

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430083

研究課題名(和文) ICGN マウスを用いた慢性腎臓病に対する抵抗性/感受性遺伝子の同定

研究課題名(英文) Quantitative Trait Loci for Resistance to the Congenital Nephropathy in Tnsin2-Deficient Mice

研究代表者

佐々木 宣哉 (Sasaki, Nobuya)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：20302614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：Tnsin2 (Tns2)の欠損は腎糸球体上皮細胞(ポドサイト)を傷害し、タンパク尿、糸球体傷害、尿細管間質傷害を段階的に呈する慢性腎臓病を引き起こす。しかし、その病態は遺伝的背景の影響を著しく受ける。Tns2の欠損によりポドサイト足突起が変性するが、感受性系統のICGNマウスと抵抗性系統のB6マウスの戻し交配群を用い腎症の重篤度の評価及び遺伝学的解析を行ったところ、第2染色体上の別々の領域に、ポドサイト傷害に關与する領域と尿細管間質傷害に關与する領域が同定された。

研究成果の概要(英文)：Tnsin2 (Tns2) deficiency results in alterations in podocytes and subsequent glomerular and tubulointerstitial injuries. However, this pathology is critically dependent on genetic background. While the Tns2-deficient podocytes of resistant murine strains, including C57BL/6J (B6) mice, remain almost intact, susceptible murine strains with Tns2 deficiency, including ICGN mice, develop chronic kidney disease following alterations in the podocyte foot processes. Genome-wide linkage analysis was utilized to identify the QTL associated with the disease phenotypes on mouse chromosome (chr) 2. We developed 6 subcongenic strains that carry B6-derived chr segments from the consomic strain. One showed significantly milder albuminuria, another showed significantly milder tubulointerstitial injury. These data indicate that mouse chr 2 harbors two major genes associated with the severities of nephropathy induced by Tns2 deficiency.

研究分野：実験動物学

キーワード：ICGNマウス 慢性腎臓病 ポドサイト 尿細管間質傷害 Tnsin2

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)は、免疫系の異常や高血圧、糖尿病などに起因する腎疾患の総称であり、最終的には腎不全により死に至る重要な疾患である。多くのCKDにおいて腎機能低下の進行度は糸球体硬化症の程度に比例している。近年、糸球体硬化症の直接の原因として、糸球体において血液を濾過し原尿を作る足細胞の形態異常が提唱されている。さらに家族性糸球体硬化症の遺伝学的解析によっても、足細胞特異的な遺伝子の異常が次々と解明され、原因にかかわらず、糸球体硬化症の原因は足細胞の異常であるということが有力となった。糸球体硬化症に続き、漏出した血液成分が、尿管や尿管近傍のエリスロポエチン産生細胞ダメージを与え、尿管間質線維化や腎性貧血の原因となり、より重篤な腎不全に移行するが、その重篤度は個人差が大きくCKDはポリジェニック疾患と考えられている。悪性化には腎臓を構成する様々な細胞での複数の遺伝子や関連するシグナル経路が関与すると考えられるが、他の疾患に比べ分子機構に関する研究は著しく遅れている。

2. 研究の目的

Tensin2(*Tns2*)遺伝子変異に起因する腎臓病に対して高感受性のICGNマウスと抵抗性のC57BL/6J系統(以下、B6)の戻し交配家系を用いて、腎機能パラメーターや腎症悪性化に特異的な病理学的経過である糸球体硬化、尿管間質線維化、腎性貧血を量的形質としたQTL解析を行うことにより、各々の原因遺伝子座および原因遺伝子を同定し、腎症悪性化の過程における複数の分子機構を解明する。

3. 研究の方法

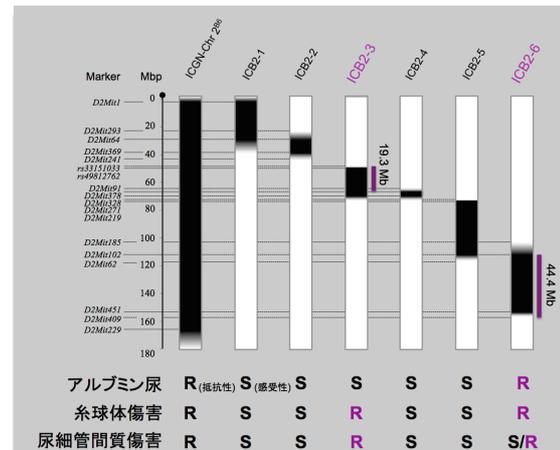
*Tns2*変異に起因する腎臓病に対して高感受性のICGNと抵抗性のB6系統の戻し交配家系を用いて、腎機能低下、病理学的変化、腎性貧血の重篤度を量的形質としたQTL解析を行い、CKDの修飾遺伝子座を同定する。さらにコンジェニックマウスを作出することによって原因遺伝子座を狭め、ゲノムデータベースによる遺伝子機能の推定、N2個体間での発現比較、SNP解析を行い、これらの結果から候補遺伝子を決定する。

