

機関番号：3 2 6 1 2

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：2 0 5 9 0 5 4 7

研究課題名 (和文) 家族性若年性高尿酸血症性腎症治療薬探索のための疾患モデルマウス作出

研究課題名 (英文) Production of disease model mice for the drug screening of familial juvenile hyperuricemic nephropathy

研究代表者

細山田 真 (HOSOYAMADA MAKOTO)

慶應義塾大学・薬学部・准教授

研究者番号：0 0 2 9 1 6 5 9

研究成果の概要 (和文): ウロモジュリン遺伝子変異による家族性若年性高尿酸血症性腎症 (FJHN) の病態モデルであるヒト変異ウロモジュリン遺伝子トランスジェニックマウスを作出して、FJHN の病態メカニズムについて検討した。病態モデルマウスの腎臓では *Srd5a2* 遺伝子転写亢進に伴う腎内アンドロゲン作用の増加により、腎嚢胞形成と腎障害 (腎症) の原因となる *Cyp4a12a* 遺伝子の転写亢進と、高尿酸血症の原因となる *Slc22a12* 遺伝子の転写亢進が生じていることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文): Pathophysiological mechanism of Familial Juvenile Hyperuricemic Nephropathy (FJHN) was investigated by production of the FJHN model mice, mutated human uromodulin gene transgenic mice. In the kidneys of the mice, it was observed that androgen action enhanced by increasing of *Srd5a2* gene transcription should induce the transcription of *Cyp4a12a* gene, which causes renal cyst formation and renal damage ("nephropathy"), and that of *Slc22a12* gene, which causes hyperuricemia.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：薬物治療学、病態モデル

## 1. 研究開始当初の背景

本邦成人男性の5人に1人が罹患する大変頻度の高い生活習慣病である高尿酸血症は、これまで痛風の原因としてのみ捉えられていたが、最近ではメタボリックシンドロームに高頻度に合併するばかりではなく、高尿酸血症そのものが心血管障害の独立したリスクとなりうることが示唆されており (Baker et.al. Am J Med.118:816,2005)、その罹患人口の多さと併せて心血管障害の予防の点からも、高尿酸血症の発症メカニズムの解明が必要とされている。高尿酸血症の発症メカ

ニズムとして、腎臓からの尿酸排泄の低下が原因となる排泄低下型高尿酸血症によるものが高尿酸血症患者の8割近くを占めるので、排泄低下型高尿酸血症を呈する遺伝性疾患である家族性若年性高尿酸血症性腎症 (FJHN) の発症メカニズムを研究することは有用である。

また、FJHN は腎機能低下が慢性的に進行して末期腎不全に至る疾患でもある。本邦では毎年約3万人が末期腎不全に陥り、患者 QOL ばかりでなく、医療経済的にも大きな問題となっており、腎不全進行阻止のための慢性腎

臓病(CKD)研究は急務である。急性腎不全の疾患モデルが多数あるのに比べ、慢性的に腎機能低下が進行する慢性腎臓病(CKD)のモデル動物として有用なものはこれまでになかった。FJHN 疾患モデルマウスは慢性腎臓病モデル動物としても有用となる可能性が高く、慢性腎臓病(CKD)研究の進展につながる事が期待できる。

FJHN は連鎖解析法によって原因遺伝子がウロモジュリン遺伝子(UMOD)であることが明らかになり(Hart et.al. J Med Genet. 39: 882,2002)、国外の研究グループにより変異ウロモジュリン遺伝子を培養細胞に導入することにより、変異ウロモジュリン蛋白が培養細胞内に蓄積することが既に明らかにされている(Bernascone et.al. Traffic 7:1567, 2006)。しかし、ヘンレ上行脚の細胞内の蛋白蓄積がどのようなメカニズムによって排泄低下型高尿酸血症や腎機能低下を引き起こすかを解明するためには、UMOD 変異による腎臓全体の病態変化を明らかにすることが必要であり、FJHN の疾患モデル動物を作出することが必要不可欠となっている。以上より、FJHN の疾患モデル動物として、ヒト変異ウロモジュリン遺伝子導入トランスジェニックマウスの作成を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

