

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390223

研究課題名(和文)腎症状を呈する新規ファブリー病モデルマウスの病態の解析と応用

研究課題名(英文)Investigation of pathogenesis of Fabry nephropathy in novel model mouse

研究代表者

丸山 弘樹 (Maruyama, Hiroki)

新潟大学・医歯(薬)学総合研究科・特任教授

研究者番号：10293218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：ファブリー病は、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼA遺伝子(Gla)の変異により、グロボトリアオシルセラミド(Gb3)が全身に蓄積し、慢性腎臓病、心不全、脳血管障害などを来す疾患である。申請者らは、無症状であるGLA欠損マウスにGb3合成系酵素(G3S)を過剰発現させて、ファブリー腎症の早期症状である多尿を呈するマウス(G3stg/Glako)を作出した。これを解析し、Gb3がヘンレの太い上行脚(TAL)に過剰に蓄積し、水・電解質バランスに関わるTAL特異的分子であるウロモジュリン(UMOD)とNa-K-2Cl共輸送体(NKCC2)の発現低下が電解質喪失、尿濃縮能障害などの原因であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Fabry disease (FD) is an X-linked lysosomal storage disorder resulting from a deficiency in the activity of alpha-galactosidase A. This enzyme deficiency causes the systemic lysosomal accumulation of glycolipids, primarily globotriaosylceramide (Gb3), in the vascular endothelium and other tissues. Morbidity and mortality from FD, caused by renal failure, cardiac disease, and early-onset stroke. Glako mice lack significant kidney disease. We generated symptomatic mouse model (G3stg/Glako) by cross-breeding Glako mice with transgenic mice expressing human Gb3 synthase. Polyuria was the conspicuous manifestation. The vacuolation dominated in medullary thick ascending limb of Henle's loop (TAL) and the fibrosis mainly appeared in around mTAL. Real-time RT-PCR, western blot and immunohistochemical analyses revealed that the expression of TAL specific proteins, uromodulin and Na-K-2Cl-cotransporter, were significantly decreased. These caused salt-wasting polyuria in G3stg/Glako.

研究分野：腎臓内科

キーワード：ファブリー病 多尿 尿細管障害 髄質外層内帯 ヘンレ上行脚太い部ヘンレ上行脚太い部 ウロモジュリン NKCC2

1. 研究開始当初の背景

(1) ファブリー病は、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼA 遺伝子 (*GLA*) の変異により、基質であるグロボトリアオシルセラミド (Gb3) が全身臓器に蓄積し、慢性腎臓病、心不全、脳血管障害を来し、40 歳代から 50 歳代で死亡する疾患である。

(2) ファブリー腎症では糸球体病変に関心が集まり、初期から出現する尿細管障害の注目度は低い。しかし、尿濃縮能障害はファブリー腎症の早期症状である (Colley *et al. Br Med J.* 1958)。

Gb3 の蓄積は遠位尿細管であるヘンレ上行脚太い部 (TAL) と遠位曲尿細管に不規則に認められ、尿細管間質障害が腎の予後を決めるが (Gubler *et al. Kidney Int.* 1978)、研究に使える間質線維化を示すモデルがなかった (Weidemann *et al. Orphanet J Rare Dis.* 2013)。

(3) ファブリー病では、以下の未解決の課題がある。

Gb3 が細胞毒性を發揮して組織障害を起こす機序は不明である。

どのように腎障害が発症して進行するのか不明である。

腎障害の治療効果を評価するマーカーがない。

*Glako* マウスは無症状で、腎症状を呈する疾患モデルマウスがない。

尿細管の障害部位は不明であり、尿濃縮障害の機序が解明されていない。

2. 研究の目的

無症状である *Gla* 欠損マウスに Gb3 合成系酵素を過剰発現させて、腎症状 (多尿) を呈する *G3stg/Glako* マウスを作出した。本研究では、このマウスの表現型を解析し、新規ファブリー病モデルマウスとしての有用性を検証し、未解決の課題を解決する。

