

令和元年6月4日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09615

研究課題名(和文) 患者家系から発見した異常遺伝子配列を用いた家族性尿細管間質腎炎の分子病理学的研究

研究課題名(英文) a molecular biology study of Autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease by using mutated MUC1 cDNA sequence identified in our own patient family.

研究代表者

貝森 淳哉 (Kaimori, Junya)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：70527697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：家族性尿細管間質腎炎(ADTKD)は、検尿異常を認めないのに持続的に腎機能が低下する病態であり、家族性に発症する。現在まで、MUC1を原因遺伝子とするADTKD-MUC1は、その遺伝子異常部位が解析が困難なVNTR部位に存在する事が知られていた。申請者らは、MUC1 VNTR以前に遺伝子異常をもつ患者家系を発見。異常MUC1蛋白の発現ベクターを作成する事により、異常MUC1蛋白が細胞質内で凝集する事を見出した。また、異常MUC1 transgenic mouseを作成したところ、腸、肺、皮膚に炎症性病変を認め、患者家族にも肝質性肺炎、消化管炎、皮膚炎を認める事を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、ADTKD-MUC1の遺伝子異常部位は、VNTRに限られており、世界的にもVNTR以外のMUC1異常は報告されてこなかった。今症例は、VNTR以前に異常のある症例であり、症例的な意義は高い。また、ADTKD-MUC1の腎外病変については、今まで世界でも報告された事は無く、ADTKD-MUC1には、腎外病変はないとされてきた。申請者らの、transgenic mouse及び患者家系における、腎外病変の発見は、ADTKD-MUC1の病態像を根底から書き換えるもので、臨床的な意義は極めて高い。

研究成果の概要(英文)：Autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease (ADTKD) is an inherited kidney disease characterized by the progressive renal function loss almost without no urine sedimentation findings. Almost all previous gene mutation sites in ADTKD-MUC1 were placed within variable number tandem repeats (VNTRs). We discovered ADTKD-MUC1 family whose mutation site was before VNTRs. We also discovered that mutant MUC1 protein was resulted in cytoplasmic aggregation. Furtherly, we made mutant human MUC1 transgenic mouse and found that these mice demonstrated systemic inflammatory disease. In the response to these transgenic mouse findings, re-examination in our patients revealed that they also had interstitial pneumonia, inflammatory bowel disease, and skin lesion, which had not been described as symptoms of ADTKD-MUC1.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：ADTKD MUC1 VNTR 小胞体ストレス 細胞内凝集

配列が出来てくることが予想されることから、この反復配列が本疾患の病態形成に重要な役割を持つ事が示唆された (図3)。

2. 研究の目的

(1) MCKD1 原因遺伝子 MUC1 の異常蛋白質の性質の解析。

今回、申請者らが見出した遺伝子異常は、以前報告されていた異常部位とは異なっていたが、その遺伝子産物である異常蛋白のアミノ酸配列は驚くほど類似しており、SPRCHLGPQHAGPGLHRPP の反復配列が認められる。この異常蛋白が、正常な MUC1 蛋白とどのように異なるのか蛋白の性質の違いを明らかにする。

(2) 原因遺伝子 MUC1 の異常蛋白質発現の集合管培養細胞に対する影響の解析

異常 MUC1 及び正常 MUC1 発現ベクターを用いて、集合管細胞培養細胞に蛋白を発現させ、異常蛋白の細胞内局在の解析を行う。

(3) 異常ヒト MUC1 遺伝子発現遺伝子改変マウスを用いた、MCKD1 原因遺伝子 MUC1 の異常遺伝子発現の生体に対する影響と腎機能低下のメカニズムの解析

