

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009 ~ 2011

課題番号：21591051

研究課題名(和文) 近位尿細管アシドーシスに対する新規薬物療法の開発

研究課題名(英文) Development of new medication against proximal renal tubular acidosis

研究代表者

関 常司 (SEKI GEORGE)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30206619

研究成果の概要(和文) NBCe1 変異による遺伝性近位尿細管アシドーシスは重症の酸血症や眼症状、成長障害など多彩な臨床症状を呈する難病である。新規 NBCe1 変異として早期停止型 W516X 変異が同定されたため、この変異を組み込んだノックインマウスを作成した。W516X ホモマウスはノンセンス変異依存 mRNA 分解機構による NBCe1 機能低下のために重度の酸血症、成長障害、眼症状などを呈し、ヒトの近位尿細管アシドーシスのよい動物モデルであり、分子治療法の評価に有用であると考えられた。一方、他の家系における解析から細胞膜発現を欠如する NBCe1 変異が片頭痛を生じることにも明らかにした。

研究成果の概要(英文): Hereditary proximal renal tubular acidosis by NBCe1 mutations is a difficult-to-treat disease with severe acidemia, ocular abnormalities, and stunted growth. Because a premature stop-codon NBCe1 mutation W516X was recently identified, we produced mice carrying this mutation. W516X knock-in homo mice showed severe acidemia, ocular abnormalities, and stunted growth like human patients. They may be useful for the evaluation of new molecular therapy for proximal renal tubular acidosis. We also found that defective membrane expression of NBCe1 is associated with migraine.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野:

科研費の分科・細目: 内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード: 近位尿細管性アシドーシス、NBCe1

1. 研究開始当初の背景

眼症状を伴う遺伝性近位尿細管アシドーシス (OMIM 60428) は重症の酸血症による成長障害に加え、失明に至る重度の視力障害、片麻痺を伴う片頭痛、精神発達遅延など多彩な臨床症状を呈する難病である。大量のアルカリ投与によっても血中重炭酸濃度を正常

化するのとは不可能であり、眼症状を含む多彩な腎外病変についても有効な治療法は全く確立していない。申請者らはこの疾患が Na-HCO₃ 共輸送体 NBCe1 の変異によることを世界に先駆けて発見した (Nature Genet 23: 264, 1999)。その後、主に申請者らを中心とする国内外の研究により現在までに 12 種

類の NBCe1 変異が同定・解析され、NBCe1 機能低下の原因として異なる分子機序が働いていることが明らかになった (JASN 12:713,2001.Pflugers Arch 448:438, 2004. JASN 16:2270, 2005. Pflugers Arch 455:583, 2008)。すなわちこれらの変異は (1) フレームシフトを伴わない早期停止型変異、(2) フレームシフトを伴う早期停止型変異、(3) NBC1 輸送活性は低下するものの、正常な膜発現機構は保たれているタイプ、(4) 膜発現機構が障害されているタイプなどに分類される。

2. 研究の目的

本研究の目的は遺伝性近位尿細管アシドーシスの発症機構をさらに明らかにするために適切な動物モデルを作成し、最新の分子生物学的知見に基づいた新規薬物療法の効果を検証することにより、より有効的な近位尿細管アシドーシスの新規治療法開発を目指すことである。また NBCe1 変異の種類による疾患発症機序の差や、表現型の差の有無などについても検討する。

具体的には上記 (1) の stop-codon による早期停止型変異については従来よりゲンタマイシンなどのアミノグリコシド系薬剤によるいわゆる read-through 効果を介した治療 (Nature Med 2:467, 1996) が試みられており、実際に海外では膿胞線維症の一部で臨床試験が行われている (N Engl J Med 349:1433, 2003)。しかしこれらの薬剤には腎障害などの副作用があり、遺伝子病治療のための長期全身投与は不可能であった。最近こうした副作用がほとんどなく、しかもアミノグリコシド系薬剤より強い read-through 効果を持つ低分子化合物 PTC124 が開発され、大きな注目を集めている (Nature 447:87, 2007)。

