

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830063

研究課題名(和文)腎疾患高感受性C57BL/6マウス系統の開発

研究課題名(英文)Establishment of C57BL/6 strains susceptible to kidney diseases

研究代表者

内尾 こずえ(Uchio, Kozue)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・疾患モデル小動物研究室・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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：日本において慢性腎臓病患者数は増加の一途を辿っている。腎疾患に根本的な治療法がないことが一因となっており、創薬・治療法開発が不可欠である。しかしながら病因が多様であることに加え、ヒト腎疾患に近似した表現型を呈する有用なモデル動物が少ないことも解析遅延の要因となっている。これはモデル開発に多用されるC57BL/6マウス系統が腎疾患抵抗性の傾向があることに起因する。そこで本研究は、腎疾患感受性系統を利用したQTL及びDNAアレイ解析により、腎疾患感受性に関連するゲノム領域を同定し、腎疾患高感受性のC57BL/6マウス系統を開発した。この系統は創薬研究・治療法開発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 kidney diseases is expected to increase steadily each year in Japan. It has not been reported the effective therapy for renal insufficiency. Since the mechanisms responsible for kidney diseases have not been completely made clear yet, it is difficult to discover effective drugs. One of the reasons for the difficulties is that suitable animal models for various kidney diseases don't exist. Usually, C57BL/6 mice are used in order to develop models by genetic engineering, but C57BL/6 is resistant to kidney diseases. Therefore, it is difficult to establish mouse models for kidney diseases on C57BL/6 background. In this study, I identified susceptible loci of kidney diseases and established C57BL/6 strains carrying the loci. These strains might contribute to elucidate the mechanisms responsible for kidney diseases and to develop effective therapy.

研究分野：実験動物学

キーワード：疾患モデル 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少なく、その開発が望まれている。既存の遺伝子改変マウスは C57BL/6 マウスを遺伝的背景とすることが多いが、C57BL/6 系統は腎臓病抵抗性の傾向があり、腎不全に至る表現型を呈することは稀である。バイオマーカー探索、病態進行メカニズムの解明を進展させるためには、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。遺伝子改変によるモデル動物開発に、腎疾患抵抗性の C57BL/6 系統が利用されることが多く、腎疾患モデル開発が困難であることが原因の一つと言える。そこで本研究では腎臓病感受性ゲノム領域を同定し、C57BL/6 系統に導入することにより、腎疾患高感受性 C57BL/6 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(国)医薬基盤・健康・栄養研究所において、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。この 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。*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)、DBA/2(D2)、129、BALB および FVB を遺伝的背景とするコンジェニック系統(以下 B6GN、D2GN、129GN、CByGN、FVBGN 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、FVBGN は重篤であること、B6GN・129GN・CByGN は 1 年歳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。このことから ICGN マウスにおいて、*tensin2* 以外の腎疾患感受性因子の存在が強く示唆された。そこで、ICGN マウス、腎疾患発症コンジェニック系統、腎疾患非発症コンジェニック系統を比較解析することにより、腎疾患関連ゲノム領域の同定し、そのゲノム領域を持つ C57BL/6 系統の開発を目指すことにした。そのため、以下の 2 つの研究を計画した。

I. ICGN、B6GN(腎疾患非発症)及び D2GN(発症)の比較を行うことで(QTL 解析及び DNA マイクロアレイ解析) ICGN、D2 が有する腎疾患感受性に関連するゲノム領域を同定する。

II. 上記ゲノム領域を持つ B6 背景のコンジェニック系統、即ち腎疾患高感受性 C57BL/6 を作製する。

上記計画を行うため、以下の方法を用いた。

(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(国)医薬基盤・健康・栄養研究所にて作出した。当該実験は(国)医薬基盤・健康・栄養研究所・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。3µm 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) Real Time PCR 解析: 腎より RNA を抽出し(QIAGEN RNeasy kit)、high capacity cDNA reverse transcription kit (Life Technologies)を用いて、cDNA 合成を行った。TaqMan Probe を用い、定量的 PCR を行い(ABI PRISM 7900HT; Life