3. 研究の方法

(1) 尿細管の障害とその部位を明らかにする。

(2) 腎障害が発症して進行する過程を研究する。

(3) 腎障害のマーカーを探る。

(4) 重要な標的臓器である心、骨の経時的推移を解析する。

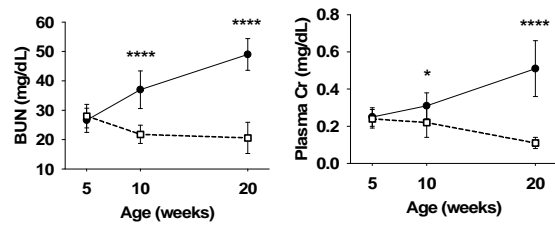
(5) 酵素補充治療による腎症状の改善効果を調べる。

4. 研究成果

(1) 申請者は、細胞の空胞変性と線維化というファブリー腎症の 2 大所見と多尿を呈する *G3stg/Glako* マウスを作出し、Gb3 の負荷が発症に直結することを証明した (Taguchi *et al. Biochem J.* 2013)。

(2) *G3stg/Glako* の腎症状の病態を解析して、野生型マウスと比べて、以下の所見を得た。

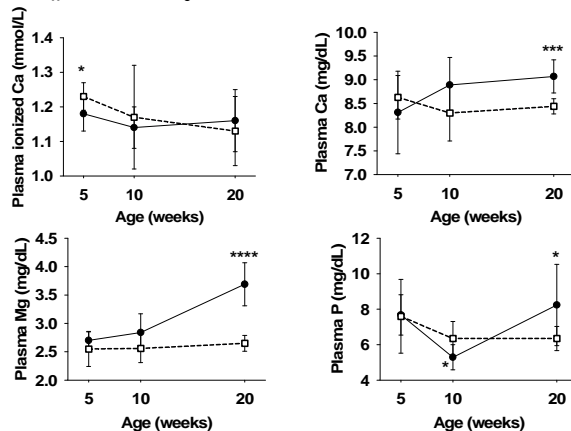
血液生化学検査：週齢とともに進行する尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cr) 値の増加が認められ、慢性腎臓病と診断された。



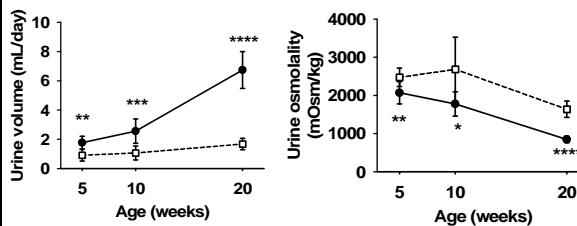
● : *G3stg/Glako* マウス、○ : 野生型マウス

ヘモグロビン値に差は認められず、血液濃縮のため腎性貧血がマスクされていることが疑われた。

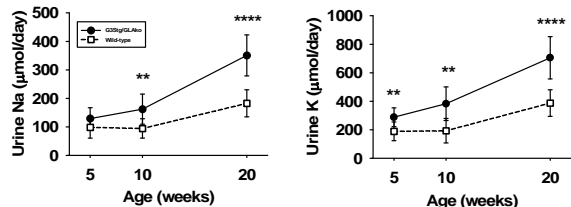
5 週齢ではイオン化 Ca が低値を示した。20 週齢では、高 Ca 血症、高 Mg 血症、高 P 血症が認められた。

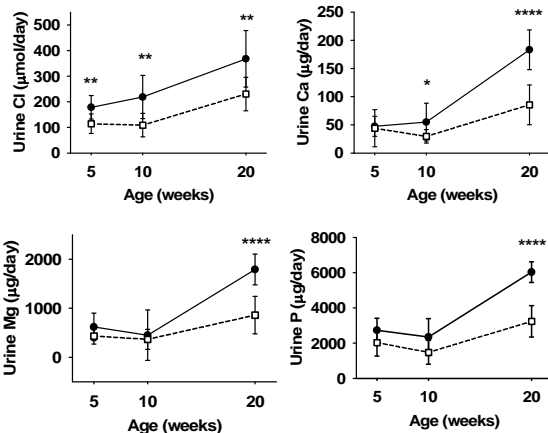


尿濃縮能：多飲、多尿、低尿浸透圧を認めた。尿浸透圧は血漿浸透圧よりも高く、水と溶質の喪失が疑われた。



1 日尿中溶質排泄量：20 週齢では、Na、K、Cl、Ca、Mg、P、UN、Cr で増加が認められた。

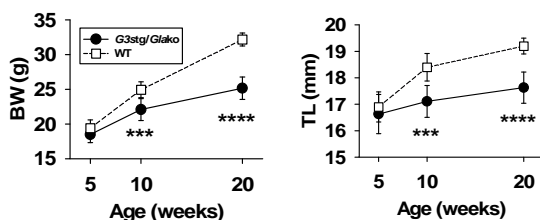




尿細管再吸収：Na、K、Cl、Ca、Mg、Pの排泄分画が高値を示した。

糸球体濾過量：クレアチニンクリアランスの低下を認めた。この機序としては、後述の解析結果も含めて、TALでのNaCl再吸収が低下して、尿細管糸球体フィードバックが作動することによって考えられた。