今回新規 NBCe1 変異として早期停止型 W516X 変異が同定されたため、この変異を組み込んだノックインマウスを作成し、表現型を明らかにするとともに PTC124 の治療効果判定を行う。

3. 研究の方法

ES 細胞での Cre/loxP 組み換えを経て、まず F1 ヘテロ W516X ノックインマウスを確保する。次に F1 ヘテロマウスを交配して得た F2 マウスを用いて genotyping によって野生型、ヘテロ変異型、ホモ変異型マウスを同定する。

同時に血中の重炭酸濃度その他電解質測定や、血圧測定、生存日数の確認、主要臓器の観察などによりそれぞれの表現型を決定する。さらに各臓器における NBCe1 や代償的に増加することが予想される他の酸・塩基輸送体発現量について RT-PCR や Western blot 法

などにより検討する。その後、invitro および in vivo の実験を通して PTC124 の治療効果を明らかにする。

特に NBCe1 機能については腎皮質から近位尿細管を単離し微小灌流し、細胞内 pH 測定法により NBCe1 活性を評価し、また重炭酸再吸収量についても stop-flow 法を用いて算定する。

4. 研究成果

ES 細胞での相同組み換えを経て、まず F1 ヘテロ W516X ノックインマウスを確保した。ヘテロマウスの交配によりメンデルの法則による予想通りの確率で野生型、ヘテロ、ホモの NBCe1 W516X ノックインマウスを得た。

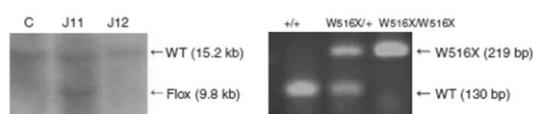


図 1 : ES 細胞での相同性組み換えとマウス尻尾 DNA によるゲノタイピング

腎における NBCe1 mRNA と蛋白発現量についてはヘテロで野生型の約半分、ホモでは野生型の 10%以下へと著明に低下しており、ノンセンス変異依存 mRNA 分解機構が働いていると考えられた。