FJHN 患者で報告のあるヒト変異ウロモジュリン遺伝子(UMOD)を導入したトランスジェニックマウスと、対照群としてヒト正常ウロモジュリン遺伝子を導入したトランスジェニックマウスとをそれぞれ作成し、FJHN モデルマウスの腎臓における病態変化を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1)ヒト変異ウロモジュリン遺伝子トランスジェニックマウスとヒト正常ウロモジュリン遺伝子トランスジェニックマウスの作成

ヒト変異ウロモジュリン蛋白をウロモジュリン遺伝子が発現する部位に特異的に発現させるため、マウスウロモジュリン遺伝子プロモーター配列の下流に、変異を導入したヒトウロモジュリン cDNA を結合させた導入遺伝子断片を作成した。マウスウロモジュリン遺伝子プロモーターDNA 配列は Zhu らの方法(AJP 282,F608,2002)に従い、マウスゲノム DNA から 2928bp の PCR 産物を PCR クローニングする。ヒト正常ウロモジュリン cDNA は市販のヒト腎臓 poly A+ RNA から RT 産物を生成し、1954bp の PCR 産物を PCR クローニングした。得られたヒト正常ウロモジュリン cDNA クローンに、Site directed Mutagenesis kit(Stratagene)を用いて、培養細胞内で蓄積を示すことが報告されている(Rampoldi et.al. Hum Mol Genet 12(24):3369,2003)

変異である 444 T to G 変異(C148W 変異)を導入してヒト変異ウロモジュリン cDNA を得た。こうして得られたプロモーターDNA と cDNA クローンを pcDNA3.1(+) ベクターに導入し、CMV プロモーターを含まず、BGH ポリ A 負荷シグナルを含むように AflI と DraI により導入遺伝子 DNA 断片を切り出した。

導入遺伝子 DNA 断片をマイクロインジェクションしたマウス前核期受精卵を、偽妊娠を誘導した仮親マウスの卵管内に移植した。自然分娩により産仔を得て、尾からゲノミック DNA を抽出し、PCR によって遺伝子導入が成功していることを確認し、ヒト変異ウロモジュリン遺伝子トランスジェニックマウスおよびヒト正常ウロモジュリン遺伝子トランスジェニックマウスをそれぞれ得た。

腎臓の凍結切片を用いた免疫蛍光法により、抗マウスウロモジュリン抗体によって染色されるマウス正常ウロモジュリンが発現部位に一致して、抗ヒトウロモジュリン抗体によって染色されるヒト変異ウロモジュリンが発現していることを二重蛍光染色によって確認した。

(2)ウロモジュリン蛋白腎内蓄積量および尿中排泄量の検討

12 週、24 週、36 週のトランスジェニックマウスの腎臓から細胞質分画および膜分画を超速心法にて分離した。尿はメタボリックケージを用いて採尿した。抗マウスウロモジュリン抗体および抗ヒトウロモジュリン抗体を用いてウェスタンブロッティングを行い、マウスウロモジュリンおよびヒトウロモジュリンの各バンドの分子量を決定し、腎臓内での蓄積量が経時的に増加するバンドを同定した。また、同マウスから得られた腎臓の Total RNA について定量 PCR を行い、マウスウロモジュリン遺伝子発現およびヒトウロモジュリン遺伝子発現の経時変化について明らかにし、腎臓内でのウロモジュリン蛋白蓄積に関与するかどうかを明らかにした。

糖鎖切断酵素による解析として、エンドグリコシダーゼ F および H、シアリダーゼの処理をそれぞれ行なったサンプルに対してウェスタンブロッティングを行ない、蓄積しているウロモジュリンの糖鎖修飾について明らかにし、翻訳後修飾のどのステップで蓄積が生じているかについての情報を得た。

