

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20104

研究課題名(和文) 垂系統マウスを用いた尿路結石抑制遺伝子Nntの同定と抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文) Identification of kidney stone suppressor gene Nnt and clarification of its suppression mechanism, using mice substrains

研究代表者

宇佐美 雅之 (Usami, Masayuki)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：30534755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：疾患遺伝因子の研究には、近交系マウスが用いられることが多く、わずかな遺伝学的な差が生じた垂系統の存在も報告されている。本研究では、近交系マウスC57BL/6の垂系統であるC57BL/6J(B6J)とC57BL/6N(B6N)に対し、グリオキシル酸80mg/kgを連日腹腔内投与した後に腎を採取し、尿路結石形成量・遺伝子発現量・タンパク質発現量を垂系統間にて比較検討した。結果、B6Jでは有意に結石形成量が多いことが確認された。また、B6Jでは遺伝子Nntの発現量が有意に低下し、Nntタンパク質の発現が欠如していることが確認された。以上から、Nntは新たな尿路結石抑制遺伝子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Inbred mice strains are often used for research of disease genetic factors, and the existence of mice substrains which have genetic differences have also been reported. In this study, after induced with a daily intra-abdominal injection of 80 mg/kg glyoxylate to C57BL/6J (B6J) and C57BL/6N (B6N), which are subgroups of inbred mouse C57BL/6, and renal specimens were collected. The amount of kidney stone formation, the amount of gene expression, and the amount of protein expression were compared among mice substrains. As a result, it was confirmed that the amount of kidney stone formation was significantly large in B6J. In addition, in B6J, it was confirmed that the expression level of gene Nnt was significantly decreased and the expression of Nnt protein was absent. From the above, it was suggested that Nnt is a new kidney stone suppressing gene.

研究分野：尿路結石

キーワード：尿路結石症 モデルマウス研究 疾患関連遺伝子 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

日本尿路結石症学会の 2005 年の全国疫学調査によると、わが国における尿路結石の患者数は食生活の欧米化とともに急増し、生涯罹患率は男性では 15%、女性では 7%にも達すると報告されている⁽¹⁾。また、5 年以内の再発率は約 50%と高く、繰り返す疼痛発作は患者の QOL を損なうだけでなく腎機能障害 (CKD) の大きな要因となっていることから、尿路結石の予防対策は医学的・社会的問題になっている。

尿路結石は多因子疾患であり、遺伝因子に環境因子が作用し発症しており、私たちはこれまで結石形成を認めることがなかったマウスにおいて、グリオキシル酸を腹腔内投与することにより、尿路結石モデルマウスの作成や、マウスが尿路結石形成に対し強い防御能をもつことを報告してきた⁽²⁾。

遺伝因子の研究には、近交系マウスが用いられることが多く、私たちが用いた近交系は C57BL/6 であるが、この近交系には C57BL/6J (B6J) と C57BL/6N (B6N) の亜系統が存在し、遺伝学的に差異があること確認されている⁽³⁾。

2. 研究の目的

本研究は、亜系統の遺伝学的な差による尿路結石形成への影響を検討することで、新たな尿路結石関連遺伝子の同定を行う。また、同定した疾患関連遺伝子の検討および機能解析を行い、尿路結石の新たな病態解明および治療・予防法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 亜系統結石モデルマウスによる尿路結石形成量の検討: 8 週齢雄の B6J および B6N (各 N=15) に対し、グリオキシル酸 80mg/kg を 12 日間腹腔内投与し、6 日毎に腎検体を採取した。併行して 24 時間蓄尿を行い、尿中シュウ酸、クエン酸、カルシウム、リン、マグネシウム排泄などの結石関連物質を測定した。採取した腎は、4%パラフォルムアルデヒドによる固定にてシュウ酸カルシウム結石染色 (Pizzolato 染色) を行い、偏光顕微鏡による観察にて結石形成量を定量し比較した。

