

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461622

研究課題名(和文)先天性腎尿路形態異常の発症における抗酸化防御機構の関与

研究課題名(英文)Effect of genetic inactivation of Keap1 on the kidney morphogenesis in mice

研究代表者

新村 文男(NIIMURA, Fumio)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：30282750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Keap1-Nrf2系は抗酸化防御機構の中心的役割を担っている。Keap1の不活化はNrf2の恒常的活性化とその下流にある抗酸化作用を有する遺伝子群の高発現を来す。以前の検討でKeap1発現が減弱したマウスにおいて水腎症がみられたことから、Keap1ノックアウト(KO)マウスでは腎形態に異常が生ずると予測し検討した。KOマウスは日齢9では低体重だったが、水腎症ではなかった。そこで近位直尿細管特異的Keap1不活化マウスを新たに作製し、32週齢において水腎症や腎嚢胞の出現を期待して観察したが、それらの所見を認めなかった。以上より、Keap1不活化の腎形態形成への影響は否定的と考えた。

研究成果の概要(英文)：In our previous observation, hydronephrosis was not infrequently seen in Keap1 knockdown mice in which Keap1 expression was partially suppressed. In this study, we expected that renal morphogenesis might be severely impaired in Keap1 knockout mice in which Keap1 is completely inactivated. However, the kidneys in Keap1 knockout mice at the age of day 10 did not show any morphological abnormality except for rather reduced size, which was compatible to the reduced body weight. As previously reported, Keap1 knockout mice could not survive beyond the weaning stage. So, we generated a conditionally targeted mouse in which Keap1 is inactivated only in the renal proximal straight tubule to enable observation in much later phase of the kidney morphology. At 32 weeks of age, the conditionally knockout mice did not show any renal morphological abnormalities including hydronephrosis and cortical/medullary cysts. In conclusion, Keap1 plays only a limited role in the process of renal morphogenesis.

研究分野：小児科学

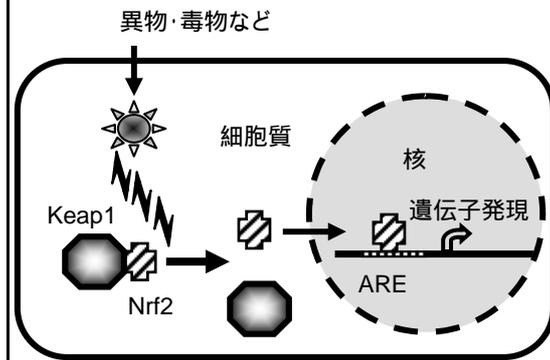
キーワード：先天性腎尿路異常 水腎症 Keap1 Nrf2 抗酸化防御機構 Cre-loxシステム コンディショナルターゲットティング

1. 研究開始当初の背景

(1) 先天性腎尿路形態異常 (congenital anomalies of the kidney and urinary tract: CAKUT) は小児期に腎不全に至る病態として極めて重要であることから、その発症機序に関して多くの研究がおこなわれている。CAKUT の発症に関連する遺伝子の探索には、腎発生に関与する遺伝子を中心に解析が進められてきたが、近年ではゲノムワイド関連解析による感受性遺伝子の検討も行われている。しかし発症機序の全容が解明されたとは言えず、その発症機序は単一の遺伝子異常のみで説明できるものではなく、複数の遺伝子の関与、環境によるエピジェネティックな要因の関与、あるいは環境そのものの関与などが複雑に絡み合っているものと理解されるに至っている。

(2) 好気性生物であるヒトは常に酸素による酸化傷害にさらされているが、一方で進化の過程で抗酸化防御システムを獲得することにより、酸化ストレスによる臓器障害を免れている。種々の病態において酸化傷害が抗酸化防御システムを凌駕した状態 (すなわち酸化ストレス) が臓器障害に深く関与していることが近年の研究により明らかにされているが、個体の発生過程における酸化ストレスの関与については、初期発生における解析などの研究が行われているものの、臓器発生、とりわけ腎臓の発生における関与については十分に解析されていない。我々は、抗酸化防御機構に異常を持つ遺伝子改変マウスを用いて腎障害の研究を遂行してきたところであるが、その過程において Keap1 ノックダウンマウス (酸化ストレスが軽減されているマウス) が水腎症を少なからず発症することに気付いた。しかし、Nrf2 ノックアウトマウス (酸化ストレスが増強しているマウス) においてはこのような現象は認められなかった。このことから、腎臓の発生過程において酸化ストレスや抗酸化防御機構が何らかの関与をしており、酸化ストレスがむしろ合目的性を有している可能性が示唆されたが、従来においては十分な検討がなされていない。

