

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791797

研究課題名（和文）シスチン尿症を発症するAMSH-LPノックアウトマウスの解析

研究課題名（英文）AMSH-LP knock out mice cause cystinuria

研究代表者

櫻田 祐（SAKURADA YU）

地方独立行政法人宮城県立がんセンター（研究所）・がん先進治療開発研究部・

特任研究員

研究者番号：70531325

研究成果の概要（和文）：

我々は、AMSH-LP の生体内における作用を解析するために、AMSH-LP コンディショナルノックアウトマウスを作成した。全身でノックアウトを誘導したところ、意外なことに生後 1 年ほど経過したノックアウトマウスが水腎症を発生することを見いだした。解剖の結果、水腎症マウスはいずれも尿路結石を伴っており、結石成分分析の結果シスチンが 95%以上であった。尿中アミノ酸を定量したところ、cystine, ornithine, lysine, arginine の濃度が明瞭に上昇しており、ヒトにおけるシスチン尿症に一致する表現型であることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

To investigate the role on AMSH-LP in vivo, we generated AMSH-LP conditional knock out mice. Surprisingly, hydronephrosis was occurred in one-year old age when AMSH-LP knock out was induced in whole body. Pathologically, urolithiasis was present in hydronephrotic mice. Bladder stone analysis revealed that the stone was consisted of cystine (95%). In urine analysis, the concentration of cystine, ornithine, lysine, and arginine was increased in AMSH-LP knock out mice. Taken together, AMSH-knock out mice were similar to the cystinuria in human.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：シスチン尿症

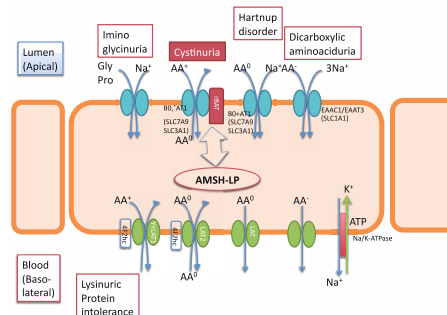
1. 研究開始当初の背景

シスチン尿症は、常染色体劣性遺伝であり、腎尿細管におけるシスチンの再吸収異常により尿中のシスチン濃度が上昇し、尿中排泄が増加する結果、尿路内にシスチン結石の形成を来す。シスチン尿症は腎結石の原因のうち成人では1-2%、小児では6-8%を占める。シスチン尿症の発症頻度は15,000:1から50,000:1であるが、患者は繰り返す尿路結石によって腎不全に至るため重要な疾患である。シスチン尿症は、二塩基性アミノ酸輸送システムの先天性な欠損による疾患である。近年、塩基性アミノ酸輸送担体遺伝子(rBAT/SLC3A1)の異常がシスチン尿症の原因であることが報告された。また、rBATとヘテロ二量体を形成しするB(0,+)/AT/SLC7A9も原因遺伝子として同定されている。

我々は以前に、脱ユビキチン化酵素であるAMSH-LPを単離した(菊地・菅村ら、BBRC,2003)。その後、AMSH-LPはLys63のユビキチン鎖を切断することが*in vitro*で判明したが、何をターゲットとして脱ユビキチン化を行うのか、どの臓器で主要な役割を果たすのか等、生体内での機能は全く不明のままであった。

2. 研究の目的

我々はAMSH-LPがアミノ酸トランスポーターの輸送を制御するという仮説をノックアウトマウスおよび細胞株を用いて検証する。さらに、シスチン尿症患者におけるAMSH-LPの遺伝子変異を検索し、シスチン



尿症を引き起こす新規責任遺伝子であることを証明する。

3. 研究の方法

AMSH-LPノックアウトマウスを作成し、その表現型を解析する。

4. 研究成果

我々は、AMSH-LPの生体内における作用を解析するために、AMSH-LPコンディショナルノックアウトマウスを作成した。全身でノックアウトを誘導したところ、野生型、ノックアウトいずれも正常に発達し、生殖能力を有したが、意外なことに生後1年ほど経過したノックアウトマウスが水腎症を発生することを見いだした。解剖の結果、水腎症マウスはいずれも膀胱結石を伴っており、結石成分分析の結果シスチンが95%以上であった。メタボリックケージ内で飼育し、蓄尿した上で尿中アミノ酸を定量したところ、cystine, ornithine, lysine, arginineの濃度が明瞭に上昇しており、ヒトにおけるシスチン尿症

