

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22628

研究課題名（和文）腎臓病制御パスウェイのハイスループット探索

研究課題名（英文）High-throughput verification of pathways regulating kidney diseases

研究代表者

松阪 泰二（MATSUSAKA, Taiji）

東海大学・医学部・教授

研究者番号：50317749

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：腎臓病の時、腎臓の細胞で働く遺伝子に変動があり、それらが病気の進行に影響を与えている可能性がある。腎臓病での遺伝子の働きを調べるために、腎臓病モデルマウスの体内で、腎臓の細胞の任意の遺伝子を壊す簡便な方法の開発をめざした。そのため、遺伝子編集酵素を腎臓に発現するマウスを作成し、酵素を目的の遺伝子に導くRNAを腎臓の細胞へ運ぶキャリアタンパク質の開発を行った。キャリアタンパク質は、腎臓の細胞に取り込まれたが、完成にはさらなる改良が必要であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

期間内に達成できなかったが、核酸を特定の細胞に送り込む技術は、医学生物学研究を加速させる基盤技術となるし、治療薬としての利用が注目されている核酸の腎臓への送達技術は、臨床的にも重要である。今研究で明らかになった技術的問題の解決が望まれる。

研究成果の概要（英文）：Gene expression pattern is dynamically changed in kidney diseases. To study gene functions in kidney diseases, we aimed to develop a simple method to modify a specific gene in a mouse body with kidney disease. We generated mice in which the kidney expresses a gene-modifying enzyme and tried to develop a carrier protein that delivers guide RNA to kidney cells. The carrier protein is taken up into kidney cells, however further improvement is necessary to accomplish this project.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腎臓病 低分子抗体 ポドサイト ガイドRNA

1. 研究開始当初の背景

国民健康上・医療経済上大きな問題である慢性腎不全は、生後に再生しないポドサイト(たこ足細胞)の傷害が決定的な要因となっている。ポドサイトは、糸球体毛細血管を外側からおおい、濾過バリアとして機能する。ポドサイトの傷害は蛋白尿をおこし、その後の糸球体硬化症と腎臓全体の廃絶の原因であるが、それを阻止する有効な手段が存在しない。申請者等の開発した NEP25 マウスは、イムノトキシン LMB2 により選択的ポドサイト傷害が誘導され、進行性に糸球体硬化症を示す。ポドサイトの mRNA 解析から、傷害誘導初期に大規模な遺伝子発現変化が起こり、その中には傷害を助長してその後の糸球体硬化症の発症に関与するものがあると推察された。しかし、培養ポドサイトはほとんどの分化形質を欠失しているため、*in vitro* で個々の遺伝子の機能解析を行うことには限界があった。

CRISPR/Cas9 技術は、遺伝子改変マウスの作製を飛躍的に簡便にしたが、それでも flox マウスと Cre マウスや傷害モデルマウスとの交配に約 2 年の歳月が必要である。ポドサイトにおける遺伝子機能解析には、体細胞レベルでの遺伝子改変が望まれる。しかし、ポドサイトは、大分子の通過を阻止する糸球体基底膜により血流から隔絶されているため、ウイルスベクター等を用いて核酸を送達させる事が困難である。低分子抗体は、糸球体基底膜を通過可能なため、ポドサイトへの選択的薬剤送達の有効な手段である。この技術を応用して、体細胞レベルでのポドサイトの遺伝子改変技術の確立をめざす本計画が立案された。また、期間途中から、尿細管の遺伝子改変も試みられた。

2. 研究の目的

- (1) 低分子抗体を用い Cas9 発現トランスジェニックマウスのポドサイトへ gRNA を送達させ、マウス個体内でポドサイトの遺伝子変異を導入する技術を確認する。可能になれば、ポドサイトの傷害を進行させる候補遺伝子の機能解析を行なう。
- (2) 尿細管へ gRNA を送達させ、マウス個体内で尿細管の遺伝子変異を導入する技術を確認する。

3. 研究の方法

- (1) ポドサイト Cas9 発現マウス: Cre 依存的に EGFP と Cas9 を発現する ROSA26-Cas9 マウスを Jackson 研究所から入手し (Stock No 026556) ポドサイトで Cre を発現する Nephro-Cre マウス、Cre 依存性にリボソーム蛋白に HA tag が挿入される Ribotag マウス、ポドサイトに hCD25 を発現する NEP25 マウスと交配させた。
- (2) ポドサイトへ gRNA を送達させる担体: 抗 hCD25 scFv に K tag (MRHKGS) と His tag を連結させたもの (Mw 27.3) を大腸菌で合成し、Q-tag (LLQG)-polyR (X9)-HA tag の peptide (Mw 2.92) を transglutaminase 反応で結合させた。産物は、His trap カラムで精製した。
- (3) 尿細管 Cas9 発現マウス: ROSA26-Cas9 マウスを Six2-CreERT2 マウスと交配し、妊娠母マウスに tamoxifen を投与する事により、尿細管を含む全ネフロンに Cas9 を発現するマウスを得る事を目指した。
- (4) 尿細管への gRNA の送達: 陽性荷電小分子量タンパク質である protamine, lysozyme を担体として利用する方法、および腎盂から注入し electroporation をする方法を試みた。

