

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461238

研究課題名(和文) 逆転写酵素阻害薬・エファビレンツは半月体形成性腎炎の新薬になり得るか？

研究課題名(英文) Does the reverse transcriptase inhibitor, Efavirenz, have a therapeutic effect for crescentic nephritis?

研究代表者

清水 芳男 (Yoshio, Shimizu)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：50359577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、これまで半月体形成性腎炎モデルのマウスBSA腎炎の糸球体において、半月体形成期にL1レトロトランスポゾン活性が上昇し、逆転写酵素阻害薬のエファビレンツによって、半月体形成が抑制されることを明らかにした。ヒトレトロトランスポゾンを強制発現し、かつレトロトランスポジションが生じた部位にEGFPが発現するhL1-EGFP Tgマウスにおいて、BSA腎炎を惹起し、半月体を形成させた。半月体形成腎でのEGFPの発現は、蛍光抗体法にて明らかにならず、レトロトランスポジションが病態の原因ではなく、L1レトロトランスポゾンの活性化によって大量に発現する小DNAが病態の一因であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We reported that retrotransposon activated a glomerular crescent forming phase in mouse BSA nephritis and a reverse transcriptase inhibitor, Efavirenz, clearly prevented crescent formation. We tried the same protocol to the hL1-EGFP Tg mice which over-express human retrotransposon and show the retrotransposition site by EGFP. By Immunofluorescence, EGFP was not detected in the BSA nephritis tissues. It was suggested that abundant small DNA driven by L1 retrotransposon is a possible inducer of crescent formation.

研究分野：臨床腎臓病学

キーワード：半月体形成性腎炎 レトロトランスポゾン 実験腎炎 逆転写酵素

## 1. 研究開始当初の背景

半月体は、腎小体の糸球体とボウマン嚢の間の空間(ボウマン腔)に生じる原因不明の細胞増殖である。糸球体腎炎において、半月体は、予後不良を示す病理学的な所見である。糸球体腎炎のうち、急速進行性腎炎症候群(Rapidly progressive glomerulonephritis; RPGN)は、数週~数ヶ月で正常であった腎機能が廃絶し、病理学的には半月体がびまん性にみとめられる。半月体がいかなるプロセスで形成されるか、また RPGN の病態形成機序も明らかにされておらず、半月体形成を抑制する新規治療法も開発されていない状況である。

ウシアルブミン(Bovine serum albumin; BSA)を抗原とするマウス BSA 腎炎は、BSA を Freund 完全アジュバンドと共に2週毎に4回皮下免疫を行い被検マウスの血中に抗 BSA-IgG を大量に産生させ、次いで腹腔内に BSA を28日間連続して投与することにより、免疫複合体型の腎炎を惹起するモデルである。およそ3か月間のプロトコルを完遂すると高率に半月体が形成される。また、半月体はプロトコルの最終週で形成されるため、半月体形成性腎炎だけでなく、RPGN のよい動物モデルであると考えられる。

我々は、BSA 腎炎の半月体形成腎および半月体形成1週前の腎から、腎小体分画を sieving 法にて抽出し、発現する mRNA の差異を representative difference analysis (RDA) 法により解析し、レトロトランスポゾンの一種である Line-1(L1)由来の逆転写酵素 mRNA が半月体形成腎の腎小体において高度に発現していることを見出した。

トランスポゾンは、ゲノム上を移動する塩基配列である。全ゲノム配列の解析により、マウスゲノムの40%がトランスポゾンに由来することが明らかになった。トランスポゾンは、DNA型とRNA型に分類される。DNAトランスポゾンはDNA断片が切り出されてゲノムの他の部位へ挿入されるはたらきをするが、マウスでは活性を有するものが見つかっていない。一方、レトロトランスポゾンは、一旦RNAに転写されたのち逆転写反応によりDNAに変換され、ゲノムへ挿入される。