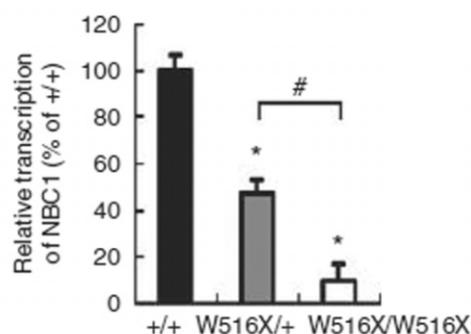


図 2 . 腎における NBCe1 mRNA 発現量

ホモマウスは血中重炭酸濃度が 5 mM 以下と重度の酸血症を呈し、成長障害、腎機能低下、溶血性貧血、脾腫、骨成長障害なども合併していた。

単離した近位尿細管において細胞内 pH 測定法により評価した NBCe1 活性は野生型と比べヘテロで約 50%、ホモでは 10%以下に著しく

低下していた。またこの部位の重炭酸再吸収量も同程度に低下しており、この部位の重炭酸再吸収に NBCe1 活性が不可欠であることが確認された。

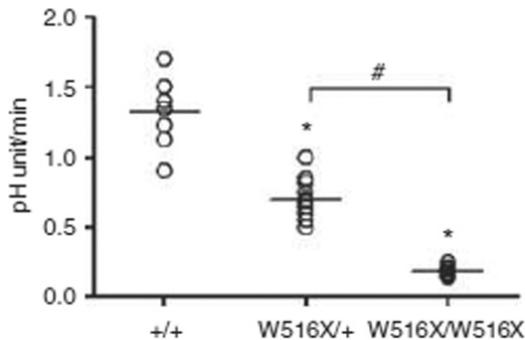


図3．近位尿細管 NBCe1 活性

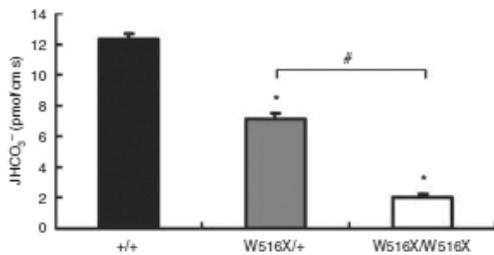


図4．近位尿細管重炭酸再吸収量

ヒトにおける報告と異なり、NBCe1 活性が野生型の約半分のヘテロマウスでも軽度の酸血症がみられた。これは既報の NBCe1 ヘテロ欠損マウスと同様であった。

ホモマウスは既報の NBCe1 KO マウスと同様に未治療の場合、全例生後 20 日前後で死亡した。しかしアルカリ治療によって成長障害もやや改善し、生後 2 カ月程度まで延命可能であり、このように長期生存したホモマウスでは角膜浮腫による角膜混濁が確認された。

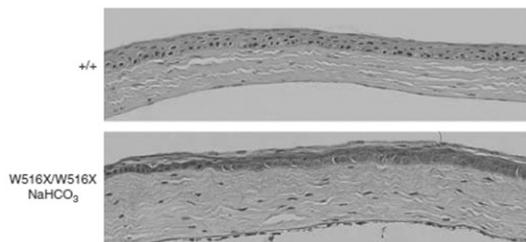


図5．野生型と W516X ホモマウスの角膜

これらの知見より NBCe1 活性はマウスにおいても角膜透過性の維持に不可欠であることが証明された。またアルカリ治療は酸血症によるユビキチンプロテアソーム経路を介した筋分解も抑制し、ある程度の筋肉量の回復を促した。

一方、W516X ホモマウスでは本来酸血症の際に代償性に増加すべき AE1, H-ATPase などの遠位尿細管酸塩基輸送体発現量は増加していなかった。これは重度の酸血症による腎の発育障害や虚血などが関与するためと推察された。また酸血症に対する代償機構はヒトとマウスで若干異なる可能性も示唆された。

以上より、NBCe1 W516X ノックインマウスはヒトの近位尿細管性アシドーシスをかなり再現するモデルであることが示され、今後の PTC124 などの分子治療薬の効果判定に有用と考えられた。

一方、NBCe1 KO マウスや今回作成した NBCe1 W516X ノックインマウスと異なり NHE3 KO マウスはごく軽度の酸血症しか示さない。これは近位尿細管腔側では NHE3 以外にも NHE8 などの輸送体が存在し、NHE3 が欠如しても代償可能であるのに対して、基底側の NBCe1 の欠如を代償できる輸送体がないためと考えられた。

これらの知見は Lo Y, BS, Yang S, Seki G, Yamada H, Horita S, Yamazaki O, Fujita T, MD, Usui T, Tsai J, Yu I, PhD6, Lin S, Lin S: Severe Metabolic Acidosis Causes Early Lethality in NBC1 W516X Knock-in Mice as a Model of Human Isolated Proximal Renal Tubular Acidosis. *Kidney Int* 79, 730-741, 2011 として報告した。

尚、現在までに行った準備的実験においては PTC124 投与によって NBCe1 発現量は若干増加するものの生存延長効果は確認されていない。その原因として重度の酸血症やノンセンス変異依存 mRNA 分解機構の関与などが想定された。現在、invitro の実験系での効果判定などを継続している。

一方、ベルギーで新規に同定された NBCe1 C 末変異 (Δ65bp) 症例を含む大家系の解析などから細胞膜発現を欠如する NBCe1 変異が片頭痛を生じることを明らかにした。この知見は脳内 pH 調節機構と片頭痛の関連を初めて明らかにしたもので Suzuki M, Paesschen WV, Stalmans I, Horita S, Yamada H, Bergmans BA, Legius E, Riant F, Jonghe PD, Li Y, Sekine T, Igarashi T, Fujimoto I, K Mikoshiba M, Shimadzu M, Shiohara M,