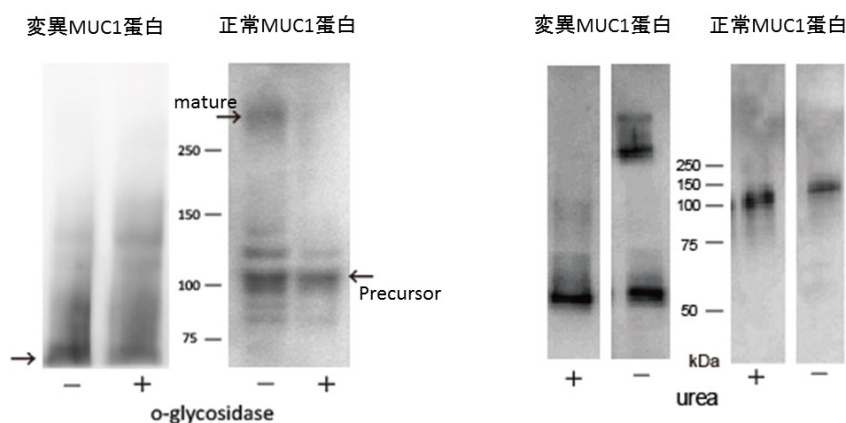
ヒト異常 MUC1 遺伝子をマウス *Muc1* promoter の制御下で発現させる遺伝子改変マウスを作成して、MCKD1 のモデル動物を作成し、分子遺伝学的に、MCKD1 の病態生理を解析する。

3. 研究の方法

- (1) ラビット polyclonal 抗体を用いたウェスタンブロッティングを用いて、異常 MUC1 蛋白の分子量、Glycosilation の量などを測定、正常 MUC1 蛋白との比較を行う。
- (2) 異常 MUC1 蛋白ではこれらの転写後修飾がどのように変化するかを解析する。
- (3) 異常 MUC1 蛋白に対する抗体で細胞の免疫染色を行い 細胞内の局在を検討する。また、同様に患者腎臓組織を免疫染色する。
- (4) ヒト異常 MUC1 遺伝子をマウス *Muc1* promoter の制御下で発現させる遺伝子改変マウスを作成して、MCKD1 のモデル動物を作成し、寿命及び病態解明を行う。

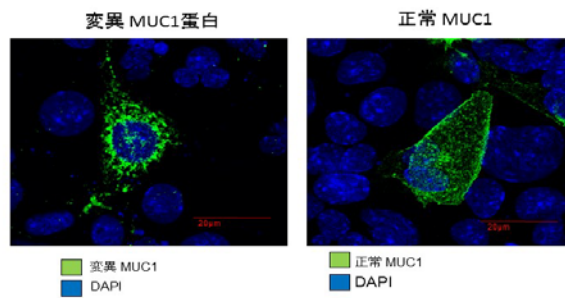
4. 研究成果

変異MUC1蛋白は正常MUC1蛋白と比較してグリコシル化が少ない、易凝集性蛋白であった



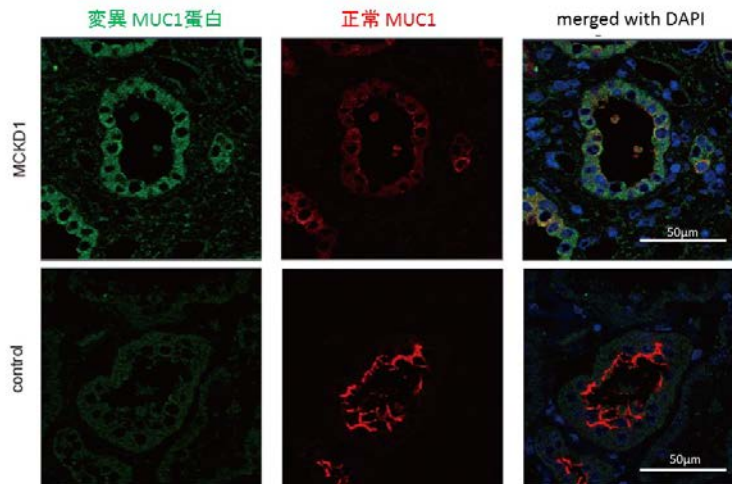
変異 MUC1 蛋白がどの程度、翻訳後修飾に影響を受けるか調べる為に、HEK293 細胞に正常 MUC1 蛋白、変異 MUC1 蛋白の発現ベクターを遺伝子導入して、免疫沈降を行い o-glycosidase で処理したところ、正常 MUC1 蛋白は、o-glycosidase 処理により分子量が約 100kDa 低下するのに大して、変異 MUC1 蛋白は、o-glycosidase 処理ほとんど分子量に変化が無かった。この事は、変異 MUC1 蛋白の glycosilation が極端に低下していることを示している。また、同様に遺伝子導入を行った後、urea で処理すると、正常 MUC1 蛋白の分子量がほとんど変化しないのに対して、変異 MUC1 蛋白は非還元状態では分子量が大きくなるのに対して、還元状態では分子量が小さくなった。この事は、変異 MUC1 蛋白が細胞質で自己凝集している可能性が高い事を示している。

