

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700522

研究課題名(和文)新規腎臓病モデルマウスの開発

研究課題名(英文)The development of novel and useful mouse models for kidney diseases

研究代表者

内尾 こそえ(Uchio, Kozue)

独立行政法人医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部・主任研究員

研究者番号：70373397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病患者数は年々増加している。腎不全は抜本的な治療がなく、未だ人工透析、腎移植といった負担の大きな治療法に依存している。創薬等を困難にしている原因の一つは、腎不全に至るような腎疾患モデル動物が皆無であることだ。そこで本研究において、腎臓病発症機序解明、創薬・治療法開発に貢献することを目的とし、QTLおよびDNAアレイ解析により、腎疾患発症および増悪に関連するゲノム領域を同定し、そのゲノム領域を持つ汎用性の高い新規腎疾患モデルマウスの作製を行った。これら新規系統は腎臓病進行機序の解明に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The number of patients with chronic kidney diseases (CKD) is expected to increase steadily each year in Japan. It has not been reported the effective therapy for renal insufficiency except dialysis and transplantation. The mechanisms responsible for CKD have not been made clear yet, so that it is difficult to discover effective drugs for kidney diseases. One of the reasons for the difficulties is that suitable animal models for various kidney diseases don't exist. Therefore, in this study, I tried to find the causal genes responsible for the progression of kidney diseases and to make a novel and suitable mouse model for kidney diseases. QTL and DNA array analyses using ICGN mice, a nephrotic syndrome model, revealed that some genomic loci responsible for the progression of kidney diseases. I developed congenic mice carrying these genomic loci, and analyzed the phenotype. These strains might contribute to elucidate the mechanisms responsible for kidney diseases.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：実験動物学 腎疾患

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病患者数は約 1330 万人、人工透析患者数は 26 万人を超え、社会問題となっている。腎臓病には根本的治療法がなく、さらに早期発見も困難であることが要因である。腎不全に至る原因は多様であり、慢性糸球体腎炎・糖尿病・先天性疾患（アルポート症候群など）・自己免疫疾患等が知られているが、バイオマーカー開発・病態進行機序解明に必要なモデル動物が必ずしも存在しない。特に腎不全に至る重篤な表現型を呈するモデル動物は稀有であり、その開発が望まれている。既存の遺伝子改変マウス、5/6 腎摘出ラット、薬物投与モデルなどはヒト腎臓病の表現型と異なる点も多く、ヒトの表現型に近い腎臓病モデル動物の開発が急務である。

2. 研究の目的

日本において慢性腎臓病患者数、人工透析患者数は年々増加している。腎臓病に根本的な治療法がないことが一因となっており、早期発見が最善策である。そのためには腎臓病モデル動物を利用したバイオマーカー探索、病態進行メカニズムの解明が不可欠である。しかしながらヒト腎臓病に近似した表現型を呈する有用なモデル動物が少なく、解析遅延の要因となっている。そこで本研究では腎臓病関連遺伝子を同定し、それら因子を利用した汎用性の高い腎臓病モデルマウスを開発することを目的とする。

3. 研究の方法

申請者が所属する（独）医薬基盤研究所において、腎臓病を自然発症し、腎不全に至るマウス系統（ICGN マウス）を維持し、他機関への分譲事業を行っている。ICGN マウスは糸球体疾患を原因とする一次性ネフローゼ症候群モデルであり、貴重なヒト腎臓病モデルとして有望視されている。そのため大学など研究機関のみならず製薬企業においても利用されている。しかしながら ICGN マウスは病態進行が速く、腎不全に至ることが長所であると同時に維持繁殖が困難という短所にもなっている。さらに個体差が大きく、病態解析・薬効評価が難しいため、系統の改良が求められている。そのためには腎臓病発症・病態進行メカニズムの解明が不可欠である。

上述した腎臓病モデルである ICGN マウスは、細胞接着に関与する *tensin2* に変異を持つことがわかっている。申請者は *tensin2* と腎臓病の関連性を検討するため、変異 *tensin2* を持つ C57BL/6 (B6) および DBA/2 (D2) を遺伝的背景とするコンジェニック系統（以下 B6GN および D2GN と表記）を作製し、病態解析を行った。その結果、ICGN マウスに比し、D2GN の腎病変が軽度であること、B6GN は 1 年齢の時点においても腎疾患を発症していないことを明らかにし

