

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659499

研究課題名(和文)コンディショナルノックアウトマウスを用いた蛋白尿発症機序の解明

研究課題名(英文)clarification of the mechanism of proteinuria with conditional knockout mice

研究代表者

綾 邦彦(KUNIHICO, AYA)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：20379762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白尿発症機序を明らかにするために、2009-2011年の基盤研究Cでは糸球体上皮細胞(ポドサイト)に発現し、ポドシン蛋白に結合する輸送蛋白を同定した。この輸送蛋白のin vivoにおける機能を確認するために、今回はポドサイト特異的コンディショナルノックアウトマウスを作成し、尿蛋白 尿潜血などにつき、検討を開始した。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanism of proteinuria, we identified the transport protein which binds to podocin and expresses in podocyte on previous grant-in-aid. We made podocyte-specific conditional knockout mice to examine the in-vivo function of this molecule and start analysis on this grant-in-aid.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

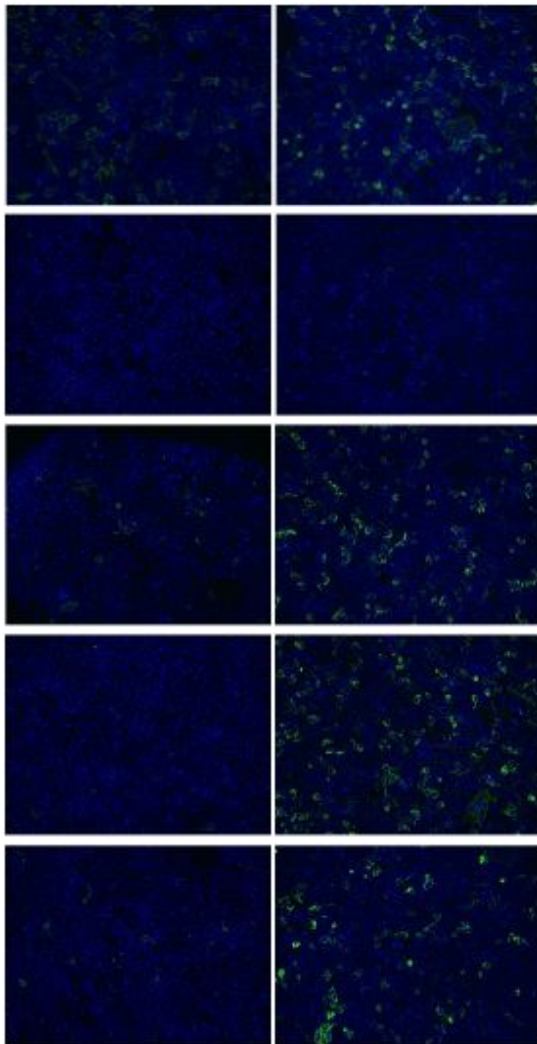
キーワード：蛋白尿 細胞内輸送 ポドシン ネフリン 腎炎 ネフローゼ ポドサイト 輸送蛋白

1. 研究開始当初の背景

1998 年以降、先天性（遺伝性）ネフローゼ症候群の原因遺伝子（蛋白）として、NPHS1(蛋白ネフリン)NPHS2(蛋白ポドシン)などが同定された。

これらはポドサイトのスリット膜構成蛋白としてだけでなく、細胞骨格やアポトーシスを制御するシグナル蛋白と考えられており、これらの蛋白が細胞膜に存在してはじめてこれらの機能が果たせることから、これらの蛋白の細胞膜への輸送は重要である。

先天性（遺伝性）ネフローゼ症候群症例でみつかった遺伝子異常により、ネフリンやポドシンの細胞膜への輸送障害がおこることが *in vitro* で示されている。



我々が日本人先天性ネフローゼ症候群症例で同定した NPHS1 遺伝子変異をもつプラスミドを細胞で発現させた場合でも左図のようになった。

左列は triton X-100 を使用せずにネフリン蛋白を抗体で染めたもので主に細胞外に発現しているネフリンが染まっていると考えられる。右列は triton X-100 を使用し細胞膜を障害した後にネフリン蛋白を抗体で染めたもので細胞内外どちらに発現したネフリンも染まっていると考えられる。最上段は、野生型ネフリンを発現している細胞で、ネフリンが細胞外にもよく発現している。2 段目は NPHS1 遺伝子自体が入っていない空のプラスミドを発現させた細胞でどちらも染まっていない。3 4 5 段は、異常ネフリンを発現している細胞で、細胞外に発現しているネフリンが少ない。

このことから日本人でみつかった遺伝子異常でも、細胞膜へのネフリンの輸送が障害されていることがわかる。

しかしながら、ネフリンやポドシンの輸送機序そのものはわかっていない。

また、ステロイド抵抗性ネ症患者の遺伝子解析を行うと欧州では NPHS2 遺伝子異常保有率が高いが、日本と韓国の家族集積性のある 15 家系の解析や他の日本人患者の解析結果によると、日本ではほとんど遺伝子異常がない。逆に言えば、日本人のステロイド抵抗性ネ症症例中には原因遺伝子の不明なものが多く、これにかわる原因遺伝子の探索も重要である。

我々は、免疫沈降法、質量分析法を利用してポドシンに結合する輸送蛋白を同定し、免疫組織染色でこの蛋白がポドサイトに存在することを示した。siRNA で発現を抑制したところ、遺伝子導入により発現させたポドシンの細胞膜での発現が低下し 細胞形態の

変化も伴った。

2