レトロトランスポゾンには、両端に LTR (long terminal repeat) 配列を有する LTR 型レトロトランスポゾンと LTR の無い non-LTR 型レトロトランスポゾンが存在する。L1 は non-LTR 型に分類される。マウスでは LTR 型レトロトランスポゾンが10%、非 LTR 型レトロトランスポゾンが27%を占める。LTR および非 LTR 型レトロトランスポゾンはマウスにおいて活性を持つものが存在する。

L1 は逆転写酵素および、トランスポダーゼという2つの酵素をコードする。L1 が mRNA に転写されると自身の逆転写酵素が働き、cDNAに変換され、トランスポダーゼ

によってゲノム内へ挿入される。L1 による自己配列のゲノムへのコピーアンドペースト作用の生物学的意義は不明であるが、自然発症変異マウスは、L1 の転移が原因であることや、ヒトにおいてもいくつかの家族性疾患の原因であること、悪性腫瘍の進展に関与するなどの報告がある。

L1 の活性化は、放射線照射、栄養飢餓状態、発がん性物質投与下などの生体の生存に影響するような強いストレス下で活性化することが知られている。BSA 腎炎の半月体形成期にいたるまでのプロセスも、免疫複合体型によって引き起こされる強い全身性の炎症にさらされている。その反映として、このモデルでは、経過中のマウスの死亡率が大変高く、プロトコルを完遂する割合は5~10%程度である。

L1 をはじめとするレトロトランスポゾンの無秩序な増殖とゲノムへの挿入は、生体の恒常性維持にマイナスに作用することが容易に推測される。生体には、ゲノムの攪乱を防止するための様々な仕組みが存在する。マウスにおいては、DNA のメチル化によりトランスポゾンの不活化が生じている。

BSA 腎炎の半月体形成期に L1 の逆転写酵素の転写活性が上昇することが認められたため、in situ hybridization 法で発現部位を確認したところ、半月体が形成された腎小体およびその周囲の間質に浸潤する細胞に比較的広範に認められた。また、腎組織における逆転写酵素活性を測定したところ、半月体形成期では、形成前腎に比べ有意な上昇がみられた。次いで L1 のプロモーター領域のメチル化を検討したところ、半月体形成期において脱メチル化が生じ、内在性の L1 の活性化が明らかとなった。

BSA 腎炎において、L1 由来の逆転写酵素活性が半月体形成と如何にかかわるかを検討するため、逆転写酵素阻害薬であるエファピレンツを半月体形成期に投与したところ、半月体形成が完全に抑えられ、L1 由来の逆転写酵素活性が半月体の形成に関与することが示唆された。以上の研究結果より、逆転写酵素活性阻害薬が、半月体形成性腎炎に対する新薬となる可能性があると考えられた。

生体における L1 の動態を観察できる系を模索したところ、ヒト L1 を発現するトランスジェニックマウス(hL1-EGFP トランスジェニックマウス; hL1-EGFP Tg マウス)が国立国際医療センター研究所の岡村匡史先生によって作成されており、同マウスが独立行政法人医薬基盤・健康・栄養研究所を通じて入手・研究に用いることが可能であることが判明した。本マウスでは、ヒト L1 の内因性プロモーター制御下で、L1 が発現する。L1 の mRNA が DNA に変換され、ゲノムに組み込まれるレトロトランスポジションが生じた部位に Enhanced green fluorescent protein (EGFP) が発現するよう設計されており、レ

トロトランスポジションの生じる部位と半月体形成の関係も調べることが可能である。

新薬の開発は、膨大な経費と時間がかかること、有効性が証明されたあとも、副作用や同効多剤との比較試験の結果などによって、臨床で使用される段階に至ることができなくなるリスクが多分に存在する。薬剤の安全性や投与量が確立した既存薬における新たな薬効を探索する研究（既存薬再開発・ドラッグリポジショニング研究；DR 研究）が広まっている。

逆転写酵素阻害薬のエファビレンツ（ストックリン<sup>®</sup>）は、HIV 感染症治療薬として実臨床で用いられている薬剤である。本薬剤はある種の腫瘍組織においても逆転写酵素活性が上昇することから、抗悪性腫瘍薬としての DR 研究が行われている。我々はこれまでの研究成果から腎炎への応用を期待している。

## 2. 研究の目的

ヒト臨床で用いられる逆転写酵素阻害薬・エファビレンツがマウス BSA 腎炎における半月体形成を抑制する機序を明らかにするために、ヒト L1 を強制発現する hL1-EGFP Tg マウスに対し BSA 腎炎を誘導し、同薬を投与して生体における影響を観察する。

## 3. 研究の方法

### ○hL1-EGFP Tg マウス

独立行政法人医薬基盤・健康・栄養研究所よりヒト L1 を強制発現する hL1-EGFP トランスジェニックマウス（hL1-EGFP Tg マウス）の 2 系統（#4, #67）を供与された。

hL1-EGFP Tg マウスを構築するベクターは、L1 の open reading frame (ORF)-1、ORF-2 およびレポーター遺伝子として EGFP が逆向きに挿入されている。EGFP 遺伝子にはイントロンが挿入されたままとなっており、レトロトランスポジションが生じた際に初めて EGFP が発現し可視化される。

また、レトロトランスポジションによって挿入された hL1 配列と遺伝子導入された hL1 とのでは、レトロトランスポジショやせいで、EGFP 遺伝子のイントロンがスプライシングによって除かれているため、イントロンを間にはさんでいるプライマーにてゲノム PCR をかけると、両者を区別することが可能である。

マウスの対照として、hL1-EGFP Tg マウスの同腹で生れた Tg(-)マウスを、エファビレンツを投与しない群として溶媒(DMSO)を皮下注射した。また、テクニカルコントロールとして、BSA 腎炎の原法である B10-BR マウスを用いた。また、hL1-EGFP Tg マウスは交雑系マウスの BDF1 マウス由来であるため、予備的な実験として、BDF1 マウス（日本 SLC より購入）にて BSA 腎炎を誘導した。

### ○BSA 腎炎

8 週齢のマウスに対し、0.2mg BSA と Freund 完全アジュバンドを 2 週ごとに 4 回皮下注射し、抗 BSA-IgG を血中に生成させた。

次いで 50 mg/Kg の BSA を 28 日間連続投与する）を行った。

### ○エファビレンツ（EFV）の投与

エファビレンツは水溶性ではないため、ジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解し、プロトコル最終週の 7 日間に、逆転写酵素阻害薬・EFV を 0.4mg/Kg 連日皮下注射した。エファビレンツを投与しない群として溶媒（DMSO）を投与群と同量皮下注射した。

### ○サンプル採取および血中・尿中バイオマーカー測定

プロトコル開始前、BSA 皮下免疫終了時、プロトコル完了時に、採血・採尿を行い完了時は、腎臓を摘出し、解析した。血液・尿は腎機能（シスタチン C）・尿所見（尿蛋白・潜血）を観察した。

### ○腎組織の形態観察、レトロトランスポジション部位の同定

腎臓組織は、採取後速やかにホルマリン固定および凍結保存した。ホルマリン固定標本は、Periodic acid Schiff (PAS) 染色を行った。光学顕微鏡において、50 個以上の腎小体をランダムに観察し、半月体形成率 (%)（= 半月体形成腎小体数 / 観察した腎小体総数 × 100）を各マウスにおいて計算した。

### ○蛍光抗体法によるレトロトランスポジションの確認

腎臓の凍結切片をクライオスタットにて 4 μm の切片に薄切し、アセトンで固定後、-80 で保存した。観察時は風乾ののち、リン酸緩衝液（PBS）で洗浄後、直接蛍光顕微鏡で観察および fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗 EGFP 抗体で染色後、蛍光顕微鏡で観察した。