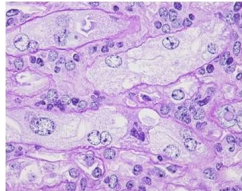
成長：体重（BW）が軽く、脛骨長（TL）が短く、成長障害を認めた。



臓器重量：脛骨長との比（臓器重量/脛骨長）では、心臓、肝臓、脾臓は低値を示し、腎臓だけが高値を示した。G3stg/Glako マウスでは、腎臓へのGb3の蓄積が強く主な臨床像が腎症状であること（Taguchi *et al. Biochem J*, 2013）を反映していると考えられた。

光顕：TALの組織障害の出現時期と強さは部位により異なる。髄質外層内帯のmTALから始まり、髄質外層外帯のmTAL、最後に皮質cTALに広がる。障害の強さもこの順である。

5週齢で、髄質外層内帯のTALに空胞化（Gb3蓄積）、胞体と核の膨化を認め、週齢とともに進行した。2核、核と細胞質の膨化など再生像も認められた。炎症細胞の浸潤を障害があるTALの周囲に認めた。

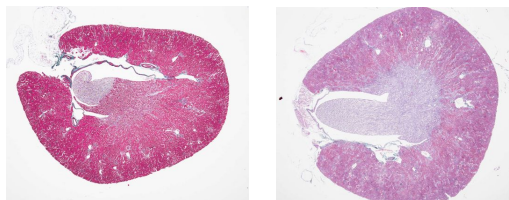


糸球体、近位尿細管、遠位曲尿細管、集合管には空胞化を認めなかった。傍糸球体細胞の肥大は認められなかった。

間質線維化は、10週齢までに障害があるTAL周囲に出現し、進行した。TALの間質線維化の出現時期と強さの部位による差もTAL障害と同じ順である。

## 20週齢野生型

## 20週齢 G3stg/Glako



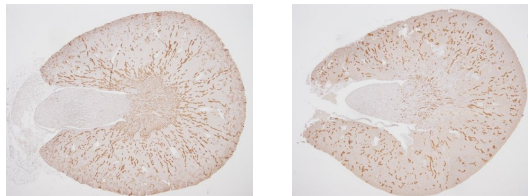
トルイジンブルー染色：TAL細胞の細胞質にドット状、核膜と細胞膜には線状に陽性所見が認められた。

電顕：TAL細胞内に層状構造を認めた。

免疫組織化学染色：TAL特異的蛋白であるウロモジュリン（UMOD）の腎臓内分布の異常は、の組織障害のパターンと一致した。障害部位では本来の細胞内局在（管腔側に発現）が消失した。細胞極性を喪失している可能性がある。

## 20週齢野生型

## 20週齢 G3stg/Glako



TALのNa、K、Cl再吸収と対向流増幅系の形成に關するNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>cotransporter（NKCC2）の染色は、mTALでは低下が認められたが、cTALとマクラデンサでは正常に染色が認められた。

遠位曲尿細管でのNa<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>cotransporter（NCC）の発現と皮質と髄質の全層に亘るアキアポリン（AQP）2の発現に異常は認められなかった。

著しいF4/80陽性細胞（マクロファージ）浸が、髄質外層内帯のTAL周囲に認められた。

リアルタイムPCR（腎のmRNA発現）：UmodとSlc12a1の発現はともに発現が減弱していた。

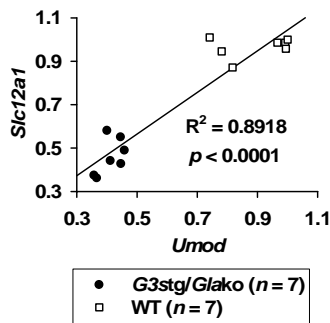
TALの二価陽イオンの細胞間隙再吸収に關するタイトジャンクション蛋白であるクラウディン16（Cldn16）、19（Cldn19）の発現は増強していた。

