亢進スコアとして評価した(図3)。アッセイで使用するネフロン可視化ゼブラフィッシュの大きさによって、蛍光標識デキストランの蛍光強度を直接測定する場合と蛍光標識デキストランに附属するハプテンに対する抗体を用いた酵素抗体法にて測定する場合がある。被検体の糸球体バリア透過性亢進活性を評価するためのこれら評価方法は、理論構築と試作は本研究開始前に確立できていたが、実際に患者血清を用いて実践するためには評価過程の各工程について手技やパラメーターを最適化する必要があったため、それらの検討に取り組んだ。

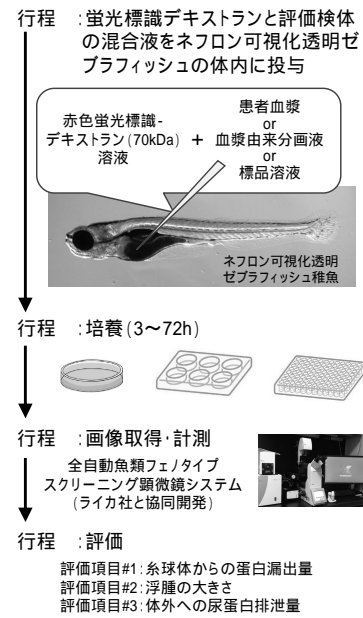


図2. ネフロン可視化透明ゼブラフィッシュを用いた糸球体透過性亢進能の評価法の概要。

(3) 蛋白尿を惹起する FSGS 患者由来血清の検索

名古屋大学腎臓内科にて採取保管していた FSGS 患者、疾患コントロールとして膜性腎症(MN)、微小変化型ネフローゼ症候群(MCD)、糖尿病性腎症(DM)の患者から腎生検時に採取した血漿または血清、健康コントロールとして健常人から採取した血漿または血清、ネフローゼ症候群惹起物質の陽性コントロールとしてゲンタマイシン水溶液を各々所定濃度にリン酸緩衝液で希釈した希釈液(被検体)を、顕微鏡下でマイクロインジェクション法によりネフロン可視化透明ゼブラフィッシュの血管内に投与して、28 下で一定時間培養後に上記の評価項目を測定した。血清は使用前に 18000g x 5min で不溶成分を遠心除去して実験に使用した。各被検体の糸球体バリア透過性亢進活性をスコアリングして、蛋白尿を惹起する患者由来血清を検索した。

糸球体濾過障害の重症度レベル	評価法 # 1 尿細管腔への赤色蛍光標識デキストランの漏出量 (画像解析で漏出距離Xを測定) (X領域は赤と緑がマージして黄色を呈する)	評価法 # 2 浮腫の大きさ (画像解析)	評価法 # 3 飼育水への赤色蛍光標識- デキストランの漏出量 (蛍光強度を定量)
- (正常:糸球体からの漏出無し)			
+ (軽度な濾過障害)			
++ (中程度の濾過障害)			
+++ (蛋白尿発生)			
++++ (ネフローゼ症候群)			

図3. 本アッセイ法における糸球体透過性亢進能の評価法。

(4) FSGS 患者由来血清の分画と蛋白尿惹起画分の検索

前項で糸球体バリア透過性亢進活性が認められた患者血清について、糸球体バリア透過性活性を惹起している液性因子を同定するために、ゲル濾過および限外ろ過カラムによる

分子サイズ分画、各種タンパク質に対するアフィニティビーズによる分画、疎水性カラムによる分画、有機溶媒による脂溶性分子の除去、など物理化学的な手法による患者血清を分画後にネフロン可視化透明ゼブラフィッシュに上記と同じ方法で投与して糸球体バリア透過性亢進の液性因子を含む血清画分の検索を行った。

(5) LDL 吸着カラム吸着物質を用いた蛋白尿惹起能の検討

FSGS 患者の一部では、ネフローゼ症候群に伴う脂質異常症を発症し、その対処療法として LDL コレステロールを選択的に除去する LDL アフェレーシスがある。LDL アフェレーシスでは、多孔質のセルロースビーズにデキストラン硫酸を固定したカラムに患者血清を通過させて、陰性電荷を有するデキストラン硫酸と陽性に荷電したりが蛋白表面のアポ蛋白 B が静電的相互作用で結合することを利用して吸着する。FSGS 患者をはじめとする強度ネフローゼ症候群患者では LDL アフェレーシスによりネフローゼ症候群レベルが改善することから吸着される物質に糸球体バリア透過性亢進因子が含まれる可能性があると予想し、FSGS 患者で施行した LDL アフェレーシス後にカラムから吸着物質を回収して、分画してから上記のネフロン可視化透明ゼブラフィッシュを用いたアッセイ系により、糸球体バリア透過性亢進活性を評価した。