に一致する表現型であることが判明した。その他の臓器では、病理学的には明らかな異常は見いだせなかった。血清の生化学的検査を行ったが、BUN, Cre をはじめとして明らかな異常所見を認めなかった。Homology の高い amsh 遺伝子をノックアウトすると、海馬神経の脱落が引き起こされるが、AMSH-LP ノックアウトマウスの脳に明らかな異常は見られなかった。

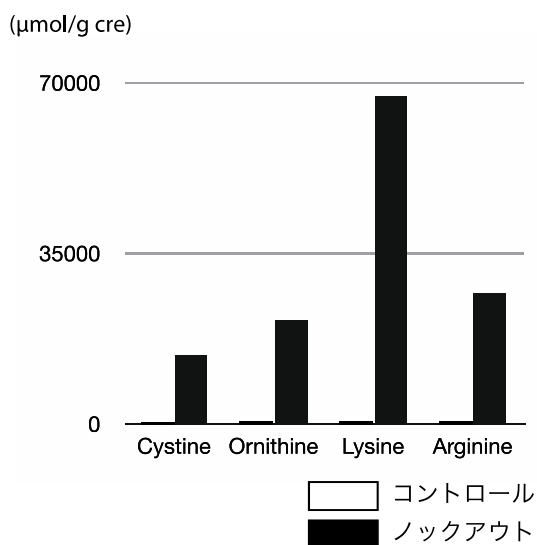
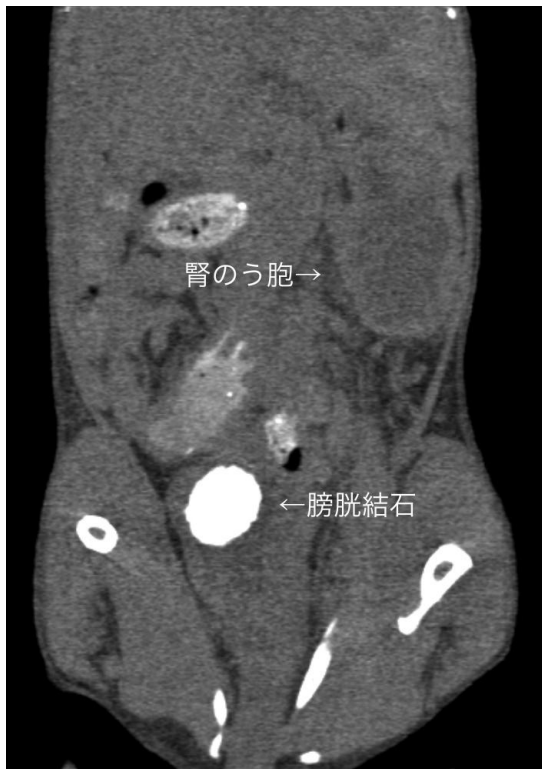


図 尿中アミノ酸定量

以上のことから、AMSH-LP は腎におけるシスチントランスポータに作用することが考えられた。

5. 主な発表論文等

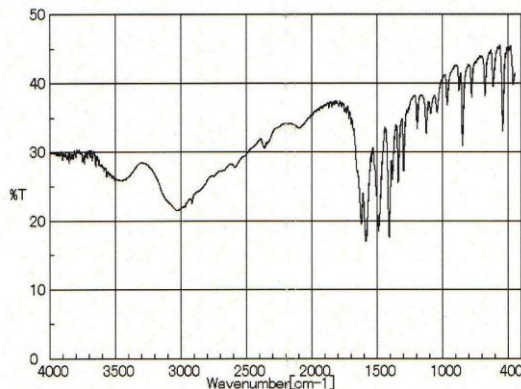


図 膀胱結石の成分分析。95%以上シスチンであった。

(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 1 件)

① 栃木 達夫, 櫻田 祐, 青木 大志, 川村 貞文, 伊藤 しげみ, 佐藤 郁郎, 立野 紘雄。筋層非浸潤性膀胱癌における経尿道的膀胱腫瘍切除術 (TURBT) 後塩酸ピラルビシン (THP) 3 日間連続膀胱内注入療法 of 膀胱内再発に関する検討。日本泌尿器科学会雑誌 (0021-5287) 103 巻 4 号 Page610-616

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻田 祐 (SAKURADA YU)

地方独立行政法人宮城県立がんセンター
(研究所)・がん先進治療開発研究部・

特任研究員

研究者番号 : 70531325

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

該当せず