変異MUC1蛋白は細胞質優位に発現がみられた



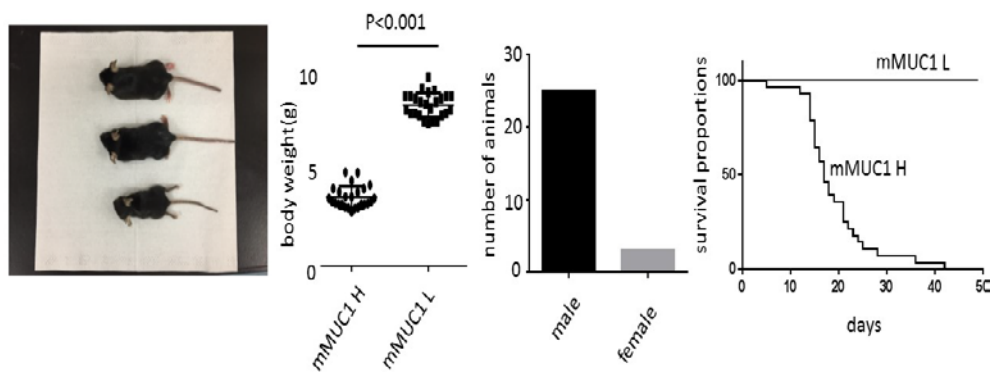
マウス遠位尿細管培養細胞 IMCD3 に、正常 MUC1 蛋白、変異 MUC1 蛋白の発現ベクターを遺伝子導入して蛍光免疫染色を行ったところ、正常 MUC1 蛋白が細胞膜パターンを取るのに対して、変異 MUC1 蛋白は細胞質パターンを示した。

MCKD1腎組織において変異MUC1蛋白は細胞質瀰漫性に発現していた



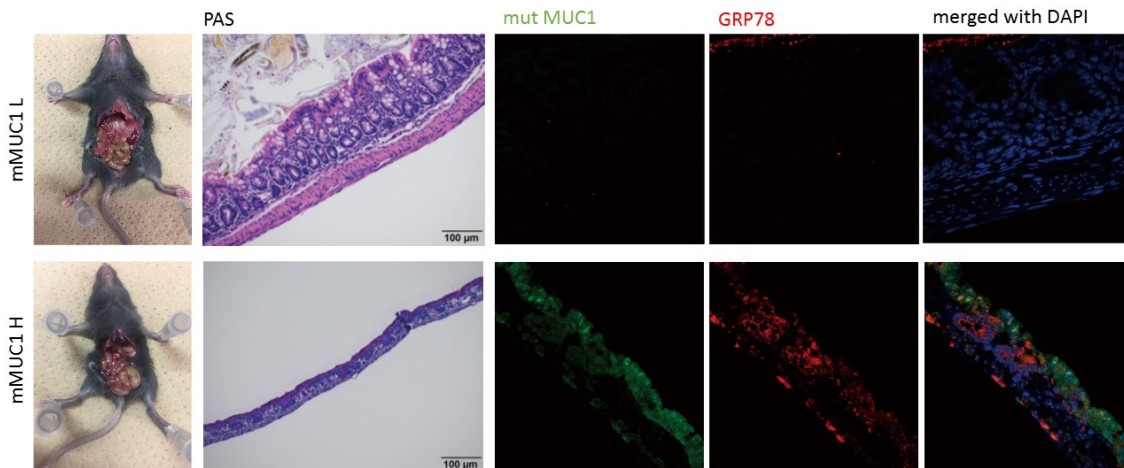
また、患者腎生検組織においても、変異 MUC1 蛋白は尿細管細胞の細胞質パターンを示し、培養細胞における局在と同じであった。

発育障害の個体は6週までにほとんどが死亡し、オスが圧倒的に多かった



異常 MUC1 蛋白を、マウス MUC1 promoter の支配下に発現させる transgenic マウスを作成したところ、生まれてきた transgenic hetero マウスの約 10%に、発育不全のマウスを認めた。発育不全マウスは、発育正常なマウスに比べ、体重は約半分以下であった。また、発育不全のマウスの性別は圧倒的に♂が多かった。発育不全マウスは、離乳と共に死亡していった。