4. 研究成果

抵抗性系統であるB6とICGNの交配群の内、*Tns2*変異を有するマウスの腎障害を量的形質とした全ゲノム関連解析を行い、第

2, 13, X染色体に間質線維化の重篤度に関与するQTL、さらに、第2染色体に糸球体障害の重篤度に関与するQTLを検出した。続いて、抵抗性系統であるB6マウスの第2染色体に由来する部分断片をICGNマウスに導入したコンジェニック系統の解析により、第2染色体上のCKD抵抗性遺伝子座の存在を証明した。次に、抵抗性系統であるB6の第2染色体に由来する部分断片をICGNに導入したサブコンジェニック系統の解析により、マウス第2染色体上に、足細胞傷害に対して抵抗する領域(*Tpir*)と、CKDの終末病態である尿管間質傷害に対して抵抗する領域(*Ttir*)が別々に存在することを明らかにした(図)。興味深いことに、*Tpir*および*Ttir*遺伝子座はCKDの原疾患を問わず抵抗性効果を有することが示唆された。現在、責任遺伝子を同定するため研究を進めており、同定のためのノックアウトマウス作製を行っている。

ICGN-Chr2^{B6}のサブコンジェニック系統の解析



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13件)

Sasaki, H., Kimura, J., Nagasaki, K., Marusugi, K., Agui, T., Sasaki, N. 2016. Mouse chromosome 2 harbors genetic determinants of resistance to podocyte injury and renal tubulointerstitial fibrosis. BMC Genetics. (査読有)

Marusugi, K., Nakano, K., Sasaki, H., Kimura, J., Yanobu-Takanashi, R., Okamura, T., Sasaki, N. 2016. Functional validation of tensin2 SH2-PTB domain by CRISPR/Cas9-mediated genome editing. J. Vet. Med. Sci. (査読有)

Huang, J., Dang, R., Torigoe, D., Li, A., Lei, C., Sasaki, N., Wang, J., Agui, T. 2016. QTL analysis of modifiers for pigmentary disorder in rats carrying *Ednrb*^{s1} mutations. Scientific Reports. (査読有)

Sasaki, H., Marusugi, K., Kimura, J., Kitamura, H., Nagasaki, K., Torigoe, D., Agui, T., Sasaki, N. 2015. Genetic background-dependent diversity in renal failure caused by the tensin2 gene deficiency in the mouse. *Biomed Res.* 36: 323-330. (査読有)

Motoya, T., Nagata, N., Komori, H., Doi, I., Kurosawa, M., Keta, T., Sasaki, N., Ishii, K. 2015. The high prevalence of hepatitis E virus infection in wild boars in Ibaraki Prefecture, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 77: 1705-1709. (査読有)

Huang, J., Dang, R., Torigoe, D., Lei, C., Lan, X., Chen, H., Sasaki, N., Wang, J., Agui, T. 2015. Identification of genetic loci affecting the severity of symptoms of Hirschsprung disease in rats carrying *Ednrb*^{sl} mutations by quantitative trait locus analysis. *PLoS ONE.* 10: e0122068. (査読有)

Huanga, J., Dang, R., Torigoe, D., Lib A., Leib, C., Sasaki, N., Wang, J., Agui, T. 2015. Genetic variation in the GDNF promoter affects its expression and modifies the severity of Hirschsprung's disease in rats carrying *Ednrb*^{sl} mutations. *GENE.* 575: 144-148. (査読有)

Fernández, IV., Okamoto, N., Ito, A., Fukuda, M., Someya, A., Nishino, Y., Sasaki, N., Maeda A. 2014. Development of a novel protocol for generating flavivirus reporter particles. *J Virol Methods.* 208: 96-101. (査読有)

Asano, A., Torigoe, D., Sasaki, N., Agui, T. 2014. Development of an ELISA using a recombinant P46-like lipoprotein for diagnosis of *Mycoplasma pulmonis* infection in rodents. *J. Vet. Med. Sci.* 76: 151-157. (査読有)

Sasaki, H., Sasaki, N., Nishino, T., Nagasaki, K., Kitamura, H., Torigoe, D., Agui, T. 2014. Quantitative trait loci for resistance to the congenital nephropathy in tensin 2-deficient mice. *PLoS ONE:* 9. e99602. (査読有)