4. 研究成果

(1) ポドサイト Cas9 発現マウス: NEP25/Nephro-Cre/ROSA26-Cas9/Ribotag マウスコロニーを樹立した。ROSA26-Cas9 と Ribotag に関しては、homozygote で維持した。蛍光顕微鏡観察によりポドサイトで EGFP が発現する事が確認された。Nephro の免疫染色を重ねると、EGFP の発現は 100%ではなく、糸球体により 50-100%と差があり、またマウス個体間でもほぼ 100%から低率 (<30%)と変動がある事がわかった。また、<5%のネフロンでは、ボーマン嚢や近位尿細管に EGFP 発現がリークしていた。マウスは Ribotag マウスの transgene をもつ

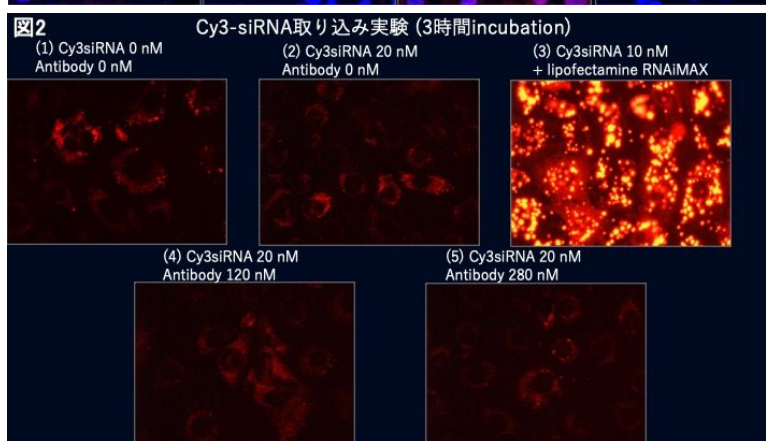
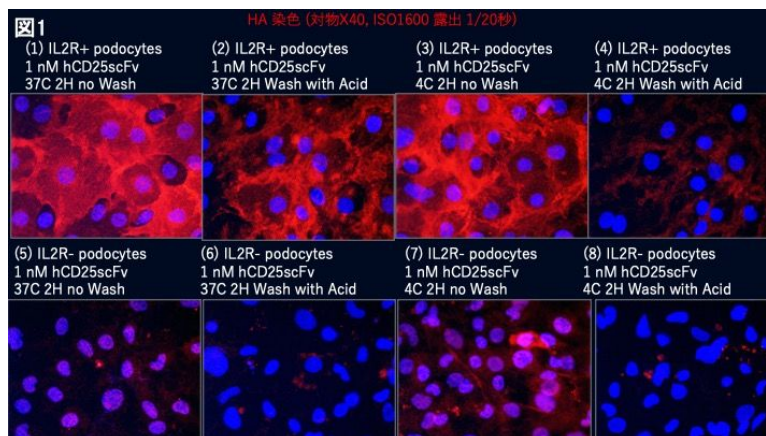
で、糸球体溶解物を抗 HA 抗体で免疫沈降する事により、ポドサイトのポリゾームを採取する事が可能である。これを利用して、ポドサイト RNA を採取して、定量 PCR をおこない、Cas9 mRNA がポドサイト選択的に強く濃縮されて発現する事が確認された。

次に、NEP25/Nephrin-Cre/ ROSA26-Cas9/Ribotag マウスから糸球体を採取・培養し、初代培養ポドサイトを得た。EGFP に対する crRNA を tracrRNA とともに、Lipofectamine RNAiMax でトランスフェクションすると、7日後に EGFP の発光は顕著に減弱した。細胞の DNA を採取し、T7E1 assay を行い、EGFP の遺伝子の変異が導入されている事を確認した。この細胞への変異の導入は、nephrin 遺伝子においても可能である事を確認した。これらの結果、樹立したマウスは、100%ではないもののほぼポドサイト選択的に Cas9 を発現し、gRNA が送達されさえすれば、かなりの効率で遺伝子変異の誘導が可能である事が示唆された。