(3)URAT1 発現量の検討およびクレアチニンクリアランスの検討

マウス URAT1 の発現量については研究代表者が作成した抗マウス URAT1 抗体を用いてウェスタンブロッティング法により定量評価した。クレアチニンクリアランスについては HPLC を用いて血漿および尿中のクレアチニン濃度を定量することにより算出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト変異および正常ウロモジュリン遺伝子トランスジェニックマウスの作成

導入遺伝子断片の作成：ヒトウロモジュリン cDNA とマウスウロモジュリン遺伝子プロモーターDNA とをそれぞれ PCR クローニングを行い、正常ヒトウロモジュリン cDNA または C148W となるように変異を導入したヒトウロモジュリン cDNA をマウスウロモジュリン遺伝子プロモーター配列下流に連結した導入遺伝子断片を作成した。

トランスジェニックマウスの作出と選別：導入遺伝子断片の受精卵への顕微注入をフェニックスバイオ社に外注し、得られたマウスの遺伝子型を解析して遺伝子導入を確認した。導入遺伝子が仔に伝達するのを確認後、腎臓でヒトウロモジュリン遺伝子の発現量が最も多い系統をそれぞれ選別した。

トランスジェニックマウス系統の繁殖維持：ヒト変異および正常ウロモジュリン遺伝子トランスジェニックマウスをそれぞれヘテロ体として維持繁殖を行った。

##### (2) 腎内ウロモジュリン蛋白蓄積の検討

ウロモジュリン蛋白発現レベルの定量的解析：ウェスタンブロッティング法により解析したところ、ヒト正常ウロモジュリンとヒト変異ウロモジュリンは分子量が異なり発現量が比較できなかった。変異ウロモジュリン導入マウスでは低分子量のマウスウロモジュリンの蓄積が増加していたが、正常ウロモジュリン導入マウスでは蓄積が認められなかった。

糖鎖構造の解析：ヒト変異ウロモジュリンは Endo H 感受性、ヒト正常ウロモジュリンは Endo H 抵抗性であり、変異ウロモジュリンには糖鎖修飾不全が認められた。

##### (3) ヒト変異ウロモジュリン遺伝子トランスジェニックマウスにおける小胞体ストレス関連遺伝子発現変化の解析

家族性若年性高尿酸血症性腎症モデルであるヒト変異ウロモジュリン遺伝子トランスジェニックマウスにおける mRNA 発現量を、ヒト正常ウロモジュリン遺伝子トランスジェニックマウスを対照として比較した結果、小胞体シャペロンとして *GRP78* 遺伝子の 132% の転写量増加、*GRP94* 遺伝子、*ORP150* 遺伝子の転写量不変を認め、ヒト変異ウロモジュリン遺伝子トランスジェニックマウスの腎臓における小胞体ストレスの存在が示された。

##### (4) ヒト変異ウロモジュリン遺伝子トランスジェニックマウスにおける尿酸トランスポーター遺伝子発現変化の解析

尿酸再吸収輸送系として *Slc22a12*(Urat1)

遺伝子の 140% の転写量増加、*Slc5a8*(Smct1) 遺伝子、*Slc2a9*(Glut9) 遺伝子の転写量不変を認め、尿酸分泌輸送系として *ABCG2* 遺伝子の転写量不変を認めた。尿酸動態としてヒト変異ウロモジュリン遺伝子トランスジェニックマウスにおける血漿尿酸濃度の上昇傾向を認めたが、尿中尿酸排泄、クレアチニンクリアランスに変化は認めなかった。

以上の結果より、ヒト変異ウロモジュリン遺伝子トランスジェニックマウスは家族性若年性高尿酸血症性腎症の初期病変として腎障害を示す前段階における小胞体ストレスと *Urat1* 発現増加を示しているモデル動物であることが明らかになった。このため、家族性若年性高尿酸血症性腎症患者における腎不全発症前の病態解明、治療薬探索に有用な動物モデルであることが示された。

##### (5) ヒト変異ウロモジュリン遺伝子トランスジェニックマウスにおける遺伝子発現変化の網羅的解析

家族性若年性高尿酸血症性腎症モデルであるヒト変異ウロモジュリン遺伝子トランスジェニックマウスにおける mRNA 発現量を、ヒト正常ウロモジュリン遺伝子トランスジェニックマウスを対照として DNA マイクロアレイを用いて解析した結果、発現が亢進する遺伝子として *Srd5a2* が検出され、定量 PCR によって *Srd5a2* 遺伝子の約 3 倍の転写亢進が確認された。*Srd5a2* 遺伝子の遺伝子産物はテストステロンをアンドロゲン作用のより強いジヒドロテストステロンへ変換する酵素である 5' -レダクターゼであり、ヒト変異ウロモジュリン遺伝子トランスジェニックマウスの腎臓ではアンドロゲン作用が亢進している可能性がある。その裏付けとして、ヒト変異ウロモジュリン遺伝子トランスジェニックマウスの腎臓においてアンドロゲンにより誘導される遺伝子である *Gusb*、*Odc1*、*Cyp4a12a* の各遺伝子の転写亢進が DNA マイクロアレイおよび定量 PCR によって確認された。尿酸再吸収トランスポーター *Slc22a12* 遺伝子の転写増加が定量 PCR で認められたことと併せて、ヒト変異ウロモジュリン遺伝子トランスジェニックマウスでは *Srd5a2* 遺伝子の転写亢進によりアンドロゲン作用が亢進して、尿酸再吸収トランスポーターの発現亢進が生じて高尿酸血症をもたらしていることが予想された。さらに、アンドロゲン作用による *Cyp4a12a* 遺伝子の転写亢進に伴って腎臓内で産生が亢進する 20-HETE による腎障害および腎嚢胞形成が生じる可能性が考えられるため、FJHN モデルマウスおよび FJHN 患者の尿中 20-HETE 測定による 20-HETE 産生亢進の証明と 5' -レダクターゼ阻害薬による治療の可能性について、今後検討していく予定である。

## 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 7 件)

Takiue Y, Hosoyamada M, Kimura M, Saito H: The effect of female hormones upon urate transport systems in the mouse kidney. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 査読有, 30(2):113-9, 2011

Takiue Y, Hosoyamada M, Kimura M, Saito H: Enhancement of Androgen Action in the Kidneys of Transgenic Mice Harboring the Mutant Human UMOD Gene. *J Pharmacol Sci*. 査読有, 115(3):383-9, 2011

Hosoyamada M, Takiue Y, Shibasaki T, Saito H: The effect of testosterone upon the urate reabsorptive transport system in mouse kidney. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 査読有, 29(7):574-579, 2010

Yasuda M, Kaneko K, Hachisu H, Ochiai M, Yamanobe T, Mawatari K, Nakagomi K, Minoura N, Hosoyamada M: Development of LC-MS method for detection of mutant uromodulin protein. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 査読有, 29(4-6):515-7, 2010

Hosoyamada M, Takiue Y, Morisaki H, Cheng J, Ikawa M, Okabe M, Morisaki T, Ichida K, Hosoya T, Shibasaki T: Establishment and analysis of SLC22A12 (URAT1) knockout mouse. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 査読有, 29(4-6):314-320, 2010

Takiue Y, Hosoyamada M, Yokoo T, Kimura M, Ochiai M, Kaneko K, Ichida K, Hosoya T, Shibasaki T. Production and characterization of transgenic mice harboring mutant human UMOD gene. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 査読有, 27, 596-600, 2008

Takiue Y, Hosoyamada M, Yokoo T, Kimura M, Shibasaki T: Progressive accumulation of intrinsic mouse uromodulin in the kidneys of transgenic mice harboring the mutant human uromodulin gene. *Biol Pharm Bull*, 査読有, 31, 405-411, 2008

### [学会発表](計 16 件)

細山田 真, 滝上 裕一, 齋藤 英胤: ウロモジュリンと家族性若年性高尿酸血症性腎症 1 型。日本薬学会第 131 年会、静岡、平成 23 年 3 月

細山田 真, 岩川 奈々, 滝上 裕一, 木村

真規, 齋藤 英胤: 家族性若年性高尿酸血症性腎症 1 型モデルマウス腎臓では 5'-レダクターゼ 2 発現が増加する。第 84 回日本薬理学会 横浜、平成 23 年 3 月