発育障害の個体は腸の膨瘤を認め、粘膜萎縮と炎症細胞浸潤を認めた



発育不全マウスを解剖してみると、腸の全体的な膨瘤を認め、粘膜萎縮と炎症細胞浸潤を認め炎症性腸疾患に類似した病態を呈する事が判明した。また、腸以外にも、肺、腎臓、皮膚に炎症性病変を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- ① 具森淳哉
家族性間質尿細管腎炎、別冊 Bio Clinica 7(4), 104-109, 2018 (査読無)
- ② Yamamoto S, Kaimori JY (Corresponding Author), Yoshimura T, Namba T, Imai A, Kobayashi K, Imamura R, Ichimaru N, Kato K, Nakaya A, Takahara S, Isaka Y. Analysis of an ADTKD family with a novel frameshift mutation in *MUC1* reveals characteristic features of mutant MUC1 protein. Nephrol Dial Transplant. 2017 (査読有)
- ③ 具森淳哉
家族性間質尿細管腎炎、Bio Clinica 32(422), 71-76, 2017 (査読無)
- ④ 具森淳哉
家族性間質尿細管腎炎、細胞、49(10), 475-478, 2017 (査読無)

〔学会発表〕(計 9 件)

- ① 具森淳哉、異常 MUC1 transgenic mouse の解析で明らかとなった、ADTKD-MUC1 が全身性疾患である可能性、第 26 回嚢胞性腎疾患研究会、2018
- ② 具森淳哉、異常 MUC1 transgenic mouse の解析で明らかとなった、ADTKD-MUC1 が全身性疾患である可能性、第 9 回腎不全研究会、2018
- ③ 具森淳哉、NPH と MCKD を見逃さないために MCKD 症例、第 60 回日本腎臓学会学術総会、2017
- ④ 具森淳哉、腎疾患最終診断としての病理、質量分析、遺伝子診断、第 60 回日本腎臓学会学術総会、2017
- ⑤ 具森淳哉、MCKD1 の発症には変異 MUC1 遺伝子に対するナンセンス変異依存 mRNA 分解機構の破綻と小胞体ストレスが関与している、第 60 回日本腎臓学会学術総会、2017
- ⑥ 山本聡子、具森淳哉、家族性尿細管間質腎炎(MCKD1)原因異常蛋白 mut MUC1 の解析と患者尿中 exosome を用いた診断法の確立、第 59 回日本腎臓学会学術総会、2016
- ⑦ 山本聡子、具森淳哉、遺伝子解析により特定した本邦初の 1 型髄質嚢胞腎(MCKD1)家系の特徴と異常蛋白を用いた診断法の可能性、第 7 回分子腎臓フォーラム、2016
- ⑧ Next generation sequencer driven exome analyses identified a MCKD1 family with new mutation before VNTR of MUC1 DNA sequence, suffering from mucosal dysfunctions. Satoko Yamamoto, Jun-Ya Kaimori, American Society of Nephrology

Kidney Week 2015 Annual Meeting, 2015

- ⑨ 貝森淳哉、新たな遺伝子異常と腎移植を行った家族性尿細管間質腎炎の1家系、第48回日本臨床腎移植学会、2015

〔図書〕(計 1 件)

- ① 貝森淳哉、腎と透析ベッドサイド検査事典、2. 単一遺伝子疾患、5) ネフロン癆、常染色体劣勢多発のう胞腎、家族性尿細管間質腎炎 p367-369、東京医学社、2018

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名： 猪阪 善隆

ローマ字氏名： ISAKA YOSHITAKA

所属研究機関名： 大阪大学

部局名： 医学系研究科

職名： 教授

研究者番号(8桁)： 00379166

研究分担者氏名： 高原 史郎

ローマ字氏名： TAKAHARA SHIRO

所属研究機関名： 大阪大学

部局名： 医学系研究科

職名： 招へい教授

研究者番号(8桁)： 70179547

研究分担者氏名： 市丸 直嗣

ローマ字氏名： ICHIMARU NAOTSUGU

所属研究機関名： 大阪大学

部局名： 医学系研究科

職名： 寄附講座准教授

研究者番号(8桁)： 70346211

※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。