

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 7 月 30 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500508

研究課題名(和文)新規シスチン蓄積症モデルラットの樹立とHPLC法による高感度診断法の開発

研究課題名(英文)Establishment of a novel rat model for cystinosis

研究代表者

岡村 匡史 (OKAMURA, TADASHI)

独立行政法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：00333790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：常染色体劣性遺伝疾患であるシスチン蓄積症(シスチノーシス)は、シスチン輸送体であるシスチノシン遺伝子の変異により全身性にシスチンが蓄積し、最も重篤な乳児型は腎障害が特徴的である。本研究では、ラットにおいてシスチノシン遺伝子変異を同定し、新たなシスチン蓄積症モデルラットを開発した。さらに、高速クロマトグラフィー(HPLC)によるシスチン分析法を開発し、より簡便で迅速な高感度診断法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Cystinosis is a rare lysosomal storage disease characterized by the abnormal accumulation of cysteine in various organs. Accumulation of cysteine in all tissues eventually leads to multisystemic disease. The causative gene, CTNS, encodes cystinosin, the lysosomal cysteine transporter. We identified a 13-bp deletion within Ctns gene in LEA rat, and have established a congenic strain carrying mutant Ctns gene from LEA rat on F344 genetic background. We also developed a simple and rapid method for determination of cysteine using HPLC to evaluate its accumulation in cells and tissues. The congenic rats lacking the function of Ctns is expected to be a useful for model animal of understanding cystinosis.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：疾患モデル シスチン蓄積症 シスチノーシス リソソーム蓄積症 HPLC

## 1. 研究開始当初の背景

シスチン蓄積症は、近位尿細管障害により再吸収されるはずのリン酸、ブドウ糖、尿酸およびアミノ酸が漏出するファンコニー症候群の原因の一つであり、シスチントランスポーターであるシスチノシン (CTNS) 遺伝子変異によりシスチン (システインは容易に酸化されて2量体のシスチンとなる) が連続的にリソソームに蓄積する。欧米では10~20万人に1人の割合で発症し、最も重篤な乳児型のシスチン蓄積症では腎障害、特に腎尿細管症が特徴的である。シスチン蓄積症は厚生労働省が指定した小児慢性特定疾患の1つであり、現在のところ乳児型シスチン蓄積症に対する治療は経口薬であるシステアミンを用いた治療が主であるが、日本においては未承認である。システアミンの投与は投与開始年齢が早いと腎障害の進行を遅延できる一方で、投与開始年齢が遅いと治療効果が弱くなることが報告されていることから、早期診断・治療により腎障害の進行を遅延することが唯一の方法となる。

我々はインスリン分泌不全型糖尿病モデルである LEA ラットの原因遺伝子を解析する過程で、偶然 LEA ラットの *Ctns* 遺伝子に13塩基の欠損があることを見出し、LEA ラットはシスチン蓄積症の有用なモデルとなると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、有効な診断および治療法の開発が遅れているシスチン蓄積症の新たなモデルラットを開発し、HPLCによるシスチン分析法を確立することで、簡便で迅速な高感度診断法を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) スピードコンジェニック法によるコンジェニック系統の樹立

LEA ラットを F344 系統に戻し交配し、各世代の産仔から DNA を抽出した。各染色体にはほぼ等間隔に設置した149個のマイクロサテライトマーカーを用いて遺伝子型判定を行い、最も組換え率の高い個体を選抜した。

### (2) HPLCによるシスチン分析

ラットの各組織を生理食塩水でホモジナイズし、5%TCAにて除タンパク後、ヘキサミンにて脱脂・抽出した。抽出液を定容後、pH調節し臓器抽出液とした。臓器抽出液をNBD-F誘導体化し、HPLC (Prominence、島津製作所) を用いてシスチンの分析を行った。条件検討には CAPCELL PAK C18 type:MGII 2.0mmI.D×250mm (資生堂) と Nucleonavi 1.0mmI.D.×250mm (資生堂) の2種類のカラムを用いた。MGIIはカラム温度を35、40、

45度、アセトニトリル濃度を30、35、40%、流速300μl/minで分析条件の検討を行った。Nucleonaviはカラム温度を35、40、45度、アセトニトリル濃度を20、22.5、25%、流速100μl/minで分析条件の検討を行った。

### (3) 病理学的解析

ラットの各組織を10%中性緩衝ホルマリンで固定後、常法に従いパラフィン包埋した。薄切した切片は、脱パラフィン後ヘマトキシリン-エオジン (HE) およびマッソン・トリクローム染色を施した。

### (4) ダイナミック CT法を用いた腎機能評価

ダイナミック CTは急速に造影剤を静注し同一部位を連続的に撮影することで、血管性病変や腫瘍性病変の診断に用いられている。麻酔下のラット頸静脈から、造影剤 (1200mg/kg, オイパミロン300、富士製薬) を急速注入し、X線CT装置 (LCT100、日立アロカメディカル) を用いて、CT画像1枚あたり6.5秒の速度で腎臓を反復撮影した。腎臓全体をROI設定し、得られた平均CT値を用いて腎排泄量を定量した。

### (5) シスチン蓄積症モデルラットのラット胎児線維芽細胞 (REF) の作製

*in vitro* で、シスチン蓄積症の治療薬であるシステアミンの効果を測定するため、ラット胎児由来線維芽細胞 (Rat Embryonic Fibroblast; REF) を作製した。妊娠16日目の妊娠シスチン蓄積症モデルラットの子宮から胎児を摘出し、常法に従い胎児由来線維芽細胞を作製した。2×10<sup>6</sup>程度のREFに1mMのシステアミンを添加し、24時間培養後に回収したREFをHPLCにてシスチン測定を行った。

すべての動物実験は、国立国際医療研究センター動物実験委員会の承認後、“国立国際医療研究センター動物実験等に関する規則”に従って行われた。

## 4. 研究成果

### (1) 新規シスチン蓄積症モデルラットの樹立

*Ctns* 遺伝子変異を有する LEA ラットを F344 ラットに戻し交配し、スピードコンジェニック法により、*Ctns* 遺伝子変異を導入したコンジェニックラットを作製した。F344 ラットと LEA ラットを交配して F1 世代を作出した後、F344 ラットに7回戻し交配し、LEA ラットの *Ctns* 変異を含む Ctns-d10rat80(1MB) を F344 ラットに導入した。149個のマイクロサテライトマーカーを用い、D/R比が0%になった N9 世代まで戻し交配を行った。さらに N9 世代同士を交配し、*Ctns*

変異ホモ欠損ラットを樹立した。LEA ラットは、耐糖能異常とともに、D-アミノ酸酸化酵素欠損 (Konno. R., Okamura T. et. al, 2009) を有しており、遺伝子変異を複数有する LEA ラットは、シスチン蓄積症モデルラットとして、必ずしも適切ではなかった。そのため、近交系である F344 ラットに、*Ctns* 遺伝子変異を導入したコンジェニックラット (F344-*Ctns*(-/-)) は、新たなシスチン蓄積症モデルラットとして、有用である。

### (2) HPLC を用いた高感度シスチン分析法の開発

アミノ酸の分析には多くの方法があり、どの方法を選ぶかは測定対象物に依存する。我々は 7-フルオロ-4-ニトロベンゼン-2-オキサ-1,3-ジアゾール (NBD-F) で誘導体化したアミノ酸を逆相 HPLC で分離し蛍光で検出する NBD-F プレカラム誘導体化法を用いた。CAPCELL PAK C18 type:MGII を用いた検討では、アセトニトリル 35% TFA 0.05% 水溶液、流速 300 $\mu$ l/min で最適条件を得た。しかしながら測定対象物であるシスチンは酸化還元力が高いため、MGII を用いた分析ではシスチンピークのテーリングがみられたことから、より定量性がよいカラムを用いた分析条件の検討を行った。Nucleonavi はメタルフリーのガラスクラッドロッドカラムであり、条件検討を行った結果、カラム温度 40 度、アセトニトリル濃度 22.5% TFA 0.05% 水溶液、流速 100 $\mu$ l/min が最適条件となり、この条件下でシスチンの測定を行った。