(2) 亜系統間に差がある遺伝子発現量の検討: (1)にて採取した腎から RNA を回収し、cDNA を作製した。B6J と B6N の亜系統間において、遺伝子上の塩基配列に差が報告されている 6 遺伝子 (Naaladl2、Aplp2、Lims1、Fgf14、Snap29、Nnt) について、腎における発現量を定量 PCR 法により比較した。

(3) Nnt タンパク質発現量の検討: (1)にて採取した腎における Nnt タンパク質の発現量を、Western blotting および免疫染色により亜系統間において比較した。

(4) Nnt による ROS を介した結石抑制効果の

検討: (1)と同時に採取した腎をメタカン (メタノール: クロロホルム: 氷酢酸 = 6:3:1) 液により固定し、Carbonyl Protein Immunostaining Kit® (シマ研究所)にて免疫染色を行い、ROS 活性を検討した。

(5) Nnt 遺伝子クローニング: マウス Nnt 遺伝子について、B6N および B6J 由来 cDNA を用い、promotor 領域を含む全長を long PCR 法を用いて cloning した。作製した PCR product を pGEM®-T Easy (Promega) vector へ挿入し、大腸菌に形質転換した後、37 °Cにて一晚培養し、発色確認のうえシークエンス法にて cloning の成否を確認した。

4. 研究成果

(1) 亜系統結石モデルマウスによる尿路結石形成量の検討: Day0 においては B6J・B6N とともに腎に結晶の沈着を認めなかった。両群ともに、Day6 以降において腎皮髄境界部の尿管内にシュウ酸カルシウム結石の沈着を認めた。認められた結石形成量を定量化し比較したところ、経時的に結石形成量は増加し、Day6・Day12 において、B6J は B6N に比べて有意に多いことが確認された。

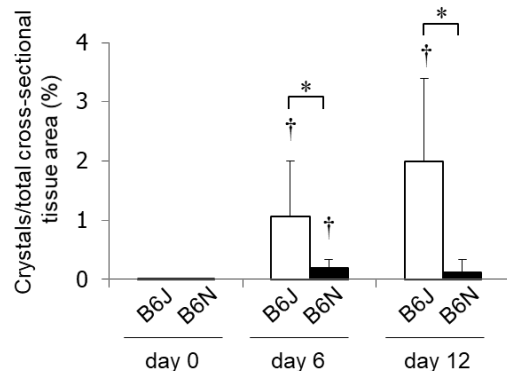


図 1 亜系統間における結石形成量

(2) 亜系統間に差がある遺伝子発現量の検討: SNP を持つ遺伝子 (Naaladl2、Aplp2、Lims1、Fgf14、Snap29) は、いずれも発現量に有意な差を認めなかった (Naaladl2 については評価不能であった)。Deletion 遺伝子である Nnt については、Day0 において B6J は B6N と比べて発現量が有意に低下しており、その後のいずれの経過においても同様の結果であった。

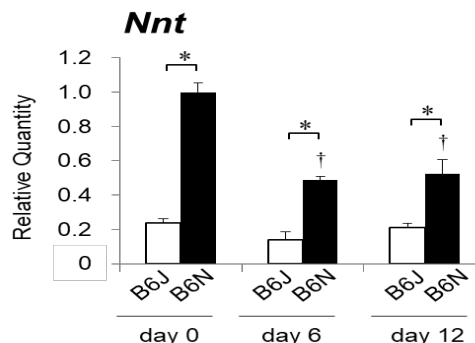


図 2 亜系統間における Nnt 遺伝子発現量

(3) Nnt タンパク質発現量の検討 : Western blotting および免疫染色いずれの結果からも、B6J においては Nnt タンパク質の発現が認められなかった。また、免疫染色における Nnt タンパク質の発現は、B6N では腎尿管上皮細胞において高発現が認められた。

(4) Nnt による ROS を介した結石抑制効果の検討 : B6J・B6N とともに腎組織全体にカルボキシル化タンパク質の発現を認めた。Day0 において B6J では高い発現を認め、Day6・Day12 においてもその高い発現は持続していた。B6N では、Day0 と比較し、Day6・Day12 において発現は高い傾向を示した。いずれの経過においても B6J では B6N と比べて発現が高い傾向を認めた。