(2) ポドサイトへ RNA 担体の開発: 当初担体の標的分子として内因性の Podoplanin を用いる計画であった。しかし、podoplanin への抗体の結合により、生物学的影響がポドサイトに及ぼされる事が否定できない事と、開発済みの低分子 podoplanin 低分子抗体が安定でない事から、使用するマウスがトランスジーンとしては発現する hCD25 を標的とする事に変更した。Ribotag/NEP25 マウスに抗 hCD25 抗体を投与して、ポドサイトの形質変化が起きない事を確認した。また、hCD25 に対する低分子抗体 scFv は、NEP25 マウスに傷害を誘発するイムノトキシン LMB2 の一部として十分な実績があった。RNA を静電結合させるために、陽性荷電アミノ酸を scFv に結合させる必要があったが、融合組み換えタンパク質として大腸菌で生成させると、溶出されてこないという問題が起こるため、poly arginine (R9)合成ペプチドを、組換 scFv に transglutaminase 反応で結合させるという方法で作成した。

ラットポドサイト細胞株 (C7)(図 1IL2R- podocyte)と C7 に IL2R (hCD25) 安定導入したもの (IL2R+ podocyte)を用いて、R9 連結 hCD25 scFv の取り込みを調べた (図 1)。IL2R 依存的に細胞に結合し、37C でインキュベーション後に酸で洗浄してもシグナルは消えず、4C では酸で洗浄される事から、細胞内に取り込まれている事が示された。次に、R9-hCD25scFv を Cy3-siRNA とインキュベーションの後、IL2R+ ポドサイトに添加した。様々な濃度比で試みたが、細胞内に Cy3 の取り込みを確認する事はできなかった (図 2)。hCD25 の高発現状態で検証するため、初代培養ポドサイトに hCD25 と GFP を一過性にトランスフェクションし、Cy5-siRNA で同様の実験を行ったが、細胞内に Cy5 が取り込まれる証拠が得られなかった。また、IL2R+ ポドサイトに Gapdh の siRNA を R9-hCD25scFv とともに添加したが、Gapdh mRNA は低下しなかった。また、NEP25/Nephrin-Cre/ ROSA26-Cas9/Ribotag マウスに、*Arhgef16* に対する gRNA と R9-hCD25scFv の混合物を静注し、糸球体を採取し、T7E1 アッセイを行ったが、遺伝子変異は確認できなかった。

このように、R9-hCD25scFv は hCD25+細胞に取り込まれたが、RNA を送達させるには、さらなる改良が必要と思われた。しかし、新型コロナウイルスのパンデミック等の影響のため、



実験が遅延したために、期間内に問題解決をする事ができなかった。

(3) 尿細管に Cas9 を発現するマウス: 当時別目的で飼育していた Six2-CreERT2 マウスと ROSA26-Cas9 マウスを交配した。Six2 は、胎生期の腎臓で維持されるネフロン前駆細胞で発現する転写因子で、Six2-CreERT2 マウスはネフロン前駆細胞に CreERT2 と EGFP を発現する。妊娠母マウスに tamoxifen を投与して、尿細管に Cas9 を発現するマウスを得る事をめざした。EGFP 発現は、tamoxifen 投与量に依存して増加したが、0.3 mg/g BW の tamoxifen の投与後では、仔マウスの多くは腹壁が破裂し、たとえ出産されても生育できなかった。試行錯誤の上、E10.5 と E11.5 に、tamoxifen を 0.2 mg/g BW、progesterone を 0.1 mg/g BW 経口投与し、E19.5 で帝王切開するという方法で、約 60%のマウスを生存させ、モザイク状ながらポドサイトから接合尿細管までのネフロン細胞の多くに、EGFP を発現させる事ができた。

(4) 尿細管へ RNA の送達: 陽性荷電し、分子量の小さい蛋白質である、protamine と lysozyme を担体として利用の可能性を検討した。FITC でラベルして、マウスに静脈内投与したところ、尿細管に効率よく取り込まれる事を確認した。また、Gel shift assay により RNA と結合する事を確認した。Cy3-siRNA と protamine あるいは lysozyme を混合し、マウスに投与した。蛍光顕微鏡で腎臓を観察したが、いずれの場合も、Cy3 のシグナルと検出する事はできなかった。

次に、腎臓へ直接注入し、electroporation をかける方法を試みた。腎盂から 34G 針 (ナノパスニードル) で溶液を注入しても大きな損傷がおこらない事を確認した。そこで、経腎盂的に Rhodamine-dextran(0.5 g/ml) を腎臓に注入し、腎門部にクリップをかけ、腎臓を電極ではさみ、electroporation した。これにより尿細管はかなり損傷されたが、50 v 100 msec を計 6 回の条件で、傷害は回復可能で、かつ尿細管に Rhodamine が取り込まれた。

この条件を用いて、tamoxifen 処理された Six2-CreERT2/ROSA26-Cas9 マウスに、市販の megalin に対する gRNA を注入し、electroporation をかけ、7 日後に腎臓を採取した。Megaline の免疫染色を行ったが、megaline を欠失した尿細管細胞を見出す事はできなかった。DNA を抽出し、T7E1 assay を行ったが、megaline 遺伝子の変異の証拠は得られなかった。

