

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02348

研究課題名(和文)小胞体ストレス性Fanconi症候群の疾患概念の確立とその分子経路の解明

研究課題名(英文)A study on ER-stress-induced Fanconi syndrome

研究代表者

池田 正浩 (IKEDA, Masahiro)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：60281218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：Fanconi症候群は、多要因で生じる疾患であるにも関わらず、その症状は、腎、特に近位尿細管における、水、溶質、栄養素の再吸収不全に基づくものである。しかし、再吸収不全という共通の症状が生じるメカニズムについては不明のままである。本研究では、そのメカニズムとして、腎の小胞体ストレスを同定した。また、腎に小胞体ストレスが生じた結果、少なくとも2種類の遺伝子発現量の変化が症状と結びついていることも明らかにした。これらの結果は、ヒトおよび獣医臨床に重要な情報を提供するとともに、腎における新しい物質代謝の調節系を示したものと言える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Fanconi症候群は、先天性のものから、化学物質誘導型および疾患続発型と多岐の要因で生じる疾患である。しかしながら多くの場合、腎におけるアミノ酸などの再吸収不全という共通の症状を示す。本研究では、この共通の症状を示すメカニズムとして腎の小胞体ストレスを同定している。この成果は、Fanconi症候群の今後の診断・治療法の開発に貢献することに加えて、物質の腎における再吸収や分泌の新しい視座を与え、生理学的にも重要な意味を持つ。

研究成果の概要(英文)：Although Fanconi syndrome is a multifactorial disease, its clinical features are based on reduced reabsorption of water, solutes, and nutrients in the kidneys, especially in the proximal tubules. So far, the mechanism by which the common symptom of reabsorption deficiency occurs largely unknown. From this study, we have identified a new mechanism of renal endoplasmic reticulum stress for this deficiency. Also, we have shown that at least two gene expressions are directly linked to the symptom. These results provide important information for human and veterinary clinical fields and indicate a new regulatory system for substance metabolism in the kidney.

研究分野：獣医薬理学

キーワード：薬理学 小胞体ストレス Fanconi症候群 腎虚血再灌流障害

1. 研究開始当初の背景

Fanconi 症候群 (Fanconi 貧血とは別の疾患) は、先天性および後天性の要因で見られるため発生頻度が高い。後天性のものは化学物質誘導型と疾患続発型に分類され、化学物質誘導型の原因物質としては抗腫瘍薬や抗感染症薬などの使用頻度が高い薬剤、疾患続発型の原疾患としては、多発性骨髄腫やアミロイドーシスなどが知られる。最近では、中国産ペットジャーキーによる発症も問題となった (www.fda.gov/AnimalVeterinary)。Fanconi 症候群の症状は、腎、特に近位尿細管において水、溶質、栄養素の再吸収不全 (汎アミノ酸尿症、糖尿など) に基づくものである (引用文献)。そのため、アミノ酸などの栄養分が欠乏するとともに体液バランスが崩れ、代謝性アシドーシスや低カリウム血症を発症し、重篤な場合には、致命的な多臓器不全が生じる。しかし、多様な原因が知られているにも関わらず、再吸収不全という共通の症状が生じるメカニズムについては不明のままである。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は「多要因が小胞体ストレスシグナル経路を共通に活性化して Fanconi 症候群の固有の症状を作る」という仮説を検証・実証することである。

我々は最近、予試験の結果 (2017 年米国腎臓学会) から、小胞体ストレスがその収斂メカニズムに資する可能性を見出した。本研究ではこの成果を発展させて、モデル動物解析によって上記の目的を達成することに挑む。本成果は、Fanconi 症候群の病態メカニズムを明らかにすることの病理学的な意義に加えて、物質の再吸収や分泌の新しい視座を与え、腎生理学的にも重要な意味を持つ。

3. 研究の方法

モデル動物には、予試験でも用いた小胞体ストレス誘導薬であるツニカマイシン(TM) 処置動物、aquaporin-11 タンパク質 (Aqp11) ノックアウト動物モデル、および腎虚血再灌流モデルを用いた。小胞体に局在する Aqp11 は、それがノックアウトされると、小胞体を起源とする選択的な腎小胞体ストレスが生じる (引用文献)。また腎虚血再灌流についても、腎小胞体ストレスを発生させることが報告されている (引用文献)。モデル動物を用いた実験はすべて、宮崎大学動物実験委員会の承認後に実施した。

尿は 1000×g で 15 分間遠心し、尿沈渣を取り除いた後、尿中アミノ酸およびアミノ酸関連物質排泄量などを測定した。また、腎からは RNA を抽出して、マイクロアレイおよびリアルタイム PCR 解析を行った。さらに、腎のパラフィン切片を作成して、免疫組織化学を行った (引用文献)。

4. 研究成果

(1) ツニカマイシン (TM) 処置

TM をラットの腎包膜下に処置すると、TM 群において ER ストレスマーカータンパク質である GRP78 タンパク質の発現量の増加が確認された。このとき、尿中においてトレオニン、セリン、グルタミン、グリシン、アラニン、β-アラニンの増加が観察された。マイクロアレイ解析から、TM 群では、570 遺伝子が 2 倍以上有意に増加し、553 遺伝子が 0.5 倍以下に有意に減少していた。これら 1,123 遺伝子について遺伝子オントロジー解析を行ったところ、アミノ酸代謝のカテゴリーが最も有意なカテゴリーとして抽出された。また、排泄量が増加した 6 種類のアミノ酸を輸送するトランスポーターについては、SLC36、SLC38、SLC6、および amino acid transport regulator に属する分子の mRNA が有意に減少していた。SLC38、SLC6、および amino acid transport

regulator に属する分子についてはタンパク質発現量の減少も観察された。次に遺伝性 Fanconi 症候群の原因遺伝子 12 種類 (*Galt*, *Fah*, *Aldob*, *Ctns*, *Slc2a2*, *Ocr1*, *Clcn5*, *Atp7b*, *Vps33b*, *Hnf4a*, *Slc34a1*, *Ehhadh*) について着目したところ (引用文献)、7 種類の mRNA 発現量が TM 群において有意に減少していた。

(2) 腎虚血再灌流 (I/R) 処置

次に、腎においてアミノ酸再吸収が障害されることが知られている I/R モデルを作成し、(1)と同様の検討を行った。まず、I/R 群における GRP78 タンパク質発現量の増加を確認した。尿中アミノ酸解析の結果、I/R 群において 14 種類のアミノ酸の尿中排泄量が有意に増加し、そのうちトレオニン、セリン、グルタミン、グリシン、アラニンの 5 種類が TM 処置群と共通に増加していた。アミノ酸を輸送するトランスポーターについては、SLC36、SLC38、SLC6、amino acid transport regulator に属する分子の mRNA が有意に減少していた。そのうち 4 種類が TM 群と共通に減少していた。遺伝性 Fanconi 症候群の原因遺伝子では、8 種類の mRNA 発現量が I/R 群において有意に減少し、そのうち 6 種類が TM 群と共通に減少していた。

(3) Aqp11 ノックアウト動物

Aqp11 ノックアウト動物の腎で GRP78 遺伝子の発現量の増加を確認した後、アミノ酸を輸送するトランスポーターおよび遺伝性 Fanconi 症候群の原因遺伝子について調べた。その結果、amino acid transport regulator に属する分子および 1 種類の遺伝性 Fanconi 症候群の原因遺伝子 (原因遺伝子 A) の減少を観察した。

(4) 先天性 Fanconi 症候群

最後にイヌの先天性 Fanconi 症候群の腎組織を入手できたので、それを用いて、この組織で ER ストレスマーカーが変化しているかどうかを検討した。その結果、先天性 Fanconi 症候群の腎組織においても、我々がこれまでに発見してきた ER ストレスバイオマーカータンパク質の発現が変化していたことを確認した。

