

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09299

研究課題名(和文) siRNAを用いた腎尿細管機能解析の検討

研究課題名(英文) Analysis of renal tubular function using siRNA

研究代表者

森本 哲司 (MORIMOTO, Tetsuji)

東北医科薬科大学・医学部・准教授

研究者番号：10344657

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)：本研究テーマは、灌流された腎尿細管にsiRNAを導入し、標的遺伝子がノックダウンされた際の腎尿細管機能を微小単離尿細管灌流法で解析することだった。これを達成するために、48時間以上の長時間灌流法の確立を進めた。最終的には、灌流開始約36時間後に皮質部のヘンレの太い上行脚において、経上皮電位の測定に成功した。細菌の混入を防ぐためにチャンバーのディスボ化を実現できれば、さらに長時間灌流できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The subject of this research was to analyze renal tubular function after delivering siRNA using in vitro microperfusion. We tried to establish an in vitro microperfusion for more than 48 hours. Finally, we succeeded to measure transepithelial voltage in cortical thick ascending limb after about 36 hours of the experiment. If we introduce a disposal chamber to avoid a contamination, we have a good chance to establish an in vitro a long time microperfusion.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：長時間微小単離尿細管灌流法 腎尿細管機能解析

1. 研究開始当初の背景

(1)これまでの siRNA を用いた研究は、主に培養細胞などを対象に行われることが多かった。研究開始時点では、管腔構造を保持した細胞に対する siRNA の導入は Yang らの膀胱管細胞のみで、尿管に導入した報告は見当たらなかった。

(2)単一遺伝子異常に基づく尿管機能異常症で新規の遺伝子変異が見つかった際には、アフリカツメガエル卵母細胞や培養細胞などを用いた強制発現実験系で機能解析を行い、その遺伝子産物が大幅に低下することが予想される遺伝子変異(ナンセンス変異など)の場合には、標準的なノックアウト動物を作成して遺伝子産物の機能解析を実施することが多い。しかし、遺伝子改変動物を用いる実験には、多大な費用と時間を要することが短所であると思われた。

2. 研究の目的

(1)siRNA を管腔構造が保持された尿管に導入することは可能なのか?を明らかにすること。

(2)siRNA を尿管細胞に導入できた場合には、real time PCR 法を用いて標的遺伝子のノックダウン率を測定し、さらに微小単離尿管灌流法で経上皮電位の測定を行い、標的遺伝子のノックダウンによる尿管機能の変化を解析する。

以上の二つが、本研究課題の目的である。

3. 研究の方法

(1)微小単離尿管灌流実験は、水分および飼料に自由アクセスした 10-12 週令の C57BL/6 マウス(メス)を頸椎脱臼による安楽死後速やかに開腹し、両側腎臓を摘出後、4 に冷却した HEPES 緩衝リンゲル液中に移した。その後、実体顕微鏡上に設置されたペトリ皿の上で、目的とする尿管分節を 2 本のピンセットで手動的に単離した。次に、単離した尿管分節をトランスファーピペットで、倒立顕微鏡のステージ上に設置したチャンバーに移した。灌流液の温度は、ホットプレートとチューブヒーターを組み合わせ、室温または 37 が維持できるようにシステムを構築した。また、より生理的な環境下で実験を行うために、灌流液には重炭酸イオンを入れ、液の pH を安定化させるために、CO₂ を 7%に設定したインキュベーター内に灌流液を静置した。CO₂ を高めに設定した理由は、閉鎖回路を組んで灌流液を再利用するためである。

(2)経上皮電位の測定は、Ag-AgCl₂ 電極を用い、管腔側と浴液側に同じ組成の灌流液を流しながら、経上皮電位の測定を行った。皮質部の太いヘンレの上行脚(cTAL)では、定常

状態で陽性電位が観察されることと管腔速度を低下させた際に電位がさらに上昇するという特徴があるため、この電位変化を経時的に測定した。実際の電位は、High-input インピーダンス電位計(Du773; World Precision Instruments, USA)で測定し、Chart 5(AD Instruments, USA)で記録した。

(3)標的遺伝子のノックダウン率は、灌流実験終了後に尿管を回収し、この尿管細胞から mRNA を抽出する。抽出した mRNA を鋳型に RT-PCR を行い、real time PCR 法で標的遺伝子の発現量をコントロール(スクランブル siRNA 導入)群と siRNA 導入群と比較検討する。

4. 研究成果

(1)灌流液の温度について

これまでの経験から、室温実験の方が細菌の混入が少ない印象があったため、研究開始当初は、室温で実験を行った。重炭酸溶液では、細菌の混入を認めなかったが、灌流時間が長くなってくると尿管細胞の見映えが悪くなり、経上皮電位が計測できなかった。そこで、液温を 37 に変更したが予想通り細菌の混入が著しくなり、長時間灌流を維持できなかった。

これ以降、抗菌薬の導入や灌流液を培養液に変更するなどの試行錯誤を繰り返した。また、細胞が灌流直後から剥がれ落ちる現象が続き、この原因究明に時間を要した。この原因は、AgCl ワイヤを長時間灌流液に浸すことが最も疑われた。最終的には、液温は短時間実験では室温でも問題なかったが、長時間実験には不向きであり、37 前後が細胞の状態を維持するためには最適であると結論づけた。