た（発表論文）。このことから ICGN マウスにおいて、*tensin2* 以外の腎疾患増悪因子の存在が強く示唆された。そこで、これらのコンジェニック系統と ICGN マウスとの F2 個体を利用し、QTL 解析を行うことにより、腎疾患関連ゲノム領域の同定を目指した。さらに並行して ICR・ICGN・D2・D2GN・B6・B6GN 系統腎組織の GeneChip 解析を行い、遺伝子発現が変動する pathway を探索し、ゲノム領域の絞り込みを計った。また、これらの方法により同定した腎臓病関連ゲノム領域あるいは変異遺伝子を持つコンジェニックマウス系統を作製し、病態解析を実施した。

- (1) マウス飼育：ICR, D2, B6 は日本クレアより購入した。ICGN, *tensin2* コンジェニック系統 D2GN, B6GN は(独)医薬基盤研究所にて作出した。当該実験は(独)医薬基盤研究所・動物実験委員会で倫理審査を受け、承認されたものである。
- (2) QTL 解析：ICGN マウスおよび変異 *tensin2* を持つコンジェニック系統 B6GN および D2GN の F2 マウス（196 匹および 336 匹）を作出した。12 週齢にて供試し、血液・腎組織を採取した。体重、腎および脾の組織重量を測定した。また尾から DNA を抽出した(QIAGEN EZ1 DNA kit)。その DNA サンプルを用い、マイクロサテライトマーカー 114 箇所について PCR を行った。4%アガロースゲルで電気泳動を行い、分子サイズを確認した。QTXb20 にて QTL 解析し、LOD 値を算出した。
- (3) GeneChip 解析：ICR・ICGN・D2・D2GN・B6・B6GN 系統の腎組織から RNA を抽出した(QIAGEN RNeasy kit)。GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (Affimetrix)にて解析した。
- (4) 血清生化学解析：血清中のアルブミン・クレアチニン・BUN・総コレステロール・アミラーゼをフジドライケムにて測定した。また血清中の抗核抗体については、抗 double strand DNA 抗体検査キット(レビス)にて解析した。
- (5) 病理解析：10%ホルマリン固定した腎組織をパラフィン包埋した。3 μ m に薄切したパラフィン切片を PAS 染色およびシリウスレッド染色を行った。
- (6) コンジェニック系統の作製：QTL および GeneChip 解析で明らかになったゲノム領域および遺伝子について、B6GN を遺伝的背景とするコンジェニック系統を作製した。(2)の QTL 解析で利用したマイクロサテライトマーカーを用い、遺伝子型を判定した。

4. 研究成果

- (1) 腎臓病関連ゲノム領域の同定
ICGN マウスおよび変異 *tensin2* を持つコ

ンジェニック系統 B6GN および D2GN の F2 個体を用いた QTL 解析を実施した。以下の交配により、F2 個体を作出した。

(ICGNxD2GN) x (ICGNxD2GN)

(ICGNxB6GN) x (ICGNxB6GN)

量的形質として、血清アルブミン・クレアチニン・BUN・総コレステロール・アミラーゼ・腎重量/体重・腎組織の病理解析を用いた。F2 マウスを使用し、QTL 解析を行った結果、ICGN マウスの 2,7,12,13,19 番染色体および D2 マウスの 1,11 番染色体に腎臓病に関連するゲノム領域として同定された。

QTL 解析結果

ICGN ゲノム領域

2 番染色体 : D2Mit271 (LOD: 6.14)

7 番染色体 : D7Mit323(LOD: 3.06)

12 番染色体 : D12Mit7(LOD: 3.81)

13 番染色体 : D13Mit9(LOD: 3.38)

19 番染色体 : D19Mit60(LOD: 3.12)

D2 ゲノム領域

1 番染色体 : D1Mit33(LOD: 5.42)

11 番染色体 : D11Mit229(LOD: 3.79)

さらに ICR・ICGN・D2・D2GN・B6・B6GN 系統腎組織から RNA を抽出し、GeneChip 解析を行った結果、ICGN マウスにおいて、自己免疫疾患・炎症に関連する遺伝子群の発現が変動していることが明らかになった(発表論文)。このことは ICGN マウスが糸球体疾患を原因とする一次性ネフローゼ症候群に加え、自己免疫疾患様の症状を伴うことにより、腎臓病が増悪していることを示唆している。そこで、ICGN マウスの病態を再解析した結果、血清中に抗核抗体が存在していること、さらには脾大といった自己免疫疾患様の症状を呈していることが分かった。そこで、QTL 解析の量的形質の一つとして、血清中の抗核抗体値を加えることにした。再度、QTL 解析を実施した結果、抗核抗体産生に関連するゲノム領域として、ICGN マウスの 4 番染色体 (D4Mit149, D4Mit236 近傍) であることが示唆された。

