

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461611

研究課題名(和文) 輸送蛋白に関わる蛋白尿発症機序の解明

研究課題名(英文) clarification of the mechanism of proteinuria related with transport protein

研究代表者

綾 邦彦 (AYA, KUNIHICO)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：20379762

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)：ポドサイトのみ本輸送蛋白を特異的にノックアウトするマウスに、LPS投与により尿蛋白を惹起させる系(蛋白尿惹起モデル)を導入して、本輸送蛋白の生体内における機能を検討したが、尿中アルブミン量において一定の結果を得られなかった。
誘導剤(タモキシフェン)投与により全身の本輸送蛋白を時期特異的に欠損誘導可能なマウスを作成して、タモキシフェン投与したところ、明らかな体重増加不良を認めた。また、腸管粘膜上皮には異形腺管を認めた。

研究成果の概要(英文)：Though we induced proteinuria the podocyte-specific conditional knockout mice of this transport protein with LPS, we could not find strong tendency of the degree of albuminuria in knockout mice compared with control. We created the tamoxifen-inducible knockout mice of this transport protein. After tamoxifen administration, poor weight gain and atypical glands in intestine was found in these knockout mice.

研究分野：医歯薬学

キーワード：細胞・組織 輸送蛋白 蛋白尿 尿細管 異形腺管 ポドシン 消化管 体重増加不良

1. 研究開始当初の背景

先天性(遺伝性)ネフローゼ症候群の原因遺伝子であるポドシンに結合する蛋白を免疫沈降法、質量分析法を利用して同定し、その中に本輸送蛋白が存在した。本輸送蛋白が実際にポドシンと結合するかを両方の蛋白からの免疫沈降法により証明した。免疫組織染色でこの蛋白がポドサイトに存在することを示した。siRNAで発現を抑制したところ、遺伝子導入により発現させたポドシンの細胞膜での発現が低下し細胞形態の変化も伴った。

これらから、本輸送蛋白は、ポドシンの細胞膜への輸送に関係すると考えられ、*in vitro*の実験によって明らかになったこの機能を*in vivo*で確かめるためにマウスを作成した。F1ヘテロマウスからNeoカセットFLPカセットを除去し、本輸送蛋白のfloxヘテロマウスを作成した。このfloxヘテロマウスからfloxホモマウスを作成、このマウスとポドシンのプロモーターを有しポドサイト特異的にCreを発現する

B6.Cg-Tg(NPHS2-cre)295Lbh/Jを購入してかけ合わせ、NPHS2-creをもつ本輸送蛋白のfloxマウスを作成した。

6週齢のポドサイト特異的な本輸送蛋白のヘテロ欠損マウスを代謝ゲージにて蓄尿し、尿中総蛋白 アルブミン クレアチンを測定し、尿潜血もチェックしたが、有意な所見はえられなかった。このマウスを解剖し、腎組織について検討を行ったが、有意な病理変化をおこしていなかった。

6-7週齢と14-15週齢のポドサイト特異的なホモ欠損マウスに関しても同様に、代謝ゲージにて蓄尿し、尿中総蛋白 アルブミン クレアチンを測定し、尿潜血もチェックしたが、有意な所見をえられなかった。

2. 研究の目的

そこで本研究では

(1)上記のポドサイトのみ本輸送蛋白を特異的にノックアウトするマウスに、LPS投与により尿蛋白を惹起させる系(蛋白尿惹起モデル)を導入して、本輸送蛋白の生体内における機能を検討すること、および、

(2)誘導剤(タモキシフェン)投与により全身の本輸送蛋白を時期特異的に欠損誘導可能なマウスを作成して、本輸送蛋白の生体内における機能を明らかにすること、が目的である。

3. 研究の方法

(1) 蛋白尿惹起モデルを使用した

ポドサイト特異的な本輸送蛋白のホモ欠損マウスの検討

本輸送蛋白のfloxホモマウスでNPHS2-creをもつマウスともたないマウスを掛けあわせることにより、同時に個体間の差が少ないNPHS2-creをもつfloxホモマウス(ポドサイト特異的な本輸送蛋白のホモ欠損マウス)とNPHS2-creをもたないfloxホモマウス(本輸送蛋白を欠損しないマウス)を作成し、同時に尿蛋白を惹起するLPSの腹腔内投与を行った。それらを代謝ゲージで蓄尿し、尿中アルブミン クレアチンを測定した。

(2) タモキシフェン投与により全身の本輸送蛋白を欠損するマウスの作成とその検討

タモキシフェン投与により全身の組織でCreを発現できる

B6.Cg-Tg(CAG-cre/Esr1*)5Amc/Jと本輸送蛋白のfloxホモマウスを掛け合わせて、タモキシフェン投与後より全身の本輸送蛋白の発現を抑制できるマウスを作成した。本輸送蛋白のfloxホモマウスでCAG-cre/Esr1*をもつマウスとCAG-cre/Esr1*をもたないマウスを

かけあわせることにより、同時に個体間の差が少ない CAG-cre/Esr1*をもつ flox ホモマウス (タモキシフェン投与により全身の本輸送蛋白を欠損するマウス) と CAG-cre/Esr1*をもたないマウス (タモキシフェン投与によっても全身の本輸送蛋白を欠損しないマウス) を作成し、同時にタモキシフェンの腹腔内投与を行った。一部のマウスにシスプラチンの追加投与も行った。

これらのマウスについて経時的な体重測定を行った。マウスから採血ならびに各臓器を取り出し、血液検査ならびに病理組織の検討を行った。

一部の組織に対しては、本輸送蛋白に対する一次抗体を使用して、免疫組織染色も行った。

4 . 研究成果

(1) LPS投与による蛋白尿惹起モデルを使用したNPHS2-creをもつfloxホモマウスとNPHS2-creをもたないマウスの比較検討でも、LPS投与をせず自然経過を観察した以前の実験結果と同様に、尿中アルブミン量において一定の結果をえられなかった。

(2)タモキシフェン投与によるCAG-cre/Esr1*をもつfloxホモマウスとCAG-cre/Esr1*をもたないfloxホモマウスの比較検討では、CAG-cre/Esr1*をもつfloxホモマウスで明らかな体重増加不良を認めた。

マウスを解剖したところ、心臓 肺などには病理組織学的に明らかな異常は認めなかった。

腸管粘膜上皮には異形腺管を認めた。

本輸送蛋白の消化管における免疫染色の結果では、CAG-cre/Esr1*をもつfloxホモマウスではタモキシフェン1回の投与で消化管での発現が抑制されていた。

タモキシフェン投与後、間隔を空けてシスプラチンを投与したところ、近位尿細管障害を認めた。

プレリミナリーだが、タモキシフェンを投与したマウスでコントロールと比較して血清クレアチニン値が高い傾向にあった。

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2件)

Kamei K, Ishikura K, Sako M, Aya K et al. Long-term outcome of childhood-onset complicated nephrotic syndrome after a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial of rituximab. *Pediatr Nephrol.* 2017 Nov;32(11):2071-2078. 査読あり

Iijima K, Sako M, Nozu K, Mori R, Tuchida N, Kamei K, Miura K, Aya K, et al. Rituximab for Childhood-onset Refractory Nephrotic Syndrome (RCRNS) Study Group. Rituximab for childhood-onset, complicated, frequently relapsing nephrotic syndrome or steroid-dependent nephrotic syndrome: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2014 Oct 4;384(9950):1273-1281. 査読あり

〔図書〕(計3件)

綾邦彦 中山書店 重症患者における急性肝不全・急性腎傷害・代謝異常 小児におけるAKIを分担執筆 2018 196-204

綾邦彦 診断と治療社 小児腎臓病学 改訂第2版 先天性ネフローゼ症候群を分担執筆 2017 210-213

綾邦彦 東京医学社 腎と透析診療指針 2016 先天性ネフローゼ症候群を分担執筆 2016 223-226

6 . 研究組織

(1)研究代表者

綾 邦彦(AYA KUNIHICO)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号:20379762

(2)研究分担者

大内田 守(OUCHIDA MAMORU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号:80213635

岡 剛史(OKA TAKASI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号: 50160651