(3) 近年、生体における抗酸化防御システムとして、Keap1-Nrf2 系が中心的な役割を果たしているとして注目されている。Nrf2 はヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) に代表される第 2 相異物代謝酵素群の発現を促進する転写因子であり、各遺伝子上流にある抗酸化剤応答配列への結合を介して、転写レベルの発現調節を行っている。Nrf2 は細胞質において Keap1 と結合し細胞質に留まっているため、核内へ移行できず転写活性が抑制されるとともに分解が促進される。親電子物質の産生や進入により酸化ストレスが加わると Keap1 のシステイン残基が修飾される結果、Nrf2 は Keap1 から離れて核内へ移行可能となり、転写活性を発揮する (図 1)。



ARE: 抗酸化剤応答配列

図 1

2. 研究の目的

本研究は環境要因を含む様々な酸化ストレスに対して抗酸化防御的に働く Keap1-Nrf2 系が腎臓の発生において果たしている役割につき、遺伝子改変マウスを用いて解析する。とくに Keap1 欠損マウスにおける腎発生異常を解析することにより、酸化ストレスと抗酸化防御機構の適切なバランスが正常な形態形成において重要であることを示すことを目的としている。

3. 研究の方法

(1) Keap1 欠損マウスの作製

Keap1 アレルにおいて相同組み換えを利用して不活化されたアレルを有するマウスの凍結胚を融解し、偽妊娠マウスの子宮に移植することにより Keap1(+/-)マウスを得ることを試みたところ、原因は不明であったが、生まれてきたマウスはすべて野生型であり、目的とする不活化 Keap1 アレルを有するマウスを得ることができなかった。複数回のトライアルにても同様の結果であったため、不活化 Keap1 アレル、および loxP 配列の挿入アレルを同時に有する凍結精子を入手し、それを用いて生きたマウスを得、その後、野生型マウスとの交配により、不活化 Keap1 アレルのみをヘテロ接合体で有する Keap1(+/-)マウスを選別した。その後、Keap1(+/-)マウスどうしの交配を行い、生まれてくるマウスの耳朶や尾の組織から抽出した DNA を用いて遺伝子型、すなわち、Keap1(+/+), Keap1(+/-), Keap1(-/-)を決定した。

(2) Keap1 欠損マウスの観察

Keap1(+/-)マウスどうしの交配により得られた仔マウスについて、離乳後、さらには生後 10 日以内の仔マウスについても解析を行った。水腎症の有無について、実体顕微鏡下に肉眼解剖の観察を行った。また、腎の組織学的検索も行った。染色は PAS 染色にて評価した。

(3) 尿細管特異的 Keap1 不活化マウスの作製

KAP-Cre マウスは我々が以前作成したマウスで、KAP (kidney androgen regulated protein) 遺伝子のプロモーターの下流に Cre 酵素の遺伝子を組み込んだアレルを有する

トランスジェニックマウスである。雄の KAP-Cre マウスにおいては、Cre 酵素は腎臓の近位尿管直部にのみ発現される。一方、Keap1 遺伝子に loxP 配列を 2 か所挿入した変異アレルをヘテロ接合体で有するマウス Keap1(flox/WT) も我々の研究室にて継代飼育中であった。Keap1(flox/WT) マウスと Keap1(flox/flox) マウスとを PCR 法で区別することは当初は不可能であったものの、新たにプライマー設定を行うことで区別が可能となった。KAP-Cre マウスと Keap1(flox/flox) マウスを交配し、[Keap1(flox/WT), KAP-Cre(+)] マウスと、[Keap1(flox/WT), KAP-Cre(-)] マウスを得た。この 2 種類のマウスどうしを交配することにより、[Keap1(flox/flox), KAP-Cre(+)] マウスを得た。このマウスにおいては、近位直尿管細胞においてのみ Cre 酵素が発現されるため、同細胞においてのみ Keap1 遺伝子が不活化されている。全身の細胞において Keap1 遺伝子が欠失しているマウスは生後数週間で死亡するが、近位直尿管細胞のみで Keap1 遺伝子が不活化されているマウスは致死性とはならない。したがってこのマウスにおいては、成熟した腎臓における形態異常の有無を検査することが可能である。対照群としては、同腹の [Keap1(flox/flox), KAP-Cre(-)] マウス、および、[Keap1(WT/WT), KAP-Cre(-)] マウスを用いて検討した。

(4) 尿管特異的 Keap1 不活化マウスの観察
上記のマウスを SPF (specific pathogen free) の環境で長期間 (32 週間) 飼育し、腎臓の形態を観察した。肉眼的観察に加えて、組織学的観察を行った。

4. 研究成果

(1) Keap1 欠損マウスの観察

Keap1(+/-) マウスどうしの交配により生まれたマウスを離乳以降に検討すると、Keap1(-/-) マウスは存在せず、離乳以降まで生存しえないことが確認された。

そこで、同様の交配により生まれた生後 10 日までの仔マウスを対象に解析を行った。

体重

マウスの観察を進めるうちに、体格の小さいマウスが Keap1(-/-) マウスであることが明らかとなった。得られたマウスの体重を測定してみると、日齢 4 までは Keap1(-/-) マウスの体重は、Keap1(+/+), Keap1(+/-) マウスと同じ程度であったが、それ以降は次第に低体重となる傾向がみられた。

観察数が多かった日齢 9 における各遺伝子型の体重を図 2 に示す。

Keap1(-/-) マウスの体重は 3.15 ± 1.00 g で、同腹の Keap1(+/) マウスの体重 (5.87 ± 1.55 g) の約半分程度であり、有意に低体重であった。

肉眼的形態

Keap1(-/-) の仔マウスは、体格が小柄であったが、外表の形態異常は観察されなかった。

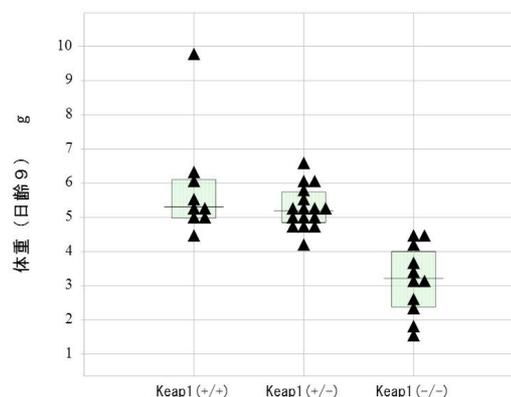


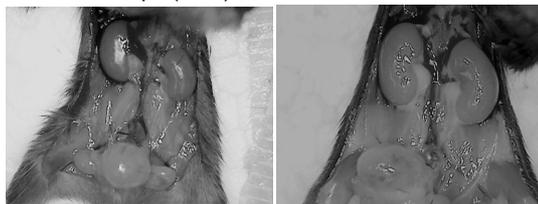
図 2

また、従来の報告では食道平滑筋の肥厚によるミルクの摂取障害が想定されていたが、今回得られた仔マウスにおいては、胃内のミルク貯留は比較的良好に観察され、大腸内の糞便貯留も観察されており、ミルクの摂取障害以外の要因が成長障害の背景に存在している可能性が示唆される結果であった。

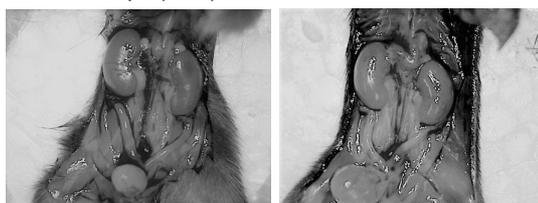
腎臓を含む内臓にも特段の肉眼的形態異常を認めなかった。

以下に Keap1(-/-) マウスの腎尿路の実体顕微鏡観察結果の例を示す。

< Keap1(-/-), 日齢 10 >



< Keap1(-/-), 日齢 10 >



いずれのマウスにおいても、明らかな水腎症や尿管症は観察されなかった。

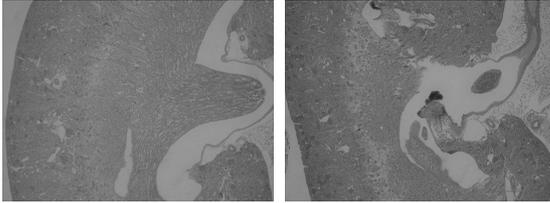
組織学的観察

Keap1(-/-) マウスの腎臓は実体顕微鏡による観察にて明らかな水腎症を呈していなかったが、組織学的に何らかの形成異常を伴っている可能性を考え、組織学的検索を行った。

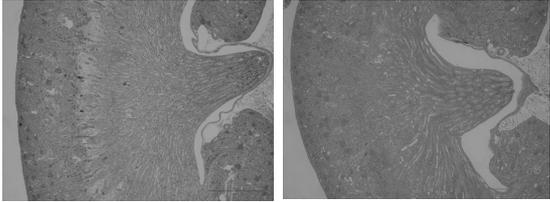
PAS 染色による観察にて、いずれの Keap1(-/-) マウスにおいても、腎乳頭の低形成や腎盂の拡大など、水腎症と判断される形態異常は認めなかった。また、PAS 陽性の刷子縁が強く染まる髄質外層外帯や、腎皮質の形成も正常に認められており、腎実質の基本構造は正常に形成されていると判断された。