Technologies) C1s1, C1s2, cxcl13, cxcr5, kim-1 の発現量を解析した。

- (7) 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を持つ B6GN あるいは B6 系統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. 腎疾患感受性領域の同定

###### (1) QTL 解析結果

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。

①(ICGNxD2GN) x (ICGNxD2GN)

②(ICGNxB6GN) x (ICGNxB6GN)

③(D2GNxB6GN) x (D2GNxB6GN)

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 1,2,7,13 番染色体および D2 マウスの 1,11 番染色体に腎臓病感受性に関与するゲノム領域を同定した。

###### (2) GeneChip 解析結果

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。まず ICGN マウスにおいて、自己免疫疾患・炎症に関与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。特に補体成分の一つ C1s が顕著に発現低下していることが分かった。さらに D2, D2GN において、B6, B6GN に比較し、炎症・免疫関連の遺伝子群、特にインターフェロン感受性遺伝子群(*Pyhin1*, *Pydc4*, *Ifi205*, *ifi204*, *Mnda1*)の発現が顕著に低いことが確認された。これらの遺伝子群は 1 番染色体上に在り、QTL 解析で候補に挙げられた領域であった。さらに血圧・血液凝固に関与するセリンプロテアーゼのカリクレイン群においても D2, D2GN 系統において、発現量が低いことが分かった。これらの遺伝子群は 7 番染色体上に在り、やはり QTL 解析で候補に挙げられた領域であった。

ICGN マウスで顕著に発現低下が認められた C1s について、シーケンス解析を行ったところ、C1s1 が欠損していることが分かった(ヒトにおいて、C1s は単一遺伝子であるが、マウスにおいては duplicate が起こり、ホモロジーが高い C1s1, C1s2 の 2 つの遺伝子が存在する)。ヒト全身性エリテマトーデス(SLE)患者において、C1s 欠損・変異が報告されており、SLE の原因遺伝子の一つと考えられている。ICGN マウスは SLE 様の表現型を呈するため、C1s1 が病態に影響を及ぼしている可能性がある。C1s はマウス 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変異を同定できた。

##### 11. 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。即ち ICGN マウスの 1,2,7,13 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。それぞれ系統名を G.Chr1/B6GN, G.Chr2/B6GN, G.Chr7/B6GN, G.Chr13/B6GN, D.Chr1/B6GN および D.Chr11/B6GN とする。さらに C1s1 欠損 B6 系統を作製した。その表現型を精査したところ、以下のようなモデルとして確立できた。

###### (1) 高脂血症

D.Chr1/B6GN, D.Chr11/B6GN は軽度の高コレステロール血症の傾向であった。しかし 20 週齢時においてアルブミン尿は検出されなかった。

###### (2) 自己免疫疾患

G.Chr1/B6GN, G.Chr13/B6GN および D.Chr11/B6GN は抗核抗体が陽性であり、軽度の自己免疫疾患様の表現型を呈することが分かった。腎において、ケモカイン *cxcl13* の発現上昇が確認された。しかし脾大や腎への免疫複合体の蓄積等は、かなり軽度であった。20 週齢時においてアルブミン尿は検出されなかった。

さらに C1s1 欠損 B6 マウスについて、20 週齢時に表現型解析を実施した。まず血清中の抗核抗体を測定したところ、陰性であった。脾大などの症状もなく、C1s1 欠損はマウス SLE の直接の原因ではないことが示唆された。さらに腎炎の症候もなく、タンパク尿も検出されなかった。マウスにおいて C1s 遺伝子は、duplicate により、ホモロジーが高い C1s1, C1s2 の 2 つの遺伝子が存在する。血清中に存在する C1s のほとんどは肝臓、腎臓等で産生される C1s1 由来であり、C1s2 は雄性の生殖器で発現していることが報告されている。そこで C1s1 欠損マウスの腎においてホモログである C1s2 の発現解析を行ったところ、正常腎においては殆ど発現していなかったが、C1s1 欠損マウス腎において、発現が増加していることが分かった。C1s1 と C1s2 は 95%以上のホモロジーを持つため、代替していることが考えられる。また、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ことが示唆された。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期待される。

