

令和元年6月21日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10631

研究課題名(和文)小動物モデルを用いた先天性水腎症発生の原因探索研究

研究課題名(英文)The exploratory research of congenital hydronephrosis using animal model

研究代表者

高山 達也 (Takayama, Tatsuya)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90324350

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)：Luciferase-Transgenic LEWラットに適量のポリアミンを摂取させることで水腎症が発症し、ポリアミンの摂取を止めることで水腎症が回復することが確認され、ポリアミン応答性の遺伝子群が水腎症の発症に深く関与していること、および、小児先天性水腎症モデル動物として非常に有望であることが示唆された。さらに誘発された水腎症はポリアミン摂取が直接的原因では無く、染色体上の変異が直接的な要因であり、ポリアミンが関与していることも唆された。ポリアミン摂取による水腎症発症機序に関わる遺伝子領域および遺伝子群を探索する目的でゲノムDNAを抽出し、塩基配列の決定を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性水腎症発症機序に関わる遺伝子領域および遺伝子群が同定されることにより、先天性水腎症に対する新しい治療ストラテジーを提供すると同時に、発生学の新しい道筋を見出す可能性があり学術的意義は大きい。また、対象患者の病態が経過観察で良いか、それとも外科的治療が必要なのかを選別できる指標を探索することも可能となり、対象患者の精神および肉体的苦痛を軽減し、患者のQOLの向上も期待でき、社会的意義も期待できる。

研究成果の概要(英文)：The phenomenon that hydronephrosis developed when Luciferase-Transgenic LEW rats were fed with an appropriate amount of polyamine, and hydronephrosis recovered by stopping intake of polyamine was confirmed. It has been suggested that the polyamine-responsive gene cluster is deeply involved in the onset of hydronephrosis and that it is very promising as a pediatric congenital hydronephrosis animal model. Furthermore, induced hydronephrosis is not a direct cause of polyamine intake, but a mutation on a chromosome is a direct factor, suggesting the involvement of a polyamine. Genomic DNA is extracted for the purpose of searching gene regions and gene groups involved in the onset mechanism of hydronephrosis caused by polyamine intake, and the base sequence is determined.

研究分野：腎癌 核酸代謝 不妊症 先天奇形

キーワード：先天性水腎症 ポリアミン

1. 研究開始当初の背景

水腎症には先天性と後天性があり、前者は「発生異常」、後者は「尿路結石症や腫瘍および炎症」などの尿路狭窄や閉塞が原因である。そして尿路通過障害のため、結果的に水腎症に至る。

先天性水腎症は、小児泌尿器科疾患で最も多い。これまでは外科的介入が積極的になされていたが、約 80% で自然軽快がみられることが示され、外科的治療の対象は減少した。しかしながら、依然として発生機構、経過は不明でありその解明が切望されている。自治医科大学とちぎ子ども医療センターは、先天性水腎症に対して、年間 10 数例の外科的治療が行われる全国的でも有数の治療センターであり、研究分担者の中井はその名手である。外科的に切除された検体の採取に加え、自然軽快する患者群の臨床経過も十分にサンプリングされ本研究遂行にあたり、臨床的還元の見点からも最適な環境にある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、先天性水腎症に対する新しい治療ストラテジーを提供すると同時に、発生学の新しい道筋を見出す可能性がある。また、対象患者の病態が経過観察で良いか、それとも外科的治療が必要なのかを選別できる指標を探索することである。対象患者の精神的および肉体的苦痛を軽減し、患者の QOL の向上も期待できる。また、腫瘍と非腫瘍（腎盂増生）の境界上にある分子機序の解明により、新規抗がん剤の探索やスクリーニング動物モデルとしての有用性について検討する。

3. 研究の方法

水腎症の発症至適ポリアミン含有量の検討および水腎症モデルラットの評価：Luciferase-Transgenic LEW ラット (Luc-TgLEW ラット)・野生型 LEW ラット・SD ラット・BN ラットの雄 8～10 週齢を用いてポリアミン含有率を変化させた飼料を自由経口摂取の条件で与え、体重測定を行った。グループ分けに関しては、オリエンタル酵母に発注してアミン含有飼料を 0%, 0.01%, 0.05%, 0.1% の 4 群を作製し、1 匹飼いのケージに実施した。尚、本実験で使用したポリアミン含有特殊飼料には、既に、摂食の趣向性および成育阻害をきたす事は無く、単純にポリアミン含有率による生体内変化を捉えられる事が明らかとなっている。水腎症発症に関しては、ポリアミン含有飼料摂取開始から 6 週間目にて開腹し、左右の腎臓を目視にて状態確認を行った。