以下に Keap1(-/-) と野生型マウスの腎臓の組織所見 (弱拡大) の例を示す。

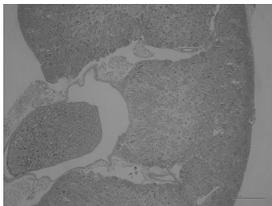
< Keap1(-/-), 日齢 9 >



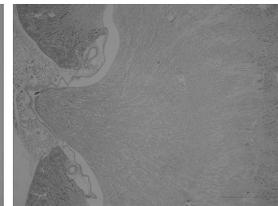
< Keap1(-/-), 日齢 9 >



< 野生型, 日齢 9 >



< 野生型, 日齢 9 >



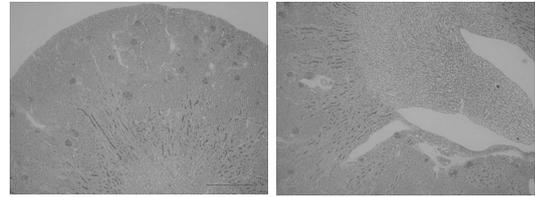
Keap1(-/-)マウスの腎臓は、野生型マウスの腎臓に比して小さいが、体格相応と考えられた。また、上述のごとく、基本構造は保たれており、髄質、皮質ともに嚢胞の多発などは認めなかった。糸球体の形態についても、成熟の遅れなどを疑わせる上皮細胞の形態（立方上皮様の形）も認めなかった。正常マウスでもボウマン嚢内に近位尿管細胞を認めることが多いが、Keap1(-/-)マウスではそれがより顕著であるという印象を持ったが、その意義については不明であった。

以上より、Keap1(-/-)マウスでは、体格が小さく、腎臓も相応に小さいサイズとなっていたものの、基本構造は正常であり、先天性腎尿路異常を呈することはないと結論付けた。

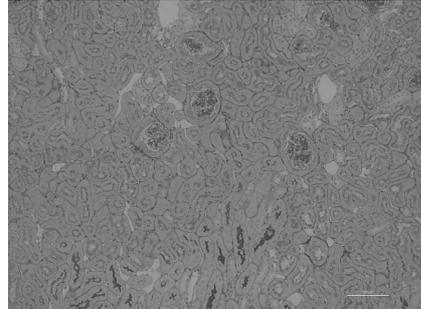
(2) 尿管特異的 Keap1 不活化マウスの観察

Keap1(-/-)マウスの腎臓が正常（体格相応の小さいサイズではあるが）であったことから、尿管特異的に Keap1 を不活化しても、顕著な腎臓形態の異常が出現する可能性はむしろ低いと考えられた。したがって、尿管特異的 Keap1 不活化マウスにおいて何らかの形態異常の出現を期待するためには、十分な週齢が経過した後に腎臓形態の観察を行うことが必要と考えた。本研究期間の最終年度になり尿管特異的 Keap1 不活化マウスが誕生し、その後 32 週が経過した時点で腎臓形態を観察した。雄マウスにおいて Keap1 遺伝子の不活化がより顕著になるため、雄マウスの腎臓組織の例を以下に示す。

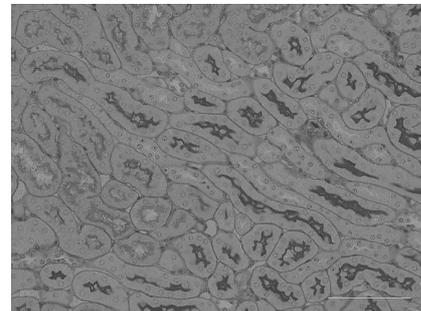
< Keap1(flox/flox), KAP-Cre(+)32 週齢 >



弱拡大にて、水腎症や嚢胞形成を認めない。



中拡大にて糸球体の形態などに異常を認めない。



PAS 染色で染まる刷子縁が顕著な近位尿管において、Keap1 遺伝子が不活化されているものの、上図のごとく、強拡大にて近位尿管には特段の形態異常を認めなかった。

以上より、少なくとも SPF 飼育環境では Keap1 の不活化は腎臓形態形成に影響を与えないと考えた。低酸素、低栄養、薬物暴露などの過酷な環境下では何らかの異常を来す可能性は否定できないが、腎臓形態形成における役割は限定的と考えた。

(3) 展望

近位尿管は薬物や低酸素の影響を最も受けやすい部位で、尿管特異的 Keap1 不活化マウスはそれらにより惹起される腎臓障害が軽減される可能性があり、今後モデル動物としての利用が可能であると考えている。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

新村 文男 (NIIMURA, Fumio)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：30282750

(2)連携研究者

松阪 泰二 (MATSUSAKA, Taiji)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：50317749