(2)灌流液について

急性期実験に使用する灌流液(115 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 2.3 mM Na₂HPO₄, 10 mM Na acetate, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 5 mM KCl, 8.3 mM glucose, 5 mM alanine)で実験を始めた。しかし、灌流時間が長くなると徐々に尿管細胞の状態が悪化してきたため、MEM に変更した。ところが、栄養分が多いためか著しい細菌の混入が目立つようになり、抗菌薬の使用を余儀なくされた。様々なトライアルの後に、MEM に Zellshield®(Minerva Biolabs GmbH, Germany)という試薬(グラム陰性菌、グラム陽性菌、真菌やマイコプラズマに効力がある)を添加することで、少なくとも細菌の増殖は大幅に軽減した。この結果を受けて、研究の大部分はこの灌流液で行った。

(3)経時的な細胞形態の変化について

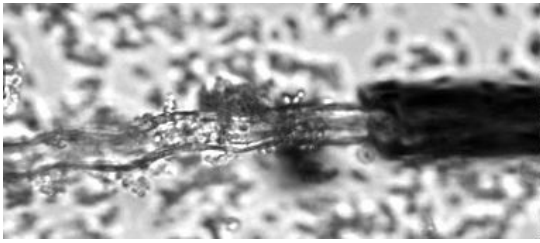


図 1 . 灌流開始 24 時間後に細菌の混入

浜松ホトニクス社のアクアコスモシステムを用い、経時的な細胞形態を記録した。図 1 は、研究開始当初に細菌の混入を繰り返した実験例で、増殖した無数の細菌が底面に観察され、細菌が尿細管に纏わりつき実験の継続が困難だった（閉鎖回路での実験）。

最終実験では、MEM + Zellshield®を用い、灌流液温度 37 で実験を行った。また、これまでは灌流液を節約するために閉鎖回路にしていたが、細菌の混入を少しでも減らす目的に、灌流液の再利用を断念した。その結果、細菌の混入は著しく軽減し、図 2,3,4 に提示したように、実験開始時・24 時間後・36 時間後も cTAL の細胞形態は保たれた。なお、特殊形状のチャンバーを使用しているため、毎回の実験では同じチャンバーを用いた。図 2,3,4 では判然としないが、この最終実験においても細菌の混入を完全に防ぐことはできなかった。

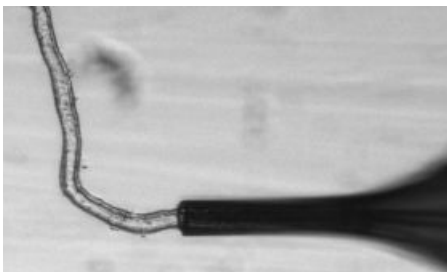


図 2. 実験開始時の cTAL

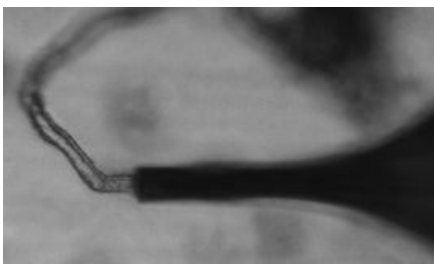


図 3. 実験開始 24 時間後の cTAL

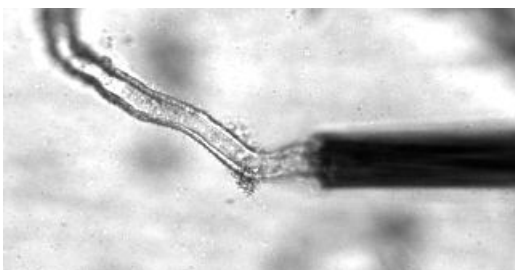


図 4. 実験開始 36 時間後の cTAL

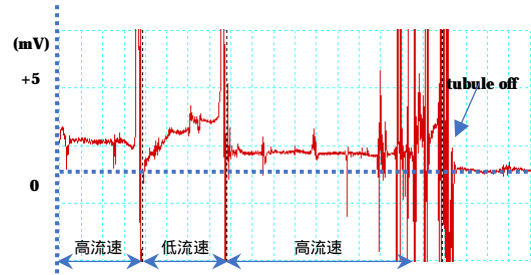


図 5. 灌流開始 36 時間後の経上皮電位の変化
(4) 経上皮電位について

灌流開始 36 時間後の経上皮電位の変化を図 5 に示す。管腔内速度を変化させながら経上皮電位を測定した際に、cTAL の特徴である低流速時に電位がプラス方向に上昇する現象が認められた。また、実験の最後に尿細管を外し、電位のゼロ点を確認した。その結果、この cTAL では、+0.89mV の電位が出ていたことが判明し、管腔側と浴液側に同じ灌流液（電解質などの濃度勾配が存在しない）を使用した場合に cTAL では陽性電位がみられるという特性と合致していた。

今回の研究期間内に、目標とした 48 時間以上の長時間灌流実験法を確立することはできなかった。しかし、最終実験では 36 時間まで cTAL を灌流することに成功した。加えて、尿細管機能が保持されていたことを確認する事ができた。

最後まで、細菌の混入問題をクリアすることが極めて困難だったが、例えばチャンバーのディスポ化を行い、より一層細菌の混入を減少させることができれば、目標とする 48 時間以上の灌流ができる可能性が示唆された。培養実験などで使用されている既存のディッシュで底面の一部がガラス素材のものを加工することや 3D プリンターを用いることでチャンバーのディスポ化ができないかを今後検討する予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森本 哲司 (MORIMOTO, Tetsuji)
東北医科薬科大学・医学部・准教授
研究者番号：10344657

(2) 研究分担者

根東 義明 (KONDO, Yoshiaki)
日本大学・医学部・教授
研究者番号：00221250

石毛 美夏 (ISHIGE, Mika)
日本大学・医学部・講師
研究者番号：90420950