以上の知見を含めてこれまでの研究から、腎に小胞体ストレスが生じると Fanconi 症候群様症状、特にアミノ酸尿症が生じること、そしてそのメカニズムには少なくとも 2 種類の遺伝子が直接症状と結びついていること (図 1 参照) また、ER ストレスバイオマーカータンパク質が Fanconi 症候群の診断上有用であることなどが示唆された。

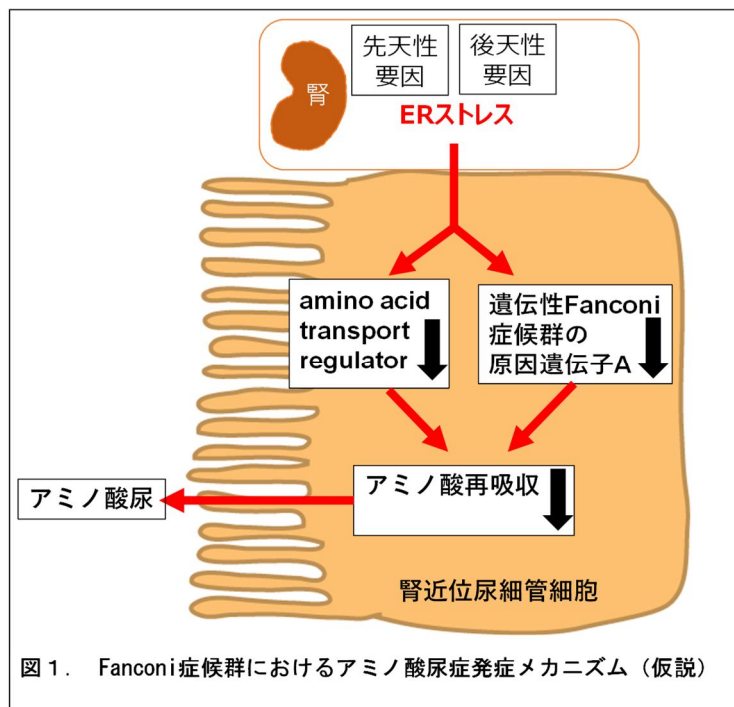


図 1. Fanconi 症候群におけるアミノ酸尿症発症メカニズム (仮説)

<引用文献>

Klootwijk ED, Reichold M, Unwin RJ, Kleta R, Warth R, Bockenhauer D. Renal Fanconi syndrome: taking a proximal look at the nephron. *Nephrol Dial Transplant* 30: 1456-1460, 2015.

Atochina-Vasserman EN, Biktasova A, Abramova E, Cheng DS, Polosukhin VV, Tanjore H, Takahashi S, Sonoda H, Foye L, Venkov C, Ryzhov SV, Novitskiy S, Shlonimskaya N, Ikeda M, Blackwell TS, Lawson WE, Gow AJ, Harris RC, Dikov MM, Tchekneva EE. Aquaporin 11 insufficiency modulates kidney susceptibility to oxidative stress. *Am J Physiol Renal Physiol* 304: F1295-F1307, 2013.

Yang JR, Yao FH, Zhang JG, Ji ZY, Li KL, Zhan J, Tong YN, Lin LR, He YN. Ischemia-reperfusion induces renal tubule pyroptosis via the CHOP-caspase-11 pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 306: F75-F84, 2014.