Takiue Y, Hosoyamada M, Kimura M, Saito H: The effect of sex hormones upon urate transport systems in the mouse kidney. 14th International Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man, PP11 Tokyo, Feb. 2011

滝上 裕一, 細山田 真, 木村 真規, 齋藤 英胤: ウロモジュリンの遺伝子変異によるアンドロゲン作用の増加。第 44 回日本痛風・核酸代謝学会総会 東京、平成 23 年 2 月

細山田 真: シンポジウム 2「トランスポーター研究の最前線」腎臓における尿酸輸送。第 54 回日本薬学会関東支部大会, 東京, 平成 22 年 10 月

滝上 裕一, 細山田 真, 木村 真規, 柴崎敏昭: 尿酸再吸収トランスポーターの性ホルモンによる発現調節。日本薬学会第 130 年会, 岡山, 平成 22 年 3 月

滝上 裕一, 細山田 真, 木村 真規, 柴崎敏昭: 性ホルモンによる尿酸動態の変化。第 43 回日本痛風・核酸代謝学会総会, 大阪, 平成 22 年 2 月

Yasuda M, Kaneko K, Hachisu H, Ochiai M, Yamanobe T, Mawatari K, Nakagomi K, Minoura N, Hosoyamada M: Development of LC-MS method for detection of the mutated uromodulin. 13th International Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man, Stockholm, Sweden, June, 2009

Ichida K, Matsuo H, Hosoyamada M, Shinomiya N, Hosoya T: Single nucleotide polymorphisms in ABCG2 in Japanese hyperuricemic patients. 13th International Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man, Stockholm, Sweden, June, 2009

Hosoyamada M, Morisaki H, Cheng J, Ikawa M, Okabe M, Morisaki T, Takiue Y, Ichida K, Hosoya T, Shibasaki T: Establishment and analysis of Slc22a12 (Urat1) knockout mouse. 13th International Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man, Stockholm, Sweden, June, 2009

安田 誠, 蜂須 広佳, 落合 真奈美, 金子 希代子, 山辺 智代, 馬渡 健一, 中込 和哉, 箕浦 憲彦, 細山田 真: LC-MS を用いた変異ウロモジュリン検出法の開発。日本薬学会第 129 年会, 京都, 平成 21 年 3 月

滝上 裕一, 中込 早苗, 木村 真規, 細山

田 真, 柴崎 敏昭: ウロモジュリン蛋白の蓄積は遺伝子変異が原因である。日本薬学会第 129 年会, 京都, 平成 21 年 3 月  
滝上 裕一, 木村 真規, 細山田 真, 柴崎敏昭: 家族性若年性高尿酸血症性腎症モデルマウスの腎臓における内因性マウスウロモジュリンの蓄積。第 82 回日本薬理学会, 横浜, 平成 21 年 3 月  
安田 誠, 蜂須 広佳, 落合 真奈美, 金子希代子, 山辺 智代, 藤森 新, 馬渡 健一, 中込 和哉, 箕浦 憲彦, 細山田 真: LC-MS を用いた変異ウロモジュリン検出法の開発。第 42 回日本痛風・核酸代謝学会, 東京, 平成 21 年 2 月  
滝上 裕一, 細山田 真, 木村 真規, 柴崎敏昭: マウス尿酸トランスポーター mURAT1 の性ホルモンによる発現調節機構。第 42 回日本痛風・核酸代謝学会, 東京, 平成 21 年 2 月  
細山田 真: シンポジウム 2「低尿酸血症の臨床的意義」低尿酸血症の分子メカニズム(Urat1 ノックアウトマウスの作出と検討), 第 42 回日本痛風・核酸代謝学会, 東京, 平成 21 年 2 月

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

細山田 真 (HOSOYAMADA MAKOTO)  
慶應義塾大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 00291659

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

市田 公美 (ICHIDA KIMIYOSHI)  
東京薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号: 80183169