

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08255

研究課題名(和文) 巣状糸球体硬化症発症におけるポドサイト特異的遺伝子CRB2の機能解明

研究課題名(英文) Elucidation of the function of podocyte-specific gene CRB2 in the development of focal segmental glomerulosclerosis

研究代表者

片山 鑑 (Katayama, Kan)

三重大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：90742247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：CRB2遺伝子の巣状分節性糸球体硬化症発症に関する役割を、生前と生後でのポドサイト特異的Crb2ノックアウトマウスを作製して解明した。生前マウスモデルでは、2ヶ月齢で高度のアルブミン尿と血尿を呈し、6ヶ月齢で糸球体硬化と間質線維化の進行と電子顕微鏡での足突起の癒合を認め、各種ポドサイト関連タンパクの発現低下を認めた。ヒト培養CRB2ノックアウトポドサイトが、アポトーシスを引き起こしやすいことを同定した。生後マウスモデルでは、腹腔内投与2ヶ月後の時点で高度のアルブミン尿と血尿を呈するだけでなく、投与4ヶ月後の時点で糸球体硬化と間質線維化の進行と電子顕微鏡での足突起の癒合を認めることを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)は難治性疾患となることが多く、成人発症FSGSの一部はポドサイトの単一遺伝子異常が原因である遺伝性FSGSと判明している。今回の研究により、CRB2遺伝子がFSGS発症に関係するポドサイト関連遺伝子であることがマウスモデルで解明されたため、このマウスモデルを用いて新規の治療薬開発が進むと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The role of the CRB2 gene in the development of focal segmental glomerulosclerosis was elucidated by generating podocyte-specific Crb2 knockout mice before and after birth. In the prenatal mouse model, severe albuminuria and hematuria were exhibited at 2 months of age, progression of glomerulosclerosis and interstitial fibrosis, and fusion of foot processes were observed by electron microscopy at 6 months of age, which was associated with decreased expression of various podocyte-related proteins. Cultured human CRB2 knockout podocytes were prone to apoptosis. In the postnatal mouse model, not only did it exhibit severe albuminuria and hematuria 2 months after intraperitoneal administration, but also progression of glomerulosclerosis and interstitial fibrosis, and fusion of foot processes were observed under electron microscopy at 4 months after administration.

研究分野：腎臓内科

キーワード：巣状分節性糸球体硬化症 ポドサイト タンパク尿 アルブミン尿 血尿

1. 研究開始当初の背景

ネフローゼ症候群は大量の尿蛋白・低蛋白血症・浮腫を特徴とし、ステロイド感受性(SSNS)とSRNSに分けられる。SRNSは典型的には腎組織でFSGSの像を呈し、末期腎不全に至ることが多く、まだ治療法が確立されていない難治性疾患である。FSGSのコロンビア分類は5つの病理型からなり、腎予後を推測するのに有用であったが、遺伝性FSGSは含まれていなかった。その後、小児期発症FSGSの約30%は約30個のポドサイト関連遺伝子が原因の遺伝性FSGSであり、成人発症FSGSの約5-10%も遺伝性FSGSであることが判明した(Sadowski CE et al. J Am Soc Nephrol 2015)。研究代表者は遺伝性FSGSをマウスモデルで詳細に調べることがFSGS自体の病態解明と新規治療法の開発につながると考えている。

研究代表者は留学先のスウェーデンのカロリンスカ研究所のラボで、ポドサイト特異的に発現する遺伝子群の大規模なデータベース(Takemoto M et al. EMBO J 2006)を用いて、グループとしてCrb2遺伝子に着目した。研究代表者の所属しているグループで、Crb2遺伝子に関してはゼブラフィッシュでノックダウンするとポドサイトに異常を来すことを証明した(Ebarasi L. Dev Biol 2009)。次に、ノックアウトマウスの作製を試みたが、フルノックアウトマウスは胎生致死となることを明らかにした(Xiao Z et al. Dev Dyn 2011)。ヒトにおいては、2つのグループからCRB2遺伝子の変異がSRNS発症に関与している可能性が報告された(Ebarasi L et al. Am J Hum Genet 2015, Slavotinek A et al. Am J Hum Genet 2015)。1つ目のグループでは、SRNS4家系5人においてCRB2遺伝子の劣性遺伝を認め、FSGSの組織像を5人中4人に認めた(Ebarasi L et al. Am J Hum Genet 2015)。2つ目のグループでは、3家系から5つの胎児と1人の子供においてCRB2遺伝子の劣性遺伝を認め、尿細管に嚢胞形成を認めた(Slavotinek A et al. Am J Hum Genet 2015)。ただ、そのメカニズムに関してはまだ分かっていない点が多い。

これまでの結果から、Crb2遺伝子がSRNSを引き起こす単一遺伝子である可能性が高く、そのメカニズムを解明するために、マウスモデルでの解析が急務となっている。研究代表者は、Cre-loxPシステムを用いてポドサイト特異的にCrb2遺伝子をノックアウトしたマウスを作製した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Crb2遺伝子のFSGS発症に関する役割を、生前と生後にそれぞれポドサイト特異的にCrb2をノックアウトしたマウスモデルを作製して解明することである。本研究で用いるポドサイト特異的Crb2ノックアウトマウスモデルは、exon 7とexon 8をスキップするようにデザインしてある。研究代表者は、Crb2 flox miceとpod-cre miceを交配させることにより、pod-cre群・Crb2 flox/flox群・Crb2 flox/flox & pod-cre群を作製し、生前にポドサイト特異的にCrb2遺伝子をノックアウトしたマウス(Crb2 flox/flox & pod-cre)は2ヶ月齢の時点で高度の蛋白尿と血尿を呈し、6ヶ月齢で糸球体硬化指数や尿細管間質線維化指数が有意に上昇することを確認している。

3. 研究の方法

生後ポドサイト特異的Crb2遺伝子ノックアウトマウスの表現型解析：まず2ヶ月齢の時点でCrb2 flox/flox & NPHS2-CreERT2マウスに対してタモキシフェン(0.15mg/g体重)をサンフラワーオイルに溶かしたもの(Tam群)あるいは何も溶かしていないサンフラワーオイル(NC群)を3日間連続で腹腔内注射として2ヶ月後(4ヶ月齢)あるいは4ヶ月後(6ヶ月齢)でTam群とNC群で解析に必要な動物数(約5匹ずつ)を確保し、尿検査(尿中アルブミン・クレアチニン比)・血液検査(血清クレアチニン・尿素窒素)を行う。次に、腎組織を光顕(PAS染色・マッソントリクローム染色)・電顕・免疫組織で詳細に評価し、生後ポドサイト特異的Crb2遺伝子ノックアウトマウスの表現型を明らかにする。

生前ポドサイト特異的Crb2遺伝子ノックアウトマウスの網羅的RNAシーケンス解析：すでにFSGSを発症することが判明したCrb2 flox/flox & pod-cre群と、対照としてCrb2 flox/flox群で腎臓からRNA抽出を行い、網羅的RNAシーケンス解析を行う。特に、ポドサイト足突起癒合に関連するスリット膜関連タンパクに変動がないかを確認する。

CRB2ノックアウトヒト培養ポドサイト株の樹立：CRISPR-Cas9システムを用いたゲノム編集により不死化したヒトポドサイト培養細胞に対してCRB2ノックアウトを行い、限外希釈法によるシングルセルクローニングでCRB2ノックアウトヒト培養ポドサイト株の樹立を行う。CRB2ノックアウトあるいは野生型ヒト培養ポドサイトを比較・検討する。

生後ポドサイト特異的Crb2遺伝子ノックアウトマウスの網羅的RNAシーケンス解析：Tam群

の表現型が明らかになれば、マグネットビーズ灌流法により Tam 群あるいは NC 群系球体での網羅的 RNA 解析を行い、Tam 群で変動する遺伝子群を同定する。

4. 研究成果

初年度では、生前にポドサイト特異的に Crb2 をノックアウトしたマウスモデル（生前マウスモデル）でのデータを国際英文誌に論文公表した。生前マウスモデルでは、2 ヶ月齢で高度のアルブミン尿と血尿を呈し、6 ヶ月齢で糸球体硬化や尿細管間質線維化が有意に進行することや透過型電子顕微鏡で足突起の癒合を有意に認め、各種ポドサイト関連タンパクの発現低下を認めた。ヒト培養ポドサイトでも CRB2 をノックアウトすると、アポトーシスを引き起こしやすいことを同定した。

次年度では、生後にポドサイト特異的に Crb2 遺伝子をノックアウトしたマウスが生前マウスモデルと同様に陰性コントロールマウスと比較して、4 ヶ月齢（腹腔内投与 2 ヶ月後）の時点で高度のアルブミン尿と血尿を呈するだけでなく、6 ヶ月齢（腹腔内投与 4 ヶ月後）と 10 ヶ月齢（腹腔内投与 8 ヶ月後）の時点で糸球体硬化や尿細管間質線維化が有意に進行することや透過型電子顕微鏡で足突起の癒合を有意に認めることを同定した。

最終年度では、網羅的 RNA 解析を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件/うち国際共著 10件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Saiki R, Katayama K, Kitano M, Tsujimoto K, Tanaka F, Suzuki Y, Murata T, Kurita T, Okamoto R, Takeuchi K, Dohi K.	4. 巻 61
2. 論文標題 A Perihilar Variant of Focal Segmental Glomerulosclerosis Due to De novo Branchio-oto-renal Syndrome.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Intern Med.	6. 最初と最後の頁 2033-2038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.8508-21	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 該当する
1. 著者名 Omori A, Katayama K, Saiki R, Masui S, Suzuki K, Kanii Y, Tsujimoto K, Nakamori S, Kurita T, Murata T, Inoue T, Dohi K.	4. 巻 23
2. 論文標題 Disruption of the glomerular basement membrane associated with nutcracker syndrome and double inferior vena cava in Noonan syndrome: a case report.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Nephrol.	6. 最初と最後の頁 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12882-022-02671-4	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 該当する
1. 著者名 Ito H, Okamoto R, Ali Y, Zhe Y, Katayama K, Ito M, Dohi K.	4. 巻 40
2. 論文標題 Cardiorenal protective effects of sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in combination with angiotensin II type 1 receptor blockade in salt-sensitive Dahl rats.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Hypertens.	6. 最初と最後の頁 956-968
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/HJH.0000000000003099	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 該当する
1. 著者名 Hirabayashi Y, Katayama K, Mori M, Matsuo H, Fujimoto M, Joh K, Murata T, Ito M, Dohi K.	4. 巻 13
2. 論文標題 Mutation Analysis of Thin Basement Membrane Nephropathy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes (Basel).	6. 最初と最後の頁 1779
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes13101779	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 該当する

1. 著者名 Sekine A, Hidaka S, Moriyama T, Shikida Y, Shimazu K, Ishikawa E, Uchiyama K, Kataoka H, Kawano H, Kurashige M, Sato M, Suwabe T, Nakatani S, Otsuka T, Kai H, Katayama K...	4. 巻 11
2. 論文標題 Cystic Kidney Diseases That Require a Differential Diagnosis from Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD).	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 6528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11216528	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 該当する

1. 著者名 Yamawaki M, Katayama K, Fujimoto M, Goto H, Yuasa H, Kozuka Y, Mori M, Takahashi D, Saiki R, Hirabayashi Y, Murata T, Yamanaka K, Dohi K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Bullous Pemphigoid in X-linked Alport Syndrome: A Case Report.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Intern Med.	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) 10.2169/internalmedicine.0972-22	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 該当する

1. 著者名 Hirai T, Ueda S, Ogura T, Katayama K, Dohi K, Hosohata K, Aoyama T, Matsumoto Y, Iwamoto T.	4. 巻 41
2. 論文標題 Hyperkalemia by eplerenone or esaxerenone in the presence or absence of clarithromycin in hypertensive patients: a retrospective observational cohort study.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Hypertens.	6. 最初と最後の頁 580-586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/HJH.00000000000003372	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 該当する

1. 著者名 Mori M, Katayama K, Joh K, Ishikawa E, Dohi K.	4. 巻 16
2. 論文標題 Type VI collagen-related nephropathy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clin Kidney J.	6. 最初と最後の頁 195-196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ckj/sfac126	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 該当する

1. 著者名 Suzuki Y, Katayama K, Saiki R, Hirabayashi Y, Murata T, Ishikawa E, Ito M, Dohi K.	4. 巻 14
2. 論文標題 Mutation Analysis of Autosomal-Dominant Polycystic Kidney Disease Patients.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes (Basel).	6. 最初と最後の頁 443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes14020443	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 該当する

1. 著者名 Tanoue Akiko, Katayama Kan, Ito Yugo, Joh Kensuke, Toda Masaaki, Yasuma Taro, D'Alessandro-Gabazza Corina N., Kawachi Hiroshi, Yan Kunimasa, Ito Masaaki, Gabazza Esteban C., Tryggvason Karl, Dohi Kaoru	4. 巻 11
2. 論文標題 Podocyte-specific Crb2 knockout mice develop focal segmental glomerulosclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-00159-z	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 該当する

〔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	土肥 薫 (Dohi Kaoru) (50422837)	三重大学・医学系研究科・教授 (14101)	

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