(5) Nnt 遺伝子クローニング : B6J および B6N の 2 種類の Nnt 遺伝子の全長を持った、cloning vector を作製した。今後の Nnt 遺伝子機能解析に用いていく予定である。

(6) 尿路結石関連遺伝子の同定 : (1)の結果から、遺伝学的にほぼ同じである B6J および B6N の亜系統間において、B6J では有意に結石形成量が多く、亜系統間のわずかな遺伝学的な差が尿路結石形成に影響を及ぼしたと考えられる。そのわずかな遺伝学的な差として、(2)における亜系統間に遺伝子上の塩基配列差がある 6 遺伝子 (SNP ; 5 遺伝子、Deletion ; 1 遺伝子) の発現量比較の結果、Nnt のみ B6J では発現量が有意に低下していることが確認された。また(3)のように、B6J では Nnt タンパク質の発現が欠如していることが確認された。これらから、B6J の腎における結石形成量が多くなることに、Nnt の発現低下が関与していると考えられ、Nnt は新たな尿路結石抑制遺伝子であることが示唆された。今後の Nnt 遺伝子 cloning vector を用いた、培養細胞解析やトランスジェニックマウス研究などにより、尿路結石の病態解明につながるものとする。

< 引用文献 >

Yasui T, Iguchi M, Suzuki S, Okada A, Itoh Y, Tozawa K, Kohri K. Prevalence and epidemiologic characteristics of lower urinary tract stones in Japan. *Urology*. 72(5), 1001-1005, 2008.

Okada A, Nomura S, Higashibata Y, Hirose M, Gao B, Yoshimura M, Itoh Y, Yasui T, Tozawa K, Kohri K. Successful formation of calcium oxalate crystal deposition in mouse kidney by intraabdominal glyoxylate injection. *Urol Res*. 35(2), 89-99, 2007.

Mekada K, Abe K, Murakami A, Nakamura S, Nakata H, Moriwaki K, Obata Y, Yoshiki A. Genetic differences among C57BL/6

substrains. *Exp Anim*. 58(2), 141-149, 2009.

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)

Masayuki Usami, Atsushi Okada, Kazumi Taguchi, Shuzo Hamamoto, Kenjiro Kohri, Takahiro Yasui, “Genetic differences in C57BL/6 mouse substrains affect kidney crystal deposition”, *Urolithiasis*, 査読有, Received: 31 July 2017 / Accepted: 10 January 2018

[学会発表](計5件)

Masayuki Usami, et al., “Nnt gene suppresses oxidative stress and kidney crystal deposition”, AUA 2017 Annual Meeting, 2017.5.12-16, Boston, USA

Masayuki Usami, et al., “Nnt gene suppresses kidney stone formation and oxidative stress”, 13th International Symposium on Urolithiasis, 2016.7.19-22, Chiba, Japan

宇佐美 雅之 他、“遺伝子 Nnt が腎に与える酸化ストレスへの影響と尿路結石抑制について”, 第 104 回日本泌尿器科学会総会、2016.4.23-25、仙台市

Masayuki Usami, et al., “Expression of Nnt appears to suppress kidney stone formation in C57BL/6 mouse substrains”, AUA 2015 Annual Meeting, 2015.5.15-19, New Orleans, USA

宇佐美 雅之 他、“マウス亜系統の遺伝的学差異を用いた、新たな尿路結石抑制遺伝子 Nnt の同定”, 第 103 回日本泌尿器科学会総会、2015.4.18-21、金沢市

[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

6. 研究組織

(1)研究代表者

宇佐美 雅之 (USAMI, Masayuki)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：30534755

(2)研究分担者

郡 健二郎 (KOHRI, Kenjiro)
名古屋市立大学・その他部局等・学長
研究者番号：30122047

安井 孝周 (YASUI, Takahiro)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：40326153

戸澤 啓一 (TOZAWA, Keiichi)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：40264733

岡田 淳志 (OKADA, Atsushi)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：70444966

田口 和己 (TAGUCHI, Kazumi)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：00595184

海野 怜 (UNNO, Rei)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・臨床研究医
研究者番号：40755683

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし