

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17247

研究課題名(和文)新規ヒト膜性腎症モデルの確立と病態機序解明-治療法開発をめざして-

研究課題名(英文) Establishment of a Novel Membranous Nephropathy Model and Investigation of Pathomechanisms - Toward Development of Treatment Strategy -

研究代表者

安田 圭子(Keiko, YASUDA)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：00836265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膜性腎症は長らく原因が不明で「特発性」と表現されてきたが、原因抗原として PLA2RおよびTHSD7A、EXT1/EXT2、NELL-1、Semaphorin3B、HTRA1とこれまでに合わせて6つの原因抗原が報告され、自己免疫疾患であることが明らかになった。このうち、THSD7Aに着目し、研究代表者らが新規に作成した THSD7A欠損マウスを用いて、抗体産生を誘導、さらに細胞移入の系を用いて、膜性腎症を惹起できることを確認した。この成果は、これまでに適切なマウスモデルがなかった膜性腎症において、病態解明の基盤構築に大きく寄与することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末期腎不全により、血液透析といった腎代替療法を要する患者は増加の一途をたどり、2020年末の日本透析学会の集計では慢性透析患者は33万6千人を超えている。透析療法の技術向上や、透析患者の死因となる心血管イベントの抑制としてCKD-MBD(Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder)という概念が確立され、透析導入後の生命予後が改善する一方で、透析導入を抑制、遅延する腎臓病の根本治療薬は依然としてない。今回、膜性腎症のマウスモデルを新規に確立した。病態を理解するための基盤構築を引き続き行い、病態の即した新規の治療法の開発を目指す。

研究成果の概要(英文)：Membranous nephropathy has long been described as "idiopathic" with no specific cause, but a total of six causative antigens have been reported, including PLA2R, THSD7A, EXT1/EXT2, NELL-1, Semaphorin3B, and HTRA1, and it is now clear that it is an autoimmune disease. Focusing on THSD7A, the researchers induced antibody production in THSD7A-deficient mice, and confirmed that THSD7A auto antibodies can induce membranous nephropathy using a cell transfer system. This achievement is expected to contribute greatly to the establishment of a basis for investigating the pathogenesis of membranous nephropathy, for which there has been no appropriate mouse model to date.

研究分野：免疫学

キーワード：自己免疫疾患 膜性腎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膜性腎症は、成人ネフローゼ症候群の中で最も頻度が高く、一部は難治性で末期腎不全の原因となる。現在の腎代替療法(血液透析、腹膜透析、腎移植)に加えて、iPS細胞などをもとにした腎臓再生が今後の新規治療法として期待される。その一方で、腎疾患の病態を解明し、末期腎不全への進行を抑制する治療アプローチの重要性は変わらない。近年、複数の原因抗原が報告され、これらに対する自己抗体が腎臓上皮細胞であるポドサイトに沈着することで「基底膜の肥厚」を伴う高度蛋白尿を呈する自己免疫疾患であることが明らかとなった。

2. 研究の目的

膜性腎症の治療として、ステロイドや免疫抑制剤が使用されるが、特異的な治療ではなく、また抗 CD20 抗体による B 細胞を標的とした治療に関しても根治療法かどうかという点において議論の余地が残る。そこで、病態特異的な治療法を開発する目的で基盤となる、病態を理解するためのマウスモデルの確立を進めた。依然として、膜性腎症の適切なマウスモデルは乏しい。原因抗原として最も頻度の高い PLA2R はマウスではヒトと発現部位が異なり、ポドサイトではなくメサンギウム細胞に発現しているため、マウスモデルの確立は困難で、持続的な蛋白尿を認める系の作成に成功していない。THSD7A はヒトと同様にマウスのポドサイトに発現していることから、本研究では THSD7A に焦点をあてて膜性腎症の病態解明を目指す。

3. 研究の方法

1) THSD7A 欠損マウス作製および THSD7A 発現細胞株による THSD7A の機能解明

THSD7A 欠損マウスはこれまでに作成されておらず、報告がない。そのため、生体内での THSD7A の機能の詳細は明らかではない。

生体内での THSD7A の機能解析および抗体産生の系を構築する 2 つの目的で、CRISPR-Cas7 システムを用いて新規に THSD7A 欠損マウスを作製した。

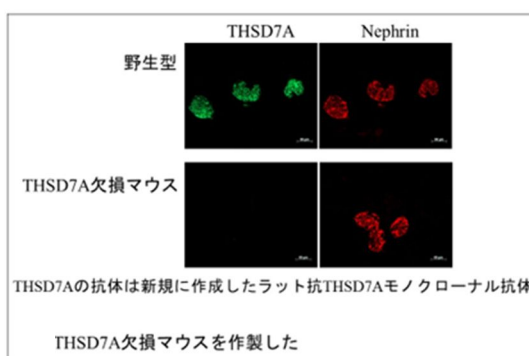
2) 新規膜性腎症マウスモデルの確立と病態機序の解明

まず、野生型マウスに THSD7A 蛋白をアジュバントとともに免疫したが、追加免疫を行っても自己抗体の産生誘導ができなかった。そのため、抗体産生を誘導するために上記の遺伝子欠損マウスを用いることとした。このマウス自身は、ポドサイトに THSD7A を発現していないため、抗体誘導にても腎症を発症しない。そこで、遺伝的に T 細胞および B 細胞を欠損する Rag2 欠損マウスに、抗体産生を誘導した THSD7A 欠損マウスの(抗体産生に寄与する)T 細胞および B 細胞を移入し、移入先のマウスにおいて腎症の誘導を起こすことでマウスモデルを確立する実験系を予定した。

4. 研究成果

1) THSD7A 欠損マウス作製および THSD7A 発現細胞株による THSD7A の機能解明

新規に THSD7A 欠損マウス(C57BL/6)を作製した。(右図)また、これらのマウスの 6 か月齢、12 か月齢での腎臓病理組織(電子顕微鏡での観察、HE、PAS 染色)の観察を行った。このマウスは、6 か月齢の時点で明らかな腎機能障害および組織学的変化を認めなかった。さらに 12 か月齢の時点では、基底膜の不整化、肥厚を認めたものの、程度は軽微であった。加えて、血清生化学的検査、検尿を行った。その結果、明らかな腎機能障害を認めず、蛋白尿も認めなかった。また、THSD7A 発現細胞株を用いて、機能の評価を行った。



2) 新規膜性腎症マウスモデルの確立と病態機序の解明

クローニングした THSD7A 配列を含むベクターを用いて THSD7A リコンビナント蛋白を精製した。野生型マウスへの免疫では抗体産生を認めなかったことから、THSD7A 欠損マウスに免疫することで抗体を産生する系を構築した。このプロトコールの検討を行い、追加免疫を行うことで十分な抗体産生誘導を確認した。上述の通り、THSD7A 欠損マウス自身は、抗 THSD7A 抗体産生後も(THSD7A 発現がないので)ポドサイトへの抗体沈着は起こさず、疾患を惹起しない。そのため、免疫後の THSD7A 欠損マウスの T 細胞と B 細胞を遺伝的に T 細胞、B 細胞を欠損する Rag2 欠損マウスに移入し、この Rag2 欠損マウスで持続的に抗体を産生させることで膜性腎症を誘導する方針とした。また、条件検討として我々が作製した抗 THSD7A 抗体を野生型のマウスに経静脈的に投与した結果、マウス系統 A において強く蛋白尿を認めたことから、THSD7A 欠損マウス(C57BL/6)を系統 A に戻し交配する方針に変更した。THSD7A 欠損マウスおよび Rag2

欠損マウスに関して、既に10世代分の戻し交配を終えている。これに伴い、1) に関して、この系統 A の THSD7A 欠損マウスの解析を追加している。

系統 A のマウスを用いた抗体産生および細胞移入の系により、移入先の Rag2 欠損マウスにおいて膜性腎症を誘導できることを確認した。この際、Rag2 欠損マウスにおいて、移入後、長期間にわたり抗体産生が持続した。ここまでの結果から、膜性腎症マウスモデルの系を立ち上げることに成功したが、蛋白尿の誘導が非常に緩徐であったため、現在、さらに強く疾患誘導させるための改善プロトコールの条件検討を追加している。

また、引き続き、腎機能、尿蛋白の推移の評価、病理組織学的評価を順次予定している。

さらに、この新規の系を用いて、病態機序の解明を行うために、腎臓の糸球体の構成成分であるポドサイト、メサンギウムを表面蛋白をマーカーとしてセルソーターを用いて単離し、それぞれの mRNA 発現プロファイルを RNA-seq で調べることにした。まず、既報をもとに磁気ビーズを用いて糸球体を単離し、その後さらに酵素処理を加えて single cell suspension を行うプロトコールを確立した。上記、蛋白尿の誘導は緩徐ではあったが、病理組織学的にも膜性腎症といえる基底膜の肥厚を伴う腎症を惹起することができたので、その系において、腎臓のポドサイト、メサンギウム細胞を回収した。引き続き、RNA-seq の解析を進め、病態の理解および治療のターゲットとなるような分子の検索を行う。また、この網羅的検索をポドサイトだけでなく、メサンギウム細胞も加えて行うことで、相互関係を含め、より多層的に病態を理解することを目標とする。また、蛋白尿が出始めた病態初期から、慢性期にかけてそれぞれの細胞の変化を追うことで、より深い理解が可能となるため、追加での検討を重ねる。

少しずつ検討を重ねた結果、当初予定していた系を糸球体病変に感受性の高いマウス系統で実施する必要があることが明らかになったため、スケジュールに大幅な遅れが生じた。しかしながら、同時にこの点がこれまでにマウスモデルの確立が困難であった一因であったものと考えた。この部分を解消したものと考えられたため、引き続き、疾患特異的な病態を理解することを目標に研究の継続を予定している。

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〕

〔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
---------	---------