### ○PCR 法によるレトロトランスポジションの確認

凍結した腎臓組織から、ゲノム DNA を抽出し、これを鋳型に Tg マウスに導入された EGFP 遺伝子中のイントロンを挟んだ両端にプライマーを設定して、PCR を行いゲノム上に存在するイントロンありの EGFP 配列とレトロトランスポジションによって挿入された短い EGFP 配列の有無を観察した。

### ○レーザーマイクロダイセクション法による腎小体内レトロトランスポジションの確認

凍結切片の hL1-EGFP Tg マウスの腎臓組織標本をヘマトキシリンエオジン染色し、半月体が形成されている腎小体 50 個および半月体の無い腎小体 50 個をレーザーマイクロダイ

セクション法でそれぞれ打ち抜き採取した。採取した腎小体組織群からそれぞれゲノム DNA を抽出した。抽出されたゲノム DNA を鋳型に、前述と同様のプライマーを用いて PCR を行い、ゲノム中の EGFP 配列を観察した。

#### 4. 研究成果

##### BDF1 マウスに対する BSA 腎炎の誘導

hL1-EGFP Tg マウスのバックグラウンドである BDF1 マウス (n=20) に対し、BSA 腎炎プロトコルを課したところ、BDF1 マウスのプロトコル完遂率は 40% であった。半月体形成率は、すべてのマウスにおいて 5% 未満であった。原法の B10-BR マウスを用いた場合は、プロトコル完遂率は 10~15% であり、半月体形成率はほぼ 100% であることから、BDF1 マウスにおける BSA 腎炎の表現型は、軽症であると考えられた。

##### hL1-EGFP トランスジェニックマウス (hL1-EGFP Tg マウス) における BSA 腎炎の誘導

半月体形成性腎炎モデル (BSA 腎炎) の誘導: #4 系統マウスでは、25 頭のうちプロトコルを完遂したものが 10 頭 (40%) であった。各マウスの腎組織で、任意に選んだ 50 腎小体中の半月体形成がみられるものを計測し、その割合 (半月体形成率) を求めたところ、#4 系統 Tg マウスでは、0~76% (平均 20.6%) とばらつきがみとめられた。

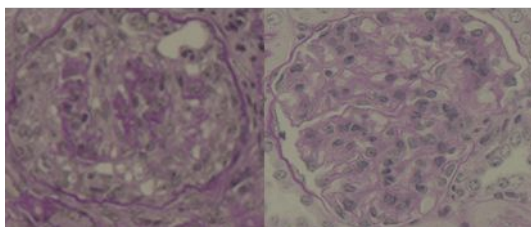
#4 系統・同腹の Tg (-) マウス (n=8) では生残したマウスは 2 頭 (25%) で半月体形成率は、それぞれ 4%、76% であった。#67 系統 Tg マウス (n=5) では、生残数が 2 頭、半月体形成率はそれぞれ、80%、12% であり、同腹 Tg (-) マウス (n=2) は腎炎プロトコルが完遂できなかった。

##### EFV 投与の影響

EFV 投与群として 4 系統で Tg マウス (n=8)、Tg(-) マウス (n=9) で行ったが、プロトコルを完遂したマウスは、Tg マウスで 3 頭、Tg(-) マウスで 1 頭であった。#67 系統では、Tg マウス (n=4)、Tg(-) マウス (n=3) で BSA 腎炎を惹起したが、プロトコルを完遂できなかった。半月体形成率は、Tg マウス・Tg(-) マウス共に 0% であり、半月体形成が完全に抑制されていた。(下図)

EFVなし

EFVあり



レトロトランスポジションの有無の検討  
レトロトランスポジションによって、EGFP が発現することを期待し、凍結切片を蛍光顕微鏡で直接観察したところ、半月体形成ありの Tg マウス、なしの Tg マウス (#4, #67 両者)、半月体形成ありの Tg(-) マウス (#4)、なしの Tg(-) マウス (#4) のすべてにおいて、EGFP 蛍光は確認されなかった。次いで FITC 標識抗 EGFP 抗体で染色後に、再度観察を行ったが、半月体形成ありの Tg マウス、なしの Tg マウス、半月体形成ありの Tg(-) マウス、なしの Tg(-) マウスにおいて、EGFP の発現が観察されなかった。

##### PCR 法によるレトロトランスポジションの検討

BSA 腎炎プロトコルを完遂した #4, #67 の Tg マウス腎から抽出したゲノム DNA からは、イントロンを含んだ長い EGFP 配列のバンドが認められた。#4 系統の Tg (-) マウス腎からは、EGFP 配列のバンドは検出されなかった。レトロトランスポジションが生じたことを示す短い EGFP 配列の存在を示すバンドは被検したすべてのマウス腎で検出することが出来なかった。

##### レーザーマイクロダイセクション法による腎小体内レトロトランスポジションの確認

レーザーマイクロダイセクション法によって、Tg マウスの腎より半月体ありの腎小体 50 個、なしの腎小体 50 個をうちいた。打ち抜きの精度は、前後の画像で確認し、十分であると考えられた。抽出したゲノム DNA の濃度および純度も PCR 解析に耐えられる状態だった。

Tg マウス腎のゲノム DNA を鋳型とした PCR 解析で、半月体を有する腎小体・半月体のない腎小体の両者で、あらかじめ導入されたイントロンを含む長い配列のみが検出され、レトロトランスポジションが生じたことを示す短いバンドは検出されなかった。

##### 血液・尿のバイオマーカーの推移

BSA 腎炎は抗 BSA 抗体産生期と免疫複合体産生期の 2 期に分かれる。

尿所見は、実験前・BSA 抗体産生期の直後においては、試験紙で血・蛋白尿は検出がされなかったが、プロトコル終了直前の尿では、2+~3+ の蛋白尿および血尿がみられた。肉眼的血尿を示す Tg マウス個体も存在した。プロトコル終了時の尿では、尿細管障害によるものと思われる尿糖を示すものもあった。

腎機能の指標として測定された血中のシスタチン C は、プロトコル開始前 0.4~0.5  $\mu\text{g/mL}$ 、抗 BSA 抗体産生期直後 0.3~0.5  $\mu\text{g/mL}$  であった。BSA 腎炎プロトコル終了時

における血中シスタチンC濃度は、半月体形成率との相関がみられた。半月体形成率が50%以上の個体では、すべて1.2 µg/mL以上の値を示し、ヒト半月体形成性腎炎ないしRPGNにおける尿所見、腎機能に類似した推移を示した。また、半月体が病理所見としてマウスモデルにおいても、腎機能低下と相関することが示唆された。

#### まとめ

これまでの研究成果をまとめると、L1の2つの作用である自己配列の転写逆転写酵素によるL1 mRNAのコピーDNAの生成、トランスポダーゼによるゲノムへの再挿入(トランスポジション)のうち、トランスポジションはBSA腎炎の半月体形成期の腎臓で多発しているとはいえなかった。一方、EFVの半月体抑制作用は明らかに存在することが示された。この現象は、L1のmRNAが逆転写されることによって生じた大量のDNAが細胞増殖を誘導している可能性が示唆されるものである。

現在、系統#4はバックグラウンドのL1発現がみられるものの、刺激に良く反応する、#67はバックグラウンドのL1発現がほとんどないという同じhL1-EGFP Tgマウス間の系統差の比較を明確にするために、検体数を増やして再検討することレトロトランスポジションが逆転写酵素阻害薬の非存在下で生じていないことの再確認を行っている。

BSA腎炎に対するEFVの半月体形成抑制作用機序を明らかにし、半月体形成性腎炎がEFVの新規治療対象として臨床応用されるように、EFVのDR研究として本研究を継続する。

#### 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5件)

1. 清水芳男、高齢者における保存期CKDのマネジメント. Geriatric Medicine (老年医学) 55(12);1329-33, 2017

2. Shimizu Y, Kobayashi T, Suzuki H, Suzuki Y, Horikoshi S, Tomino Y. Chronological change of the serum IgA/C3 ratio indicates the efficacy of tonsillectomy for IgA nephropathy. J Clin Diagn Res 4; 132: 2016.

3. Sasaki Y, Shimizu Y, Suzuki Y, Horikoshi S, Tomino Y. TWEAK/Fn14 system and crescent formation in IgA nephropathy. BMC Nephrol. 16:27, 2015.

4. Shimizu Y, Sonoda A, Nogi C, Ogushi Y, Kanda R, Yamaguchi S, Nohara N, Aoki T, Yamada K, Nakata J, Io H, Kurusu A, Hamada

C, Horikoshi S, Tomino Y. B-type (brain) natriuretic peptide (BNP) and pruritus in hemodialysis patients Int J Nephrol Renovasc Dis 7; 329-35: 2014.

5. Satake K, Shimizu Y, Sasaki Y, Yanagawa H, Suzuki H, Suzuki Y, Horikoshi S, Honda S, Shibuya K, Shibuya A, Tomino Y. Serum under-O-glycosylated IgA1 level is not correlated with glomerular IgA deposition based upon heterogeneity in the composition of immune complexes in IgA nephropathy. BMC Nephropathy; 15: 89, 2014

[学会発表](計5件)

1. 清水 芳男、若林 啓一、林 陽子、戸塚 絢子、青山 留未、柳川 宏之. 薬疹と内シャント閉塞に関する一考察. 第62回日本透析医学会学術集会・総会 2017年6月18日. パシフィコ横浜

2. 遠藤 未来美、清水 芳男、佐藤 浩一. 味覚に着目したマウスからの簡便で確実な採尿方法の検討. 第60回日本腎臓学会学術総会. 2017年5月28日. 仙台国際会議場

3. 清水 芳男、若林 啓一、林 陽子、原一彰、青山 留未、戸塚 絢子、桑澤 雅子、鈴木 祐介. 疱疹状皮膚炎に合併し、III型膜性増殖性糸球体腎炎(MPGN)様病理像を呈した一例. 第47回日本腎臓学会東部学術大会. 2017年10月29日. パシフィコ横浜

4. 清水 芳男、山田 芳、野原 奈緒、松本 真弓、狩野 俊樹、高森 建二、富野 康日己. 血清BNP調節による透析患者の痒みの軽減. 日本透析医学会学術集会・総会. 2016年6月11日. 大阪国際会議場

5. 清水 芳男、園田 彩乃、禾 千絵子、大串 陽子、神田 怜生、山口 早織、野原 奈緒、青木 竜也、山田 芳、中田 純一郎、井尾 浩章、来栖 厚、濱田 千江子、堀越 哲、富野 康日己. 血液透析患者の痒みにおける血清B型(脳性)ナトリウム利尿ペプチド(BNP)の影響. 第59回日本透析医学会学術総会. 2017年6月. 神戸国際会議場

[図書](計5件)

1. 清水 芳男 4かゆみ 内科外来診断navi 富野 康日己編 p9-11, 中外医学社 東京 2017

2. 清水 芳男 成人において血尿を来たす鑑別疾患. 尿検査のみかた・考え方 富野 康日己編 p195-200, 中外医

学社 東京 2017

3. 清水 芳男 かゆみの治療法は？新しい薬剤は？ これだけは知っておきたい透析療法 富野 康日己編 p118-120, 中外医学社 東京 2016
4. 清水 芳男 IgG4 関連腎臓病 New エッセンシャル腎臓内科学 富野 康日己編、p 232-239, 医歯薬出版, 東京, 2015.
5. 清水 芳男 immunotactoid glomerulopathy New エッセンシャル腎臓内科学 富野 康日己編、p 239- 242, 医歯薬出版, 東京, 2015

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 芳男 (SHIMIZU, Yoshio)  
順天堂大学・医学部・先任准教授  
研究者番号：5 0 3 5 9 5 7 7