###### (3) 腎症

G.Chr2/B6GN および G.Chr7/B6GN につい

て、20週齢時においてアルブミン尿は検出できなかった。腎における腎障害マーカーの kim1 の発現を調べたところ、正常腎と比較し、発現上昇が認められたことから腎病変が起こりやすい状態であることが示唆された。

以上のように、本研究において、複数の腎疾患高感受性 C57BL/6 が確立できた。これら複数の B6 背景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 1 件)

1. Uchio-Yamada K., Monobe Y., Akagi K., Yamamoto Y., Ogura A., Manabe N. Tensin2-deficient mice on FVB/N background develop severe glomerular disease. J Vet Med Sci. 2016 (in press)

[学会発表](計 6 件)

1. 内尾こずえ「疾患モデルマウスの個体差を解消するには? ~ネフローゼマウスから学んだこと~」第22回日本獣医解剖学会サテライトフォーラム、平成27年9月7日(口頭発表・招待講演)
2. 内尾こずえ、物部容子、赤木謙一、山本美江、眞鍋昇「Tensin2 変異マウス系球体基底膜における Laminin の異常蓄積」第158回日本獣医学会、平成27年9月7日-9日(口頭発表)
3. 河原崎正貴、前川京子、齊藤公亮、内尾こずえ、根本直、福岡秀興、齋藤嘉郎「腎疾患モデル動物における血漿の脂質メタボローム解析」第136回日本薬学会 平成28年3月26日-29日(口頭発表) 河原崎正貴、鎌田彰、千葉洋祐、矢口文、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肉食由来“タンパク質-脂質”が代謝に及ぼす影響」第15回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会 平成28年2月2日-3日(ポスター)
4. 田中麻優里、小檜山康司、本田哲也、山田-内尾こずえ、椋島健治、石井健「乾癬様皮膚炎の形成において CARD14 を発現する  $\gamma\delta$ T 細胞は IL-17 と IL-22 産生に重要である」第8回次世代アジュバント研究会 平成28年1月20日(ポスター)

5. 鈴木治、小浦美奈子、内尾(山田)こずえ、松田潤一郎「マウス5系統における bpV(pic)併用による誘起排卵向上効果」日本実験動物科学技術さっぽろ2014、平成26年5月15日-17日、札幌
6. Tanaka M, Kobiyama K, Honda T, Uchio-Yamada K., Kabashima K, Ishii KJ. CARD14 in IL-17 and IL-22 producing  $\gamma\delta$  T cells is essential for psoriasis-like dermatitis formation. Keystone Symposia 2016年2月28日-3月2日(ポスター)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 1 件)

名称:「アルツハイマー病の診断方法および診断薬」

発明者: 武田朱公、里直行、内尾こずえ、森下竜一

権利者: 武田朱公、里直行、内尾こずえ、森下竜一

番号: 特許第5704533号

取得年月日: 2015年3月6日

国内外の別: 国内

[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.nibiohn.go.jp/research/j\\_icgn\\_research.html](http://animal.nibiohn.go.jp/research/j_icgn_research.html)

・マウス標準系統プロファイリング

[http://animal.nibiohn.go.jp/research/j\\_profiling.html](http://animal.nibiohn.go.jp/research/j_profiling.html)

・ICGN マウス詳細データ

[http://animal.nibiohn.go.jp/j\\_icgnmouse.html](http://animal.nibiohn.go.jp/j_icgnmouse.html)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

内尾こずえ (UCHIO, Kozue)

国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所・疾患モデル小動物研究室・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