また GeneChip 解析により、ICGN マウス腎において、補体成分の一つである C1s の発現が顕著に低下していることが明らかとなった(発表論文)。そこで ICGN マウスの C1s をシーケンスしたところ、転写開始領域に変異があることが分かった(8bp の欠失)。C1s はヒト全身性エリテマトーデス(SLE)患者において変異が報告されており、自己免疫疾患の原因遺伝子あるいは増悪因子と考えられている。C1s は 6 番染色体に位置しており、QTL 解析では腎臓病関連ゲノム領域候補とはならなかった。GeneChip 解析を併用したことで、自己免疫疾患関連の pathway の関与が明らかとなり、腎臓病関連ゲノム領域・変異遺伝子の同定および ICGN マウスの病態解析に大いに貢献した。

(2)新規腎臓病モデルマウスの作製

QTL 解析によって同定したゲノム領域を持つ B6GN 背景のコンジェニック系統を作製した。B6 系統は腎臓病抵抗性系統として知られているが、B6 が遺伝子改変動物作製に主に使用されることから、多くの研究者が利用している。本研究で作製するマウスを多くの研究者に利用していただくため、さらにはこれまで作製された系統との病態比較・既存系統との組み合わせによる新規モデルの開発・レスキュー実験に利用できるなどメリットも多いため、B6 背景の腎疾患モデルを作製することが重要であると考えた。

QTL 解析によって明らかになった腎臓病を増悪させる領域、即ち ICGN マウスの 2,7,12,13,19 番染色体および D2 マウスの 1,11 番染色体の該当するゲノム領域を持つ B6GN コンジェニック系統を作製した。それぞれの領域を持つ系統は、かなり軽度のタンパク尿を呈する程度の病態であり、B6GN の腎臓病発症には複数のゲノム領域が必要であることが示唆された。また GeneChip 解析の結果、ICGN マウスは SLE 様の症状を呈することが分かり、その原因ゲノム領域が 4 番染色体であることが示唆されたため、その領域を持つマウス系統の作製を開始したが、現時点ではコンジェニック化が終了しておらず、病態解析には至らなかった。引き続き、マウス開発および病態解析を実施する予定である。

さらに GeneChip 解析により明らかとなった ICGN マウスの C1s 変異を持つコンジェニック系統 (B6 および D2 背景) を作製した。20 週齢時において、血清中の抗核抗体を測定したが、陰性であった。脾大などの症状もなく、C1s は SLE の直接の原因ではないことが示唆された。C1s は免疫複合体の分解に関与しており、抗核抗体産生に直接関与しているわけではないと考えられる。そのため、SLE の増悪因子である可能性が高く、既存 SLE モデルマウスとの組み合わせにより、糸球体基底膜の免疫複合体の蓄積を増悪させ、炎症を激化させることが推測される。今後、既存の SLE 系統あるいは本研究で作製予定である SLE コンジェニック系統との組み合わせにより、新規 SLE モデルとして開発が期待される。

本研究で作製した複数のマウス系統と既存の系統との組み合わせにより、様々な病態を呈するモデル動物の作製が可能となる。順次、実験動物バンクからの分譲を開始し、創薬・疾患研究へ貢献したい。

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 10 件)

Uchio-Yamada K., Sawada K., Tamura K., Katayama S., Monobe Y., Yamamoto Y., Ogura A., Manabe N. Tenc1 Deficient Mice Develop Glomerular

Disease in a Strain-Specific Manner. Nephron Experimental Nephrology. 2013; 123: 22-33

Tamura K., Uchio-Yamada K., Manabe N., Noto T., Hirota R., Unami A., Matsumoto M., Miyamae Y. Gene Expression Analysis Detected Low Expression Level of C1s Gene in ICR-derived Glomerulonephritis (ICGN) Mice. Nephron Experimental Nephrology. 2013; 123: 34-45

Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K., Matsuda J. Zygosity Determination in Hairless Mice by PCR Based on Hr(hr) Gene Analysis. Exp Anim. 2013; 62(3): 267-273.