Braverman N, Al-Gazali L, Fujita Y, Seki G: Defective membrane expression of the $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ cotransporter NBCe1 is associated with familial migraine. Proc Natl Acad Sci U S A 107: 15963-15968, 2010 として報告した。

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 11 件)

Vaisbich MH, Henriques Ldos S, Igarashi T, Sekine T, Seki G, Koch VH. The long-term use of enalapril and hydrochlorothiazide in two novel mutations patients with Dent's disease type 1. J Bras Nefrol 34(1):78-81, 2012
Horita S, Seki G, Yamada H, Suzuki M, Nakamura M, Fujita T. Metabolic syndrome and insulin signaling in kidney. Endocrinol Metabol Syndrom S1:005. doi:10.4172/2161-1017.S1-005, 2011

Seki G, Yamada H, Horita S, Suzuki M, Yamazaki O, Van Paesschen W, Yang S, Lin S: Physiological and pathophysiological roles of the electrogenic $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ cotransporter NBCe1. Open Journal of Molecular and Integrative Physiology 1, 9-16, 2011

Endo Y, Suzuki M, Yamada H, Horita S, Kunimi M, Yamazaki O, Shirai A, Nakamura M, Iso-O N, Li Y, Hara M, Tsukamoto K, Moriyama N, Kudo A, Kawakami H, Yamauchi T, Kubota N, Kadowaki T, Kume H, Enomoto Y, Homma Y, Seki G, Fujita T: Thiazolidinediones enhance sodium-coupled bicarbonate absorption from renal proximal tubules via PPAR γ -dependent non-genomic signaling. Cell Metab 13, 550-561, 2011
Horita S, Seki G, Yamada H, Suzuki M, Koike K, Fujita T: Insulin resistance, obesity, hypertension and renal sodium transport. Int J Hypertension Volume 2011, Article ID 391762, 2011 (doi:10.4061/2011/391762)

Yong D, Li Q, So I, Huang CL, Ando H, Mizutani A, Seki G, Mikoshiba K, Thomas PJ, Muallem S: IRBIT governs murine epithelial secretion by antagonizing the function of the WNK/SPAK kinases pathway. J Clin Invest 121: 956-965, 2011

Yamazaki O, Yamada H, Suzuki M,

Horita S, Shirai A, Nakamura M, Seki G, Fujita T: Functional characterization of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in the electrogenic $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ cotransporter NBCe1A. Pflugers Arch 461: 249-259, 2011

Yamada H, Horita S, Suzuki M, Fujita F, Seki G: Functional role of a putative carbonic anhydrase II-binding domain in the electrogenic $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ cotransporter NBCe1 expressed in Xenopus oocytes. Channels 5:2, 1-4, 2011

Lo Y, BS, Yang S, Seki G, Yamada H, Horita S, Yamazaki O, Fujita T, MD, Usui T, Tsai J, Yu I, PhD6, Lin S, Lin S: Severe Metabolic Acidosis Causes Early Lethality in NBC1 W516X Knock-in Mice as a Model of Human Isolated Proximal Renal Tubular Acidosis. Kidney Int 79, 730-741, 2011

Suzuki M, Paesschen WV, Stalmans I, Horita S, Yamada H, Bergmans BA, Legius E, Riant F, Jonghe PD, Li Y, Sekine T, Igarashi T, Fujimoto I, K Mikoshiba M, Shimadzu M, Shiohara M, Braverman N, Al-Gazali L, Fujita Y, Seki G: Defective membrane expression of the $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ cotransporter NBCe1 is associated with familial migraine. Proc Natl Acad Sci U S A 107: 15963-15968, 2010

Seki G, Yamada H, Li Y, Horita S, Ishizaka N, Koike K and Fujita T: Roles of MEK/ERK pathway in vascular and renal tubular actions of angiotensin II. Vascular Disease Prevention 6, 154-159, 2009

[学会発表](計 9 件)

山崎 修、山田 秀臣、鈴木 正志、堀田 晶子、遠藤 陽子、白井 雅弓、中村 元信、関 常司、藤田 敏郎: NBCe1 の L522P 変異体はドミナントネガティブ効果を有する。第 54 回日本腎臓学会学術総会 2011 年 6 月 16 日 横浜

関 常司、Sung-Sen Yang, 山崎 修、石黒 洋、山田 秀臣、Shih-Hua Lin: $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ トランスポーター-NBCe1 変異体ノックインマウスと尿細管性アシドーシス。第 54 回日本腎臓学会学術総会 2011 年 6 月 15 日 横浜

関 常司、山田 秀臣、堀田 晶子: 近位尿細管輸送の特性と調節機構。第 88 回日本生理学会大会 2011 年 3 月 30 日 横浜

Suzuki M, Seki G, Horita S, Yamada H, Igarashi T, Fujita T; Defective membrane expression of Na-HCO₃ cotransporter NBCe1 is associated with migraine. Annual Meeting of American Society of Nephrology. (Denver, USA, November 16-21, 2010)
山崎修、Lo Yi-Fen、白井雅弓、山本明子、Song Ying、石黒洋、Yang Sung-Sun、Lin Shih-Hua、堀田晶子、山田秀臣、関常司、藤田敏郎：NBC1 W516X ノックインマウスを用いた NBC1 の生理機能解析。第 5 回トランスポーター研究会 年会 2010 年 7 月 10 日 東京
山崎 修、Lo Yi-Fen、白井 雅弓、山本明子、Song Ying、石黒 洋、Yang Sung-Sun、Lin Shih-Hua、堀田 晶子、山田 秀臣、関 常司、藤田 敏郎：NBC1W516X ノックインマウスによる NBC1 生理的機能の解析。第 53 回日本腎臓学会学術総会 2010 年 6 月 16 日 神戸
山崎 修、山田 秀臣、堀田 晶子、鈴木 正志、関 常司、藤田 敏郎：NBC1 の SNP 変異 K558R は機能低下型変異である。第 53 回日本腎臓学会学術総会 2010 年 6 月 16 日 神戸
Suzuki M, Horita S, Van Paesschen W, Yamada H, Bergmans B, T Sekine T, Igarashi T, Seki G, Fujita T; NBC1 mutations showing defective plasma membrane expression cause pH dysregulation in astrocytes and are associated with migraine. ISN Frontier 2009 (Florence, Italy, September 17-20, 2009)
関 常司、堀田 晶子、鈴木 正志、山田 秀臣：近位尿細管性アシドーシス研究の現状と課題。第 44 回日本小児腎臓学会学術集会 2009 年 6 月 26 日 東京

〔図書〕(計 5 件)

Seki G, Horita S, Suzuki M, Yamazaki O, Yamada H. Pathophysiological roles of mutations in the electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter NBCe1. Gene Mutation 2012 ISBN 980-953-307-125-6
山田 秀臣、関 常司：酸塩基平衡を調節するトランスポーター。BIO Clinica Vol 26 No. 11, 34-40, 2011
関 常司、堀田 晶子、山田 秀臣：腎尿細管性アシドーシス。改訂第 7 版内科学書 396-398, 2009 (中山書店)
堀田 晶子、関 常司、山田 秀臣：近位尿細管機能異常。改訂第 7 版内科学書 391-393, 2009 (中山書店)
山田 秀臣、関 常司：近位尿細管性ア

シドーシスとアンモニア排泄。腎と透析
Vol 67, 53-55, 2009 (東京医学社)

〔その他〕

ホームページ等

業績関連サイト：

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Seki%20G>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関 常司 (SEKI GEORGE)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30206699

(2) 研究分担者

山田 秀臣 (YAMADA HIDEOMI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60396752

堀田 晶子 (HORITA SHOKO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20534895

(3) 連携研究者

()

研究者番号：