病態確認とサンプリング：ポリアミン 0.1% 含有飼料を 6 週間自由摂取させた Luc-Tg LEW ラットを麻酔下にて開腹し、水腎症を発症している事を目視にて確認、その後、両側尿管を切断して、尿を回収した。また腎臓内に尿の蓄積で透見できる箇所は 30G の針を用いてシリンジで吸引して蓄積している尿を回収し、腎尿細管障害の指標マーカーである、NAG (尿中 β -D-N アセチルグルコサミニダーゼ)、糸球体障害の指標マーカーである、尿中微量アルブミンの測定を行った。次に下大静脈より採血を行い、腎機能の指標マーカーである BUN (尿素窒素) および Cre (クレアチニン) の測定を実施し、その後、腎臓を摘出。2 分割 (病理用、検査用 (DNA, RNA 抽出およびメタボローム解析用)) して採材を行った。尚、追加実験として、検査用の 1 部 (約 10mg) および採血サンプル (血清) の一部を組織中・血液中ポリアミン濃度を測定するために使用した。

腎組織および LEW ラット由来間葉系幹細胞からの核酸抽出および変異領域の検討：先の腎臓組織内におけるポリアミン濃度の結果より、Luc-Tg LEW ラットの染色体上、特に Luciferase cDNA が挿入されている領域に水腎症を呈する重要な遺伝子が破壊されている事が示唆された。そこで、ポリアミン摂取により水腎症を呈する Luc-Tg LEW ラットと水腎症を呈しない Wild-type LEW ラットの腎臓組織よりゲノム DNA を市販されているキットを用いて抽出した。しかし、腎臓組織より抽出する方法は品質および収量の問題が発生したため、Wild- および Luc-Tg LEW ラットの鼠径部皮下脂肪組織より間葉系幹細胞を樹立し、培養細胞から市販のキットを用いてゲノム DNA を安定かつ大量に入手可能な方針に変更した。回収したゲノム DNA を Reversed PCR 法と Luciferase cDNA に特異的な Primer を用いて、ポリアミン関連および水腎症関連の遺伝子情報を DNA シーケンサーにて解析を行う。

4. 研究成果

水腎症の発症至適ポリアミン含有量の検討：1 日当たりの摂取量はポリアミン含有量に関係無く、いずれの群および種でも 15g/日 で変化は無く、体重増加に関しても 4 群間で変化は無かった。水腎症の発症有無に関しては、ポリアミン含有率 0.1% 群においてのみ典型的な水腎症が確認された。正常 Luc-Tg ラット (ポリアミン含有飼料 0.01%) と比較して Luc-Tg LEW ラットにおいては 6 匹中 4 匹で腎臓体積が約 1.5 倍程度 (透見可能) に肥大しており、6 匹中 2

匹で約 1.2 倍程度の肥大化が確認された。一方、野生型 LEW ラットでは 6 匹中 1 匹、SD ラットでは 6 匹中 0 匹、BN ラットでは 6 匹中 1 匹で 1.1~1.2 倍程度の腎臓肥大が確認された。以上の結果より、Luciferase 遺伝子をゲノムに組み込まれた LEW に高ポリアミンを摂食させると水腎症を発症する事から、ポリアミン応答性の遺伝子または関連遺伝子群の破綻が起こっている事が示唆された。

次に、ポリアミン 0.1%含有飼料を 6 週間自由摂取させた Luc-Tg LEW ラットを麻酔下にて腹部を小切開し、水腎症を発症している事を目視にて確認した後、閉腹し、ポリアミン不含(0%)飼料に切り替えて、6 週間自由摂取させた。実験は 6 匹の Luc-Tg LEW ラットを用いて開始し、6 週間後に目視にて水腎症(腎臓肥大)が大きい個体(1.5 倍程度)を 3 匹選抜し、ポリアミン不含飼料にて飼育管理を行った。選抜した 3 匹において全例で水腎症(腎臓肥大)が軽減している事が目視にて確認された。3 匹中 1 匹は野生型 LEW ラットと同等の大きさに戻っており、3 匹中 2 匹においては 1.1 倍以下に戻っている事が判明した。以上の結果より、ポリアミン応答性の遺伝子群が水腎症の発症に深く関与している事、および、小児水腎症モデル動物として非常に有望である事が示唆された。

病理標本および尿・血清の生化学データの解析：各ラットより回収した尿検査の結果、尿検査の結果、通常食群では NAG: 8.3 ± 6.0 U/L, 尿中微量アルブミン: 18.0 ± 6.0 mg/L であるのに対し、ポリアミン 0.1%含有飼料群では NAG: 20.7 ± 4.0 U/L, 尿中微量アルブミン: 547.0 ± 46.7 mg/L と高値を示した。次に血液検査の結果、通常食群では BUN: 20.0 ± 1.3 mg/dL, Cre: 0.4 ± 0.4 mg/dL であり、ポリアミン 0.1%含有飼料群では BUN: 23.2 ± 0.8 mg/dL, Cre: 0.3 ± 0.2 mg/dL と両者間で顕著な差が確認されなかった。以上の結果より、少なくとも腎臓を構成している細胞-細胞間の tight-junction 障害では無く、細胞本体の障害である事が示唆された。

次に、腎臓組織内の各種ポリアミン濃度を HPLC (高速液体クロマトグラフィ法)にて測定した。その結果、水腎症を呈した Luc-Tg LEW ラットでは、Putrescine: 1.5 ± 0.1 μ g/mL, Spermidine: 72.8 ± 7.4 μ g/mL, Spermine: 234.3 ± 15.4 μ g/mL であり、Wild-type LEW ラットでは、Putrescine: 1.4 ± 0.2 μ g/mL, Spermidine: 70.1 ± 8.3 μ g/mL, Spermine: 243.3 ± 15.4 μ g/mL と、両者間で濃度の変化は確認されなかった。従って、Luc-Tg LEW ラットで誘発された水腎症はポリアミン摂取が直接的原因では無く、Luc-Tg ラットの染色体上の変異が直接的な要因であり、ポリアミンが関与している事が示唆された。

最後に、本学の病理検査部にて摘出した腎臓薄層切片の診断を行った結果、ポリアミン 0.1%含有飼料群においてのみ、腎皮質および腎髄質の薄層化、そして糸球体の圧迫による極小化が確認され、典型的な水腎症であると断定された。肥厚領域は異形核が無い点、増生細胞の形態等から「がん」では無いとの診断も同時に確認された。糸球体に関しては病理組織学的には特に破綻などは確認されなかった。

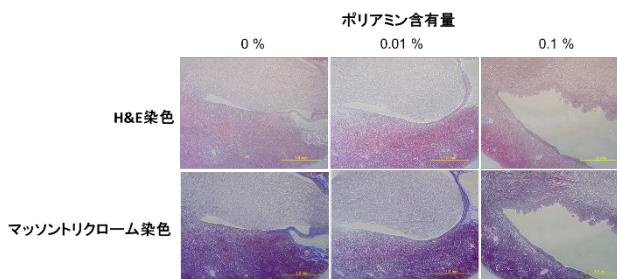


図1 各濃度のポリアミン含有飼料を経口摂取したLuc-Tg LEWラットの腎臓病理図

腎組織からの核酸抽出および変異領域の検討：ポリアミン摂取により水腎症を呈する Luc-Tg LEW ラットと水腎症を呈しない Wild-type LEW ラットの腎臓組織または脂肪組織由来間葉系幹細胞よりゲノム DNA を抽出した。Wild-type LEW ラットと Luc-Tg LEW ラット間で塩基配列が異なるゲノム領域を明確に特定するために、「Luciferase cDNA およびプロモーター領域(約 1.5kbp)」の前後、約 3kbp 以上のゲノム DNA 断片(全長約 7.5kbp 以上)が必要である。そこで抽出したゲノム DNA を各種制限酵素(単一)で処理をし、1.0%アガロースゲル電気泳動法にて切断されたゲノム DNA 鎖長が少なくとも 7.5kbp 以上の領域にスメアバンドが確認されたサンプルのみ Ligase を用いて自己閉環させた。尚、用いる制限酵素は Luciferase cDNA 領域を切断しない事を条件に選抜している。次に Luciferase cDNA 領域内で設計した特異的プライマーを用いて PCR を行い、7.5kbp 以上の領域にバンドの有無を確認した。

アガロース電気泳動法により全長 7.5kbp 以上となる分取ゲノム断片候補を 20 種類選抜し、ポリアミン摂取による水腎症発症機序に関わる遺伝子領域および遺伝子群を探索する目的で、分取した各候補サンプルの全領域に渡り塩基配列の決定を現在進行中である。

5 . 主な発表論文等

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：森田 辰雄
ローマ字氏名：Morita Tatsuo
所属研究機関名：自治医科大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号(8桁)：40200422

研究分担者氏名：中井 秀郎
ローマ字氏名：Nakai Hideo
所属研究機関名：自治医科大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号(8桁)：50167540

研究分担者氏名：久保 太郎
ローマ字氏名：Kubo Taro
所属研究機関名：自治医科大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号(8桁)：50508744

研究分担者氏名：寺谷 工
ローマ字氏名：Teratani Takumi
所属研究機関名：自治医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁): 70373404

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。