次に、24 週齢、52 週齢 LEA ラットの肝臓、腎臓、心臓、肺、筋肉、脳、眼球および脾臓におけるシスチン量を測定した。その結果、24 週齢ではコントロールラットと比較して、それぞれ 8.8 倍、0.9 倍、2.1 倍、1.4 倍、6.0 倍、1.4 倍、6.3 倍および 61.2 倍のシスチンが蓄積していた。52 週齢ではそれぞれ 12.1 倍、3.9 倍、84.9 倍、9.3 倍、29.2 倍、1.8 倍、80.8 倍および 452.7 倍となり、測定したすべての臓器において 24 週齢と比較して高値を示し、週齢を重ねるごとにシスチンが蓄積していた。

### (3) ダイナミック CT 法を用いたシスチン蓄積症診断への応用

シスチン蓄積症は腎障害が最も重篤な症状であり、腎機能評価が新たな治療薬の開発には必須のパラメーターとなる。ダイナミック CT は造影剤を急速に静脈内に投与し、同一部位を連続的に撮影することで血管性病変や腫瘍性病変の診断に用いられている。腎尿細管上皮細胞が特異的に変性している LEA ラット腎臓をダイナミック CT 法で撮影した結果、コントロールと比較し、CT 値のピーク時間は変わらないものの、ピーク時の最大 CT 値が約 15% 有意に低下し

ていた (図 1)。ダイナミック CT 法は経時的に腎機能を評価できるため、シスチン蓄積症における腎機能評価に有用である可能性が示された。

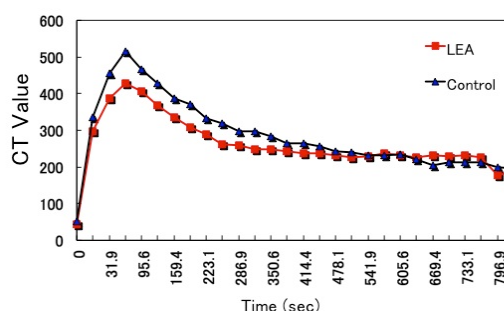


図 1. ダイナミック CT 法による腎機能評価

### (4) 新規シスチン蓄積症モデルラットの評価

HPLC を用いた高感度シスチン分析法により、新規シスチン蓄積症モデルラット F344-*Ctns*(-/-) 各組織のシスチン量を定量した。その結果、40 週齢の F344-*Ctns*(-/-) ラット腎臓、脾臓および精巣において、コントロールと比較して、それぞれ約 4 倍、約 150 倍および約 300 倍のシスチン蓄積が確認された。

シスチン蓄積症は、腎尿細管病変が特徴的であるため、40 週齢の F344-*Ctns*(-/-) ラット腎臓の病理組織学的解析を行った。F344-*Ctns*(-/-) ラット腎臓では、LEA ラット同様、尿細管上皮細胞の変性・脱落が顕著であり、部分的に細胞が脱落していた (図 2)。さらに、尿細管上皮細胞基底膜の肥厚が広範囲に観察された。

さらに、シスチン蓄積症モデルラットとしての有用性を評価するために、F344-*Ctns*(-/-) から樹立した REF に、システアミンを添加し、細胞内のシスチン量を定量した結果、シスチン濃度は検出限界以下まで減少した (図 3)。

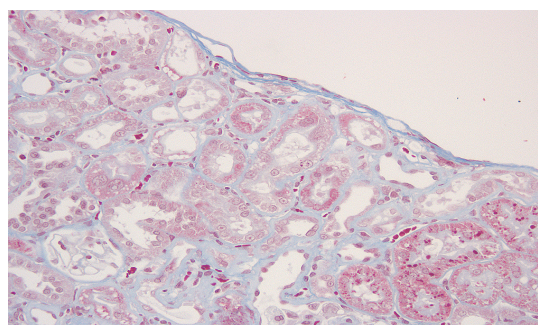


図 2. 40 週齢 F344-*Ctns*(-/-) ラット腎臓皮質のマッソン・トリクローム染色

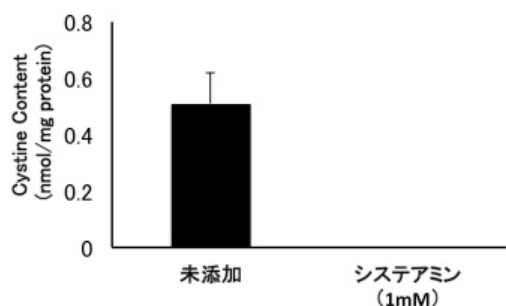


図3. F344-Ctns(-/-)ラット REF を用いた治療薬効果の検討

以上、本研究により、希少疾患であるシスチン蓄積症の新たなシスチン蓄積症モデルラットおよび HPLC による高感度分析法が開発され、*in vitro* および *in vivo* で新たな治療薬の探索が可能となった。

#### 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 3 件)

- ① Okamura, T., Pei, XY., Miyoshi, I., Shimizu, Y., Takanashi-Yanobu, R., Mototani, Y., Takao Kanai, T., Satoh, J., Kimura, N. and Kasai, N. Phenotypic Characterization of LEA Rat: A New Rat Model of Nonobese Type 2 Diabetes. *J Diabetes Res.* 986462(2013)  
doi: 10.1155/2013/986462、査読有
- ② \*Okamura T., \*Yanobu-Takanashi R, Takeuchi F, Isono M, Akiyama K, Shimizu Y, Goto M, Liang Y-Q, Yamamoto K, Katsuya T, Fujioka A, Ohnaka K, Takayanagi R, Ogihara T, Yamori Y, Kato N. Deletion of CDKAL1 Affects High-Fat Diet-Induced Fat Accumulation and Glucose-Stimulated Insulin Secretion in Mice, Indicating Relevance to Diabetes. *PLoS One.* 7, e49055 (2012) \*The authors equally contributed to this work. doi: 10.1371/journal.pone.0049055、査読有
- ③ Miyoshi, Y., Hamase, K., Okamura, T., Konno, R., Kasai, N., Tojo, Y. and Zaitso, K. Simultaneous two-dimensional HPLC determination of free d-serine and d-alanine in the brain and periphery of mutant rats lacking d-amino-acid oxidase. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 879, 3184-3189 (2011)  
doi: 10.1016/j.jchromb.2010.08.024.  
査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 清水有紀子他 新規シスチン蓄積症モデルラットの樹立、第 61 回日本実験動物科学技術 2014、札幌、2014 年 5 月
- ② 高梨理絵子他 2 型糖尿病感受性遺伝子 Cdkal1 の糖代謝における機能解析 第 60 回日本実験動物学会総会、つくば、2013 年 5 月
- ③ 清水有紀子他 一体型多孔性シリカカラムを用いたシスチン定量法の開発とシスチン蓄積症モデルラットへの応用、第 59 回日本実験動物学会総会、大分、2012 年 5 月

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.rincgm.jp/department/lab/08/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 匡史 (TADASHI OKAMURA)

(独) 国立国際医療研究センター研究所・

ヒト型動物開発研究室・室長

研究者番号：00333790

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

清水 有紀子 (YUKIKO SHIMIZU)

(独) 国立国際医療研究センター研究所・

動物実験施設・技術職員

研究者番号：00469983