Kinehara M, Kawamura S, Tateyama D, Suga M, Matsumura H, Mimura S, Hirayama N, Hirata M, Uchio-Yamada K., Kohara A, Yanagihara K, Furue MK. Protein kinase C regulates human pluripotent stem cell self-renewal. PLoS One. 2013;8(1): e54122.

Takeda S, Sato N, Uchio-Yamada K., Yu H, Moriguchi A, Rakugi H, Morishita R. Oral glucose loading modulates plasma β -amyloid level in alzheimer's disease patients: potential diagnostic method for Alzheimer's disease. Dement Geriatr Cogn Disord. 2012; 34(1): 25-30.

山本 美江、内尾-山田 こずえ、高野 薫、小倉 淳郎、浅野 敏彦、中川 雅郎「ICR系マウスの遺伝子資源としての有用性」岡山実験動物研究会会報 第28号、p59-62、2012年

Sato N, Takeda S, Uchio-Yamada K., Ueda H, Fujisawa T, Rakugi H, Morishita R., Role of insulin signaling in the interaction between Alzheimer disease and diabetes mellitus: a missing link to therapeutic potential. Current Aging Science, 2011; 4(2): 118-127.

Suzuki O, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K., Matsuda J. Use of sample mixtures for standard curve creation in quantitative western blots. Exp Anim. 2011; 60(2): 193-196.

Suzuki O, Kanai T, Nishikawa T, Yamamoto Y, Noguchi A, Takimoto K, Koura M, Noguchi Y, Uchio-Yamada K., Tsuji S, Matsuda J. Adult onset cardiac dilatation in a transgenic mouse line with Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialyltransferase II (ST3Gal-II) transgenes: a new model for dilated cardiomyopathy. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2011; 87(8):550-562.

Kumagai A, Horike N, Satoh Y, Uebi T, Sasaki T, Itoh Y, Hirata Y, Uchio-Yamada K., Kitagawa K, Uesato S,

Kawahara H, Takemori H, Nagaoka Y. A Potent Inhibitor of SIK2, 3, 3', 7-Trihydroxy-4'-Methoxyflavon (4'-O-Methylfisetin), Promotes Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cells. PLoS One. 2011; 6(10): e26148.

〔学会発表〕(計18件)

河原崎 正貴、矢口 文、千葉 洋祐、鎌田 彰、小泉 大輔、島田 昌彦、内尾 こずえ、根本 直「食餌誘導性肥満マウスにおける畜肉食あるいは魚食が代謝に及ぼす影響」第67回日本栄養・食糧学会大会、2013年5月24-26日、名古屋

河原崎 正貴、矢口 文、千葉 洋祐、鎌田 彰、小泉 大輔、島田 昌彦、内尾 こずえ、根本 直「食餌誘導性肥満マウスにおける畜肉食あるいは魚食が代謝に及ぼす影響」第8回メタボポロームシンポジウム、2013年10月3-4日、福岡

里 直行、森-植田 茉莉、田中稔久、武田朱公、向園昌弘、澤口翔伍、内尾-山田 こずえ、篠原 充、村山繁雄、武田雅俊、樂木宏実、森下竜一「糖尿病はアルツハイマー病における恒常性維持機構を破綻させる」第32回日本認知症学会学術集会、2013年11月9日、松本

里 直行、森-植田 茉莉、田中稔久、澤口翔伍、向園昌弘、武田朱公、篠原 充、村山繁雄、内尾-山田 こずえ、上田裕紀、武田雅俊、樂木宏実、森下竜一「Abeta is prerequisite. But insufficient to cause tau phosphorylation in vivo: Tau phosphorylation in APP mice by diabetes.」第36回日本分子生物学会、2013年12月3-7日、神戸

Sato N, Mori-Ueda M, Tanaka T, Takeda S, Uchio-Yamada K., Ueda H, Shinohara M, Murayama S, Takeda M, Rakugi H, Morishita R."Possible involvements of Abeta, insulin signaling and tau phosphorylation in the pathological interaction between Alzheimer disease and diabetes" AAIC 2013 The Alzheimer's Association International Conference 2013, 14th, July, 2013, Boston

里 直行、森-植田 茉莉、田中 稔久、武田 朱公、内尾-山田 こずえ、篠原 充、村山 繁雄、武田 雅俊、樂木 宏実、森下 竜一「アルツハイマー病 APP Tg マウス脳における糖尿病によるタウ・リン酸化の促進」脳心血管抗加齢研究会 2012、2012年11月18日、大阪