(6) 蛋白尿惹起分画に含まれる液性因子の検索と検証

上記(4)(5)において糸球体バリア透過性亢進能を確認した検体の所定の画分に含まれる液性因子を同定するために、メタボローム解析、プロテオーム解析を行い、糸球体バリア透過性亢進候補分子を検索し、得られた分子のうち、試薬を入手できる分子については所定濃度で調製した当該分子をネフロン可視化透明ゼブラフィッシュを用いて糸球体バリア透過性亢進活性を検証する。

(7) 哺乳実験動物による蛋白尿惹起能の検証

上記(6)で尿蛋白惹起活性を確認できた分子について、マウスでの糸球体バリア透過性亢進活性を検証する。

4. 研究成果

(1) ネフロン可視化透明ゼブラフィッシュの生産安定化検討

ゼブラフィッシュの形質を改良する場合、第一選択肢となる手技は導入したい形質を保持する個体との交配である。申請者はこれまでも交配により透明ゼブラフィッシュの透明度や生産性の向上に成功している。本研究では、ネフロン可視化透明ゼブラフィッシュに Casper の先祖である AB 系を戻し交配して、産卵数と正常発生率の改善を試みた結果、戻し交配から二世代目の個体において Wildtype と遜色のない正常発生率が得られ、糸球体バリア透過性亢進物質のスクリーニングアッセイシステムの安定化と再現性向上を達成した。産卵数については大幅な向上は得られなかった。一方、供試魚の飼育管理装置の改良では、飼育管理の省力化と受精卵の生産性向上が達成できた。また、アッセイ装置と手技の改良では、ネフロン可視化透明ゼブラフィッシュを観察・撮影する際にネフロンが観察しやすい体勢に個体を維持する簡便な方法を考案し、アッセイ系に実装できた。改良型の手技では培養液の比重と粘土を工夫したことで個体の体勢維持を大幅に容易にし、体勢保持時間を延長できた。

(2) ネフロン可視化透明ゼブラフィッシュを用いた糸球体バリア透過性亢進物質評価モデルの最適化検討

鋭意検討の結果、完成したネフロン可視化透明ゼブラフィッシュを用いた蛋白尿惹起物質評価モデルの詳細は次の通りである。受精後 5 日または 2 ヶ月の稚魚に対して、患者血清やその分画物をリン酸緩衝液で所定濃度に希釈調製した被検物をガラス製マイクロキャピラリーニードルを用いてゼブラフィッシュの尾部大動脈ヘインジェクションし、その後は E3 培地（ゼブラフィッシュ初期胚用培養液）を満たしたマイクロプレートまたはシャーレに術後の個体を収容して、28 で培養する。マイクロインジェクション後 6、12、24、48 時間後に前述の評価法①～③のいずれか、または、全部を実施して得られたスコア、投与した被検物の希釈濃度および培養時間に基づいて被検物の糸球体バリア透過性亢進能を算出した。評価法①～③の間に相関性が得られたが、検出力は①>②>③の順に低下した。

(3) 蛋白尿を惹起する FSGS 患者由来血清の検索

上述した各種患者由来の血漿または血清をリン酸緩衝液で $\times 1 \sim \times 1/100$ に希釈してネフロン可視化透明ゼブラフィッシュに投与して、各被検物の糸球体バリア透過性亢進能を調査した。初期の調査では、糸球体バリア透過が誘導されることと疾患種別との間に相関性は認められなかった(図4)。疾患にかかわらず患者ごとに糸球体バリア透過が誘導される血漿と誘導されない血漿に分かれた結果が得られた。そこで、FSGS患者の解析数を増やして、FSGS患者由来血漿で糸球体バリア透過が誘導される血漿を収集した。また、一部の患者血漿の投与はゼブラフィッシュに対して催奇形性を呈する場合も認められた(図5)。