Asvapromtada S, Sonoda H, Kinouchi M, Oshikawa S, Takahashi S, Hoshino Y, Sinlapadeelardkul T, Yokota-Ikeda N, Matsuzaki T, Ikeda M. Characterization of urinary exosomal release of aquaporin-1 and -2 after renal ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 314: F584-F601, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ahmed, A., Sonoda, H., Kaito, A., Oshikawa-Hori, S., Fujimoto, N., Ikeda, M.	4. 巻 21
2. 論文標題 Decreased excretion of urinary exosomal aquaporin-2 in a puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4288
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21124288	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Sinlapadeelerdkul Thitaporn, Sonoda Hiroko, Uchida Kazuyuki, Kitahara Go, Ikeda Masahiro	4. 巻 81
2. 論文標題 Release of urinary aquaporin-2-bearing extracellular vesicles is decreased in pregnant Japanese Black cattle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1609 ~ 1615
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.19-0276	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Oshikawa-Hori Sayaka, Yokota-Ikeda Naoko, Sonoda Hiroko, Ikeda Masahiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Urinary extracellular vesicular release of aquaporins in patients with renal transplantation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Nephrology	6. 最初と最後の頁 216 ~ 216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12882-019-1398-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mikoda Nobuyuki, Sonoda Hiroko, Oshikawa Sayaka, Hoshino Yuya, Matsuzaki Toshiyuki, Ikeda Masahiro	4. 巻 7
2. 論文標題 A bell shaped pattern of urinary aquaporin 2 bearing extracellular vesicle release in an experimental model of nephronophthisis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e14092 ~ e14092
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.14092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sonoda Hiroko, Lee Byung Rho, Park Ki-Hoon, Nihalani Deepak, Yoon Je-Hyun, Ikeda Masahiro, Kwon Sang-Ho	4. 巻 9
2. 論文標題 miRNA profiling of urinary exosomes to assess the progression of acute kidney injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4692 ~ 4692
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40747-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 田中彩瑛, 園田紘子, 池田正浩
2. 発表標題 尿エクソソームRNA抽出方法の比較検討.
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷口仁基, 園田紘子, 平井卓哉, 松崎利行, 内田和幸, 池田正浩
2. 発表標題 イヌの正常およびFanconi症候群腎におけるaquaporinsの発現パターンの解析.
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮元伊織, 古賀萌子, 園田紘子, 星野雄也, 藤本成希, 池田正浩
2. 発表標題 小胞体ストレスに着目した腎性ファンコーニ症候群発症メカニズムの検討.
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ayaetanaka, Hiroko Sonoda, YuiSakaguchi, Masahiro Ikeda
2. 発表標題 Analysis of urinary exosomal RNAs after treatment of rats with an Nrf2 activator.
3. 学会等名 American Society of Nephrology. 54th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 星野雄也、園田紘子、三小田伸之、池田正浩
2. 発表標題 ネフロン癆モデル動物の腎病態におけるNADPH oxidase 2 の関与について
3. 学会等名 第71回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 園田 紘子、Byung Rho Lee、Ki-Hoon Park、Deepak Nihalani、Je-Hyun Yoon、Sang-Ho Kwon、池田 正浩
2. 発表標題 虚血性腎障害ラットにおける尿中細胞外小胞miRNAの網羅的解析
3. 学会等名 第13回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroko Sonoda, Tomonori Nakanishi, Tomoyuki Kabayama, Sayaka Oshikawa, Masahiro Ikeda
2. 発表標題 Decreased release of aquaporin-2 in urinary extracellular vesicles in rats subjected to allogenic kidney transplantation
3. 学会等名 Renal Week 2018, American Society of Nephrology. 52nd Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 園田紘子、シリーアサワプロンターダー、押川さやか、池田正浩
2. 発表標題 急性腎障害 - 慢性腎臓病 transitionモデルラットにおける尿中細胞外小胞アクアポリン1および2タンパク質放出パターンについての検討
3. 学会等名 第71回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Abdeen, A., Sonoda, H., Tanaka, A., Ikeda, M.	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer Nature Singapore Pte Ltd.	5. 総ページ数 373ページ. そのうち221ページ - 244ページを執筆.
3. 書名 Role of Exosomes in Biological Communication Systems	

1. 著者名 日本比較薬理学・毒性学会	4. 発行年 2021年
2. 出版社 近代出版	5. 総ページ数 304ページ. そのうち167ページ - 189ページを執筆.
3. 書名 獣医薬理学 第二版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------