里 直行、武田 朱公、内尾-山田 こず

え、湯久浩、守口篤、樂木宏実、森下竜一「糖負荷試験における血中アミロイド測定 アルツハイマー病診断補助方法としての可能性」脳心血管抗加齢研究会 2012、2012年11月18日、大阪

里直行、森植田茉莉、田中稔久、武田朱公、内尾山田こずえ、篠原充、村山繁雄、武田雅俊、樂木宏実、森下竜一「糖尿病はAPPトランスジェニックマウス脳においてタウのリン酸化を促進する」第31回日本認知症学会学術集会、2012年10月26-28日、つくば

武田朱公、里直行、内尾山田こずえ、湯久浩、守口篤、樂木宏実、森下竜一「糖負荷後血中A値の変動とそのアルツハイマー病診断指標としての応用」VAS-COG JAPAN 2012、2012年9月8日、東京、YIA（臨床部門）

里直行、森植田茉莉、田中稔久、武田朱公、内尾山田こずえ、篠原充、村山繁雄、武田雅俊、樂木宏実、森下竜一「糖尿病によるアルツハイマー病トランスジェニックマウス脳におけるタウのリン酸化の促進」VAS-COG JAPAN 2012、2012年9月9日、東京

Sato N, Mori-Ueda M, Tanaka T, Takeda S, Uchio-Yamada K, Ueda H, Shinohara M, Murayama S, Takeda M, Rakugi H, Morishita R. "Roles of beta-amyloid and insulin resistance in the interaction between diabetes mellitus and Alzheimer's disease" Gordon Research Conferences, Neurobiology of Brain Disorders Chair: Jie Shen, Vice Chair: Joachim J. Herz Stonehill College, August 5-10, 2012

Sato N, Mori-Ueda M, Tanaka T, Takeda S, Uchio-Yamada K, Ueda H, Shinohara M, Murayama S, Takeda M, Rakugi H, Morishita R. "The mechanisms by which diabetes mellitus increases the risk of Alzheimer's disease" Keystone Symposia, Aging and Diseases of Aging, October 25, 2012, Tokyo

Sato N, Mori-Ueda M, Tanaka T, Takeda S, Uchio-Yamada K, Ueda H, Shinohara M, Murayama S, Takeda M, Rakugi H, Morishita R. "Old APPxob/ob mice showed highly increased level of tau phosphorylation in brain" Neuroscience 2012, October 15, 2012, New Orleans

里直行、武田朱公、内尾山田こずえ、樂木宏実、森下竜一「アルツハイマー病と糖尿病の相互的病態修飾」第54回日本糖尿病学会年次学術集会、2011年5月21日、札幌

里直行、武田朱公、内尾山田こずえ、樂木宏実、森下竜一「糖尿病がアルツハイマー病の後天的危険因子である機序」第52回日本神経学会学術大会、2011年5月19日、名古屋

武田朱公、里直行、内尾こずえ、澤田京子、國枝孝典、篠原充、樂木宏実、森下竜一「糖負荷による血中Aの変動を利用した新たなアルツハイマー病診断指標の探索：全身糖代謝が血中A濃度に与える影響の検討」第10回日本抗加齢医学会総会、ポスターセッション：脳・神経1(P165)、2010年6月12日、京都（ポスター）Sato N, Takeda S, Ueda M, Yu H, Moriguchi A, Uchio-Yamada K, Rakugi H, Morishita R. "Change in plasma beta-amyloid level after glucose loading: a possible biomarker for Alzheimer Disease" AAIC (Alzheimer Association International Conference) 2011, 2011 July 18, Paris

Takeda S, Sato N, Uchio-Yamada K, Yu H, Moriguchi A, Rakugi H, Morishita R. "Alteration in Plasma Beta-amyloid Levels after Glucose Loading Could Be a Novel Diagnostic Marker for Alzheimer Disease" The 10th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases (ADPD 2011), 2011 March 9, Barcelona, Spain (Poster session 1)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

・原発性ネフローゼマウスの解析

http://animal.nibio.go.jp/research/j_ign_research.html

・マウス標準系統プロファイリング

http://animal.nibio.go.jp/research/j_profiling.html

・ICGNマウス詳細データ

http://animal.nibio.go.jp/j_icgnmouse.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内尾こずえ (UCHIO, Kozue)

(独)医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部・主任研究員

研究者番号：70373397

(2) 研究分担者 該当なし

(3)連携研究者 該当なし