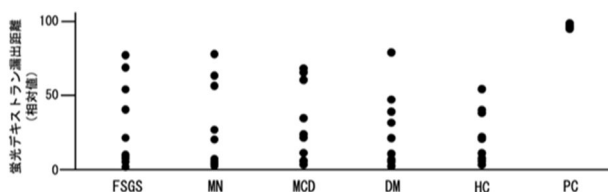


図4. 評価法にて評価した各種血漿の糸球体バリア透過性亢進活性の測定例
各種血漿を無希釈で投与し、投与24時間後に評価法にてデキストラン漏出距離を測定した。
FSGS: 巣状糸球体硬化症、MN: 膜性腎症、MCD: 微小変化型ネフローゼ症候群、DM: 糖尿病性腎症、HC: 健康人、PC: ポジティブコントロール(ゲンタマイシン)。

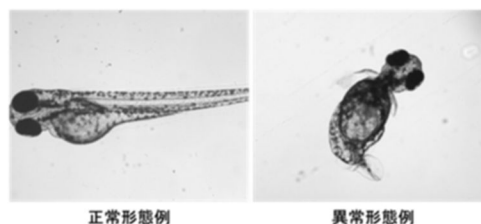


図5. 全血清投与で現れた異常形態の例

(4) FSGS患者由来血清の分画と蛋白尿惹起画分の検索

希釈した全血漿の投与にてネフロン可視化透明ゼブラフィッシュで糸球体バリア透過亢進が認められたFSGS患者血漿について、上述の各種分画操作を行って、糸球体バリア透過の原因となる透過性因子を含む画分の同定作業に取り組んだ結果、種々の分画操作を進めて、得られた画分をネフロン可視化透明ゼブラフィッシュで糸球体バリア透過能を測定すると、画分と糸球体バリア透過能との間に再現性に関して問題が生じた。つまり、全血漿では糸球体バリア透過能の亢進に再現性が得られていたものが、分画を行うことで糸球体バリア透過能の亢進結果に再現性が得られなくなった。この理由として、分画操作時の手技によって被検物中の液性因子が偶発的な吸着や分解や沈殿によって被検体中から失われていることが推察された。よって、被検体の分画とネフロン可視化透明ゼブラフィッシュによるバイオアッセイの繰り返しにより透過性因子を含む画分を絞り込む検討は研究期間内に期待通りの成果を得られなかった。

(5) LDL吸着カラム吸着物質を用いた蛋白尿惹起能の検討

重度のネフローゼ症候群を伴ったFSGS患者で実施したLDLアフェレーシス療法後に回収したLDL吸着カラムから吸着物質を得て、ネフロン可視化透明ゼブラフィッシュによる糸球体バリア透過能亢進アッセイを実施した。まず、LDL吸着カラムから吸着物を溶出する方法の検討に取り組んだ。LDL吸着カラムからの吸着物質の溶出はNaCl水溶液を用いて行った。溶出液には多量の脂質成分(LDLコレステロールなど)が含まれているため、4下で5000g \times 30min遠心分離して、上清を回収した。さらに、多量に含まれるNaClを透析またはゲル濾過により脱塩した。続いて、脱塩後の溶出液を所定濃度に調製してネフロン可視化透明ゼブラフィッシュに投与したところ、希釈率の低い高濃度区では糸球体バリア透過性亢進が認められた。さらに、(4)と同様に分画を行ってから糸球体バリア透過亢進能をアッセイしてみたが、分画を行うと糸球体バリア透過亢進能を再現性良く評価できなかった。

(6) 蛋白尿惹起画分に含まれる液性因子の同定

当初の計画では先の(4)と(5)において糸球体バリア透過性亢進能を有する画分を同定した後にメタボローム解析やプロテオーム解析による成分分析を実施する予定であったが、糸球体バリア透過性亢進能を有する画分を上手く同定できなかったため、分画画分を用いた液性因子の同定作業は中止した。その代替として全血清を用いて成分分析を行った。同定できた分子の一部については、合成品を購入して、所定濃度の水溶液を作成した後にネフロン可視化透明ゼブラフィッシュに投与して糸球体バリア透過性亢進能を評価した。その結果、数種類の分子に糸球体バリア透過性亢進能が認められたが、これらの分子はFSGS患者血漿に特異的なものではなかったため、FSGSの液性因子の候補ではないと結論した。

(7) 哺乳実験動物による蛋白尿惹起能の検証

(6)においてFSGSの液性因子候補分子を同定できなかったため、本実験は実施できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	秋山 真一 (Akiyama Shinichi) (20500010)	名古屋大学・医学系研究科・特任講師 (13901)	
研究分担者	古橋 和拡 (Furuhashi Kazuhiro) (50835121)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901)	

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