Yoshii, K., Moritoh, K., Nagata, N., Yokozawa, K., Sasaki, N., Kariwa, H., Agui, T. and Takashima, I. 2013. Susceptibility to flavivirus-specific antiviral response of Oas1b affects the neurovirulence of the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus. *Arch Virol.* 158: 1039-1046. (査読有)

Sasaki, N., Yamauchi, H., Nishino, T. and Agui, T. 2013. The telocentric tandem repeat at p-arm is not conserved in the *Mus musculus* subspecies. *GENE.* 513: 214-218. (査読有)

Asano, A., Torigoe, D., Sasaki, N., Agui, T. 2013. Epitope mapping of the nucleocapsid protein of Sendai virus and application of antigenic epitopes for the ELISA-based diagnosis of Sendai virus infection. *J. Vet. Med. Sci.* 75: 909-916. (査読有)

[学会発表](計 10件)

丸杉貴世馬、中野堅太、木村純平、佐々木隼人、岡村匡史、佐々木宣哉、CRISPR/Casシ

ステムを用いた Tensin2 の SH2/PTB ドメインの機能解析、第 158 回日本獣医学会学術集会、2015 年 09 月 7 日、北里大学獣医学部 (青森県十和田市)

佐々木隼人、木村純平、長崎健一、鳥越大輔、安居院高志、佐々木宣哉、マウス第 2 染色体上の 2 つの腎症抵抗性領域はそれぞれ尿細管間質傷害抑制とポドサイト傷害抑制に寄与している、第 158 回日本獣医学会学術集会、2015 年 09 月 7 日、北里大学獣医学部 (青森県十和田市)

Sasaki, H., Sasaki, N., Nagasaki, K., Torigoe, D., Agui, T. Production of congenic mouse strains with mutated or wild-typed Tensin 2 gene in multiple inbred mouse genetic backgrounds to elucidate the mechanism for renal failure due to Tensin 2 deficiency. Annual Meeting of the American Society of Nephrology 2014. 2014 年 11 月 14 日, (Philadelphia, Pennsylvania USA).

Sasaki, H., Marusugi, K., Kimura, J., Kitamura, H., Nagasaki, K., Kon, Y., Torigoe, D., Agui, T., Sasaki, N. Verification of the congenital nephropathy resistant locus using tensin2 mutant congenic mice. The 65th American Association for Laboratory Animal Science National Meeting. 2014 年 10 月 21 日, (San Antonio, Texas USA).

佐々木隼人、丸杉貴世馬、木村純平、北村浩、長崎健一、昆泰寛、鳥越大輔、安居院高志、佐々木宣哉、異なる近交系の遺伝的背景比較による系球体上皮細胞における Tensin 2 機能解明へのアプローチ、第 157 回日本獣医学会 2014 年 09 月 11 日、北海道大学 (北海道札幌市)

佐々木隼人、佐々木宣哉、長崎健一、鳥越大輔、安居院高志、第 2 染色体上の腎症抵抗性候補遺伝子は腎間質の線維化を抑制している、第 11 回北海道実験動物研究会、2014 年 07 月 26 日、北海道大学(北海道札幌市)

佐々木隼人、佐々木宣哉、長崎健一、鳥越大輔、安居院高志、Tensin2 変異コンジェニックマウスを用いた慢性腎臓病抵抗性遺伝子座の証明、日本実験動物科学技術さっぽろ 2014、2014 年 05 月 17 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

佐々木隼人、佐々木宣哉、長崎健一、鳥越大輔、安居院高志、Tensin2 変異マウスを用いた慢性腎臓病修飾遺伝子座の同定、第 156 回日本獣医学会学術集会、2013 年 09 月 20 日 岐阜大学(岐阜県岐阜市)

鳥越大輔、Abbas Ahmed、佐々木宣哉、安居院高志、コンジェニックマウスを用いたセンドライウイルス抵抗性遺伝子座の証明、第 10 回北海道実験動物研究会、2013 年 07 月 13 日 ニセコいこいの村 (北海道虻田郡ニセコ町)

佐々木隼人、佐々木宣哉、西野智博、長崎健一、鳥越大輔、安居院高志連鎖解析法を用いた ICGN マウスの慢性腎臓病修飾遺伝子座の

探索、第 10 回北海道実験動物研究会、2013
年 07 月 13 日 ニセコいこいの村（北海道虻
田郡ニセコ町）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 宣哉 (SASAKI Nobuya)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：2 0 3 0 2 6 1 4