また市販の lipofection 試薬 TransIT QR hydrodynamic delivery solution を用いて、megaline gRNA を Six2-CreERT2/ROSA26-Cas9 マウスに iv してみたが、megaline の遺伝子変異は得られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 7件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Okabe M, Motojima M, Miyazaki Y, Pastan I, Yokoo T, Matsusaka T. | 4. 巻 316(2) |
| 2. 論文標題 Global polysome analysis of normal and injured podocytes | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Am J Physiol Renal Physiol | 6. 最初と最後の頁 F241-F252 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajprenal.00115.2018. | 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 |
| 1. 著者名 Sakai S, Yamamoto T, Takabatake Y, Takahashi A, Namba-Hamano T, Minami S, Fujimura R, Yonishi H, Matsuda J, Hesaka A, Matsui I, Matsusaka T, Niimura F, Yanagita M, Isaka Y. | 4. 巻 30(6) |
| 2. 論文標題 Proximal Tubule Autophagy Differs in Type 1 and 2 Diabetes | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 J Am Soc Nephrol | 6. 最初と最後の頁 929-945 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1681/ASN.2018100983. | 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 |
| 1. 著者名 Zoshima T, Hara S, Yamagishi M, Pastan I, Matsusaka T, Kawano M, Nagata M. | 4. 巻 9(1) |
| 2. 論文標題 Possible role of complement factor H in podocytes in clearing glomerular subendothelial immune complex deposits | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Sci Rep | 6. 最初と最後の頁 7857 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-44380-3. | 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 |
| 1. 著者名 Koizumi M, Ueda K, Niimura F, Nishiyama A, Yanagita M, Saito A, Pastan I, Fujita T, Fukagawa M, Matsusaka T. | 4. 巻 74(3) |
| 2. 論文標題 Podocyte Injury Augments Intrarenal Angiotensin II Generation and Sodium Retention in a Megalin-Dependent Manner | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Hypertension | 6. 最初と最後の頁 509-517 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12352. | 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 |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Matsuda J, Takahashi A, Takabatake Y, Sakai S, Minami S, Yamamoto T, Fujimura R, Namba-Hamano T, Yonishi H, Nakamura J, Kimura T, Kaimori JY, Matsui I, Takahashi M, Nakao M, Izumi Y, Bamba T, Matsusaka T, Niimura F, Yanagita M, Yoshimori T, Isaka Y. | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Metabolic effects of RUBCN/Rubicon deficiency in kidney proximal tubular epithelial cells | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Autophagy | 6. 最初と最後の頁 1-16 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627. | 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 |

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Fujimura R, Yamamoto T, Takabatake Y, Takahashi A, Namba-Hamano T, Minami S, Sakai S, Matsuda J, Hesaka A, Yonishi H, Nakamura J, Matsui I, Matsusaka T, Niimura F, Yanagita M, Isaka Y. | 4. 巻 S0006-291X(20) |
| 2. 論文標題 Autophagy protects kidney from phosphate-induced mitochondrial injury | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun | 6. 最初と最後の頁 30220-5 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.137. | 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 |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Ito N, Sakamoto K, Hikichi C, Matsusaka T, Nagata M. | 4. 巻 318(3) |
| 2. 論文標題 Biphasic MIF and SDF1 expression during podocyte injury promote CD44-mediated glomerular parietal cell migration in focal segmental glomerulosclerosis | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Am J Physiol Renal Physiol | 6. 最初と最後の頁 F741-F753 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajprenal.00414. | 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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yamamoto Kazuyoshi, Matsusaka Taiji |
| 2. 発表標題 P2X7 Expressed in Injured Podocytes May Spread the Kidney Injury Through Caspase 3 |
| 3. 学会等名 ASN Kidney Week (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tanaka Keiko, Matsusaka Taiji |
| 2. 発表標題 C-Type Lectin-Like Receptor (CLEC)-2, the Ligand of Podoplanin, Facilitates Motility of Podocytes |
| 3. 学会等名 ASN Kidney Week (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 UdagawaTomohiro, Matsusaka Taiji |
| 2. 発表標題 Kidney Organoid Model of Selective Podocyte Injury |
| 3. 学会等名 ASN Kidney Week (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Okabe Masahiro, Matsusaka Taiji |
| 2. 発表標題 Angiotensin II Receptor Blocker Blocks Spreading Podocyte Damage in a Partial Podocytectomy Model |
| 3. 学会等名 ASN Kidney Week (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔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 |
|-------|--|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 梅津 光央 (UMETSU Mitsuo) (70333846) | 東北大学・工学研究科・教授 (11301) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|