

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06474

研究課題名(和文)尿細管間質障害抵抗性遺伝子の探索-新規腎症治療薬開発に向けて-

研究課題名(英文)Discovery of resistance genes against tubular interstitial disorders.

研究代表者

佐々木 宣哉(SASAKI, NOBUYA)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：20302614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：現在、先進国では慢性腎臓病(CKD)患者の増加につれて、その予後に掛かる莫大な医療費が問題となり、治療法の開発が急務となっている。CKDの発症には、糖尿病や高血圧など多くの生活習慣に関わる危険因子が関与しており、CKD予備群が益々増加している。申請者はTensin2遺伝子変異に起因するCKDモデルマウスの解析により、腎機能低下の原因である尿細管間質障害(腎線維化および腎性貧血)に対する抵抗性遺伝子座を見出した。本研究では、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析およびRNA-seq解析により候補遺伝子を決定し、遺伝子改変マウスを作出することによって尿細管間質障害-抵抗性遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本国において、腎不全は病死の原因第5位であり、その予備軍であるCKDは、成人の8人に1人が罹患している国民病であるが未だ根治療法は開発されていない。透析患者数は約33万人にのぼり、年間1万人ずつ増加している。透析患者1人あたりの年間医療費は約500万円であり腎臓病の医療費は年1.5兆円を超える。蛋白尿は尿細管間質障害を徐々に進行させ、最終的にCKDを経て腎不全に至る。したがって、多様な要因(原疾患)を有するCKDの治療において、尿細管間質障害の進行を止める治療が広く効果的であり、人工透析への移行を防止することができる。本研究は、独自のスクリーニング法によって、新規尿細管間質障害を同定した。

研究成果の概要(英文)：In advanced countries, as the number of chronic kidney disease (CKD) patients increases, the enormous medical expenses associated with their prognosis have become a problem, and the development of treatments has become urgent. The onset of CKD involves many lifestyle risk factors such as diabetes, hypertension, hypercholesterolemia, obesity, and smoking, and the number of CKD pre-patients is increasing. The applicant identified a resistance locus to tubulointerstitial injury (renal fibrosis and renal anemia), which is the cause of renal dysfunction, by analyzing a CKD model mouse caused by a Tensin2 gene mutation. In this study, candidate genes were determined by whole-genome analysis and RNA-seq analysis using next-generation sequencers, and the tubulointerstitial injury-aggravating gene was identified by creating a gene-modified mouse.

研究分野：腎臓病

キーワード：腎臓病 尿細管間質障害 マウスモデル 慢性腎臓病 連鎖解析

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (chronic kidney disease : CKD)とは、腎臓の障害 (蛋白尿など) もしくは糸球体濾過量 (GFR)が 60 mL/分/1.73m² 未満の腎機能低下が 3 カ月以上持続する状態を示す。CKD の初期は自覚症状がなく、病態は不可逆的に進行し、徐々に怠惰感、貧血、浮腫などの症状が現れる。病態が進行すると、最終的に末期腎不全 (End Stage Renal Disease : ESRD) に至り、腎移植または恒久的な透析療法が必要となる。ESRD 患者数は高齢化社会を背景に年々増加しており、さらに CKD は糖尿病、高血圧、心疾患といった重要疾患と密接に関連しているため、健康課題・医療費面からも解決を迫られる重要な疾患であるが、未だ根治的な治療法は確立されていない。CKD は経過初期には原疾患特異的な病態を呈するが、多くの場合、糸球体障害に続く蛋白尿症、尿細管障害、腎間質線維化は共通の病態として経過する。腎間質線維化は CKD における腎機能不全および機能的予後と強く関連しており、ESRD に至る決定的な病態変化である。したがって、腎間質線維化の治療が実現すれば、原疾患を問わない CKD の治療法および ESRD の予防法になると考えられる。

2. 研究の目的

現在、先進国では慢性腎臓病 (CKD) 患者の増加につれて、その予後に掛かる莫大な医療費が問題となり、治療法の開発が急務となっている。CKD の発症には、糖尿病や高血圧など多くの生活習慣に関わる危険因子が関与しており、CKD 予備群が益々増加している。申請者は Tensin2 遺伝子変異に起因する CKD モデルマウスの解析により、腎機能低下の原因である尿細管間質障害 (腎線維化および腎性貧血) に対する抵抗性遺伝子座を見出した。本研究では、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析および RNA-seq 解析により候補遺伝子を決定し、遺伝子改変マウスを作出することによって尿細管間質障害-抵抗性遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

腎臓病は多因子性疾患であり、その悪性化には腎症に寄与する様々な修飾遺伝子の存在が示唆されている。本研究では CKD の進行抑制に関わる新規治療標的の遺伝子を探索する目的で、腎症感受性である FVB/NJ (FVB) マウスと腎症抵抗性である C57BL/6 (B6) マウスを用いた遺伝学的解析を行い、候補遺伝子に挙げた NSAS について遺伝子改変マウスを用いて機能的解析を行った。腎症修飾遺伝子を探索するため、腎症抵抗性である B6 を遺伝背景に持つマウスと、腎症感受性である FVB を遺伝背景に持つマウスを用いて連鎖解析を行った。使用した系統は Tns2 遺伝子に変異を有しており、FVB 背景では原発性糸球体硬化症に起因する CKD を自然発症する。連鎖解析の結果、10 番染色体に尿中アルブミン量と強く相関する遺伝子座が検出された。同遺伝子座の候補遺伝子を絞り込むため、両系統の腎糸球体を用いて RNA シーケンス解析を行い、両系統間で発現量に差が見られた腎症感受性候補遺伝子を抽出した。遺伝子発現データベースを用い解析を行ったところ、ヒト膜性腎症患者の腎組織および糖尿病性腎症マウスの糸球体において、NSAS 遺伝子の発現量と尿中アルブミン量に強い相関があることを見出した。しかし NSAS と腎症との関連についての報告はない。そこで腎組織内における NSAS の発現と腎症の病態との相関性について検証を行った。また、NSAS1 遺伝子が腎症に寄与しているかを確かめるべく、腎症モデルマウスおよびヒト腎症組織を用いて NSAS の発現動態を解析した。また、腎症への NSAS の影響を精査するため、NSAS ノックアウト (KO) マウスに糸球体障害自然発症モデル Tensin2 欠損腎症、アドリアマイシン誘発性糸球体障害モデル、抗ネフリン抗体傷害性腎症、虚血再灌流誘発性腎不全を導入した。

4. 研究成果

代表的な CKD であるヒト IgA 腎症患者、ヒト巣状分節性糸球体硬化症 (FSGS) 患者、ヒト尿細管間質性腎炎 (TIN) 患者の近位尿細管でも NSAS の発現が有意に亢進していた。すなわち種を超えて、原疾患を問わず、腎障害によって NSAS 発現が亢進することが明らかとなった。腎障害における NSAS の発現動態を明らかにするため、アドリアマイシン誘発性糸球体障害モデル、Tensin2 欠損腎症、抗ネフリン抗体投与糸球体障害モデル、および虚血再灌流誘発性腎障害モデルを作製した。抗 NSAS 抗体を用いて免疫組織化学染色を行ったところ、各腎症モデルマウスにおいて腎皮質側の尿細管上皮細胞において NSAS の発現が亢進していた。この結果から、NSAS の発現は、原疾患を問わず様々な腎症で尿細管上皮細胞において亢進しており、その発現上昇は尿中アルブミン量と正の相関を示していた。NSAS KO マウスに様々な腎症モデルを導入すると、KO マウス群において尿細管障害と間質の線維化が著しく軽症化した。特に Tensin2 欠損腎症モデルは、16 週までに全個体が死亡するが、KO マウスは平均寿命が 3 倍ほど延長した。よって、

NSAS は尿細管間質障害増悪因子であることが明らかとなった。また、NSAS KO マウスは、1 年の観察期間の間、組織学的解析および行動、繁殖等が正常であったため、NSAS 阻害/抑制薬は毒性の懸念は低いと考えられた。本研究により同定された新規腎症関連分子 NSAS はヒトおよびマウスの尿細管上皮細胞において、原疾患を問わず様々な腎障害で発現が上昇することが明らかとなった。また、NSAS を遺伝的に欠損させると、腎障害において尿細管の障害および腎間質線維化が有意に低下し、腎障害の進行が抑制された。以上より NSAS は腎症のバイオマーカーであると共に、腎症の悪性化に寄与していることが明らかとなった。今後、NSAS が関与するシグナル経路を解明することにより、CKD の共通病態である腎間質線維化の機序の解明、予防・新規治療薬の開発、新規バイオマーカーの開発に役立つことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hayato Sasaki, Yuki Takahashi, Tsubasa Ogawa, Koki Hiura, Kenta Nakano, Makoto Sugiyama, Tadashi Okamura, Nobuya Sasaki	4. 巻 60
2. 論文標題 Deletion of the Tensin2 SH2-PTB domain, but not the loss of its PTPase activity, induces podocyte injury in FVB/N mouse strain.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 135-143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.19-0101. Epub 2019 Nov 12.	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 -
1. 著者名 Positive correlation between renal tubular flattening and renal tubular injury/interstitial fibrosis in murine kidney disease models.	4. 巻 83
2. 論文標題 Yuki Takahashi, Masaki Watanabe, Koki Hiura, Ai Isobe, Hayato Sasaki, Nobuya Sasaki	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 397-402
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.20-0692. Epub 2021 Jan 10.	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 -
1. 著者名 Masaki Watanabe, Hayato Sasaki, Yuki Takahashi, Koki Hiura, Kenta Nakano, Tadashi Okamura, Nobuya Sasaki	4. 巻 556
2. 論文標題 A single amino acid substitution in PRKDC is a determinant of sensitivity to adriamycin induced renal injury in mouse.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 121-126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.03.150. Epub 2021 Apr 8.	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 -
1. 著者名 Hayato Sasaki, Nobuya Sasaki	4. 巻 71
2. 論文標題 Tensin 2-deficient nephropathy - Mechanosensitive nephropathy, Genetic susceptibility.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 252-263
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.22-0031. Epub 2022 Apr 19.	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 -

1. 著者名 Hayato Sasaki, Takeru Sasaki, Koki Hiura, Masaki Watanabe, Nobuya Sasaki	4. 巻 50
2. 論文標題 A mouse model of type B cystinuria due to spontaneous mutation in FVB/NJcl mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Urolithiasis	6. 最初と最後の頁 679-684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00240-022-01356-9. Epub 2022 Aug 21.	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10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高橋悠記, 佐々木隼人, 日裏剛基, 渡邊正輝, 中野堅太, 岡村匡史, 佐々木宣哉
2. 発表標題 慢性腎臓病モデルマウスにおける新規増悪化因子の解析
3. 学会等名 第67回 日本実験動物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木隼人, 伊藤優輝, 高橋悠記, 日裏剛基, 渡邊正輝, 佐々木宣哉
2. 発表標題 Tensin2欠損ポドサイト細胞株におけるインテグリンシグナルの解析
3. 学会等名 第67回 日本実験動物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木隼人, 伊藤優輝, 高橋悠記, 日裏剛基, 渡邊正輝, 佐々木宣哉
2. 発表標題 腎近位尿管上皮細胞における新規腎症増悪因子の解析
3. 学会等名 第67回 日本実験動物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋悠記, 佐々木隼人, 日裏剛基, 渡邊正輝, 中野堅太, 岡村匡史, 佐々木宣哉
2. 発表標題 腎近位尿細管上皮細胞における新規腎症増悪因子の解析
3. 学会等名 第163回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊正輝, 日裏剛基, 高橋悠記, 中野堅太, 岡村匡史, 佐々木隼人, 佐々木宣哉
2. 発表標題 C57BL/6系統でのADR腎症モデルの作出
3. 学会等名 第163回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takahashi Y, Sasaki H, Koki H, Watanabe M, Nakano K, Okamura T, Sasaki N
2. 発表標題 Functional analysis of novel genetic factor for chronic kidney disease in mice.
3. 学会等名 The 71th American Association for Laboratory Animal Science
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊正輝, 高橋悠記, 日裏剛基, 中野堅太, 岡村匡史, 佐々木隼人, 佐々木宣哉
2. 発表標題 マウスのアドリアマイシン腎症感受性はPrkdc遺伝子のR2140C変異が原因である
3. 学会等名 第68回 日本実験動物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋悠記, 渡邊正輝, 日裏剛基, 磯部亜衣, 佐々木隼人, 佐々木宣哉
2. 発表標題 マウス腎臓病モデルマウスにおける尿細管扁平化と尿細管障害の相関について
3. 学会等名 第68回 日本実験動物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊正輝, 高橋悠記, 日裏剛基, 磯部亜衣, 佐々木隼人, 佐々木宣哉
2. 発表標題 マウスにおける腎症の悪性度と尿細管扁平化の相関関係の検討
3. 学会等名 第164回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Watanabe M, Sasaki H, Takahashi Y, Hiura K, Nakano N, Okamura T, Sasaki N
2. 発表標題 Development of new Adriamycin nephropathy murine model in C57BL/6 genetic background.
3. 学会等名 The 72th American Association for Laboratory Animal Science
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 尿細管間質障害の予防又は治療剤	発明者 佐々木宣哉	権利者 北里大学
産業財産権の種類、番号 特許、2021-017425	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------