Slc12a3の発現には差がなかった。Aqp2の発現が増強していた。

線維化に關わる（Col1a1、Col3a1、Fn1）、炎症に關わる（Emr1）、ケモカイン（Ccl2、Cx3c11）とそのレセプター（Ccr2、Cx3cr1）、再生に關わるHgfの発現が増強していた。Tgfb1の発現に差はなかった。

Umodをkey moleculeと捉えて、他の遺伝子の発現との相関を検討した。Umodの発現とSlc12a1の発現には正相関が認められた。Cldn16、Cldn19、Aqp2、Col1a1、Col3a1、Fn1、Ccl2の発現は、いずれもUmodの発現と逆相関が認められた。

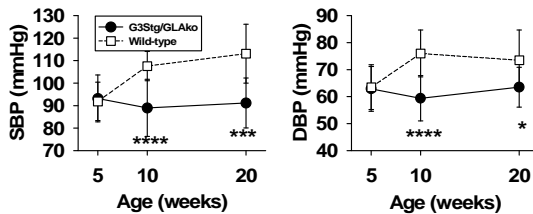




ウエスタンプロット：UMODとNKCC2の蛋白産生の低下を認めた。

フロセミド負荷試験：NKCC2阻害薬であるフロセミド負荷で尿量、Na、Cl、Caの排泄量が増加したが、野生型と比べて、反応が低い。NKCC2機能喪失TAL細胞（髄質外層内帯mTAL）と機能保持TAL細胞（cTAL）の存在を反映していると考えられた。

血圧：収縮期血圧（SBP）、拡張期血圧（DBP）、平均血圧いずれも低下していた。



TAL障害による細胞外液量の減少が原因であると考えられる。

NKCC2変異に起因するI型バーター症候群でも低血圧が認められる。ファブリー病では、血圧が低いことが経験的に知られてきたがその原因は不明であった。

骨代謝：血漿ALP高値、intactPTH高値、二次性副甲状腺機能亢進症を認めた。これにより、PTHが近位尿細管でのPの再吸収を抑制しPの排泄分画高くなったことが高P尿症の原因と考えられた。

大腿骨のμCTでは、骨量減少が海綿骨から始まり、皮質骨が続くパターンを認めた。皮質骨がターゲットになる副甲状腺機能亢進症で認められるパターンと異なり、また、小児の二次性副甲状腺機能亢進症では海綿骨の骨量はむしろ増加する。バーター症候群マウスでは主に皮質骨の骨量減少が認められた。ファブリー病患者では皮質骨の骨量減少と海綿骨の骨量減少の両方がみられる。

骨形計測では、高骨回転を示した。

(3) 以上の解析から、TALにGb3の過剰蓄積、TALの組織的障害(空胞変性、炎症線維化)、機能的障害(TAL特異的分子であるUMODとNKCC2の発現低下)、腎性尿崩症などの腎症状発症というG3stg/Glakoの病態を明らかにした。

TALは多彩な機能を担っており代謝が盛んである(Naポンプ活性は皮質に存在する遠位曲尿細管に次いで高い)こと、髄質は皮質と

比べて約1/10の血流であり、さらにTALが存在する髄質外層の中でも内帯は外帯と比べて血流に恵まれていない。これらが、髄質外層内帯のTALが障害される理由として考えられる。

TALの機能は多彩であり、電解質再吸収、尿濃縮・希釈、二価陽イオンのホメオスタシスに深く関わっている。TAL障害が主体であるG3stg/Glakoマウスは、これらの機能障害を反映した臨床像を呈し、ファブリー病モデルマウスとして有用であると考えられる。

現在、酵素補充治療を行って、これらの臨床像の治療効果を評価している。

#### (4) 今後の展望

研究成果からの最大の気づきは、ファブリー腎症では尿細管(特にTAL)にも目を向けることの重要性である。

UMODは、NKCC2の活性化を調節して、水・電解質バランスに関係し(Mutig *et al.* *JBC*, 2011) UMODの過剰発現は食塩感受性高血圧を引き起こす(Trudu *et al.* *Nat Med*, 2013)、Gb3、UMOD、NKCC2の関連からファブリー腎症の病態を解くという着眼点が得られた。

TAL組織障害の早期発見には、cTALよりも早期から出現し、障害が強いmTALを評価する必要がある。腎生検でmTALにアプローチするのは難しい。非侵襲的にmTALの組織障害を検出する方法が必要であり、開発したい。

尿濃縮能障害、血圧低下、成長障害、骨粗鬆症、UMOD産生低下など、I型バーター症候群(Kemter *et al.* *Am J Physiol*, 2010)と共通の症状を呈した。両疾患ともUMODとNKCC2の関連が病態に関与すると想定される。UMODとNKCC2の代謝異常をTAL機能障害の検出に活用したい。

#### 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2件)

A. Taguchi, H. Maruyama, M. Nameta, T. Yamamoto, J. Matsuda, A. B. Kulkarni, H. Yoshioka, S. Ishii. A symptomatic Fabry disease mouse model generated by inducing globotriaosylceramide synthesis. *Biochem. J.* 456, 373-383, 2013. (査読有り)

H. Maruyama, T. Takata, Y. Tsubata, R. Tazawa, K. Goto, J. Tohyama, I. Narita, H. Yoshioka, S. Ishii. Screening of male dialysis patients for Fabry disease by plasma globotriaosylsphingosine. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 8: 629-636, 2013. (査読有り)

〔学会発表〕(計9件)

第87回日本生化学会大会 国立京都国際会

館（京都府京都市）2014.10.18. 田口 惇美、石井 達、丸山 弘樹、吉岡 秀克. ファブリー病モデルマウスの腎障害に対する酵素補充療法とシヤペロン療法の併用効果.

第 86 回日本生化学会大会 パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）2013.9.13. 田口 惇美、石井 達、丸山 弘樹、吉岡 秀克. ファブリー病モデルマウスにおける Gb3 蓄積の組織学的検討.

第 56 回日本腎臓学会 東京国際フォーラム（東京都千代田区）2013.5.10. 丸山 弘樹、西川 祐司、行田 正晃、山本 格、成田 一衛、石井 達. 新規ファブリー病モデルマウスの病態の解析.

第 85 回日本生化学会大会 福岡国際会議場（福岡県福岡市）2012.12.16. 田口 惇美、石井 達、矢野 信次、丸山 弘樹、吉岡 秀克. Gb3 の高度蓄積とオートファジー障害.

第 55 回日本腎臓学会学術総会 パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）2012.6.1. 丸山 弘樹、清野 詩子、魯 紅梅、多田 昇弘、石島 旨章、金子 晴香、西川 祐司、成田 一衛、石井 達. 新規ファブリー病モデルマウス骨病変.

第 54 回日本腎臓学会 パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）2011.6.15. 丸山 弘樹、清野 詩子、石井 達、西川 祐司、原 正則、行田 正晃、仲澤 幹雄、松山 清治、河内 裕、山本 格、成田 一衛. 新規ファブリー病モデルマウスの病態の解析.

第 43 回日本結合組織学会学術大会・第 58 回マトリックス研究会大会 別府ビーコンプラザ（大分県別府市）2011.6.10. 田口 惇美、石井 達、矢野 信次、丸山 弘樹、吉岡 秀克. 糖脂質蓄積増加により腎症状を示すファブリー病モデルマウス.

平成 23 年度 日本生化学会九州支部例会 久留米大学医学部築水会館（福岡県久留米市）2011.5.22. 田口 惇美、石井 達、矢野 信次、丸山 弘樹、吉岡 秀克. 腎症状を示す新規ファブリー病モデルマウス.

第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 神戸ポートアイランド（兵庫県神戸市）2010.12.10. 田口 惇美、石井 達、矢野 信次、丸山 弘樹、吉岡 秀克. Gb3 の高度蓄積により発症するファブリー病病態モデルマウス.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

丸山 弘樹 (MARUYAMA, Hiroki)  
新潟大学・医歯学総合研究科・特任教授  
研究者番号：10293218

##### (2) 研究分担者

石井 達 (ISHII, Satoshi)  
大分大学・医学部・研究員  
研究者番号：00222935

##### (3) 連携研究者

西川 祐司 (NISHIKAWA, Yuji)  
旭川医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90208166

仲澤 幹雄 (NAKAZAWA, Mikio)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号：80143759

松山 清治 (MATSUYAMA, Kiyoji)  
札幌医科大学・保健医療学部・教授  
研究者番号：40209664

##### (4) 研究協力者

原 正則 (HARA, Masanori)  
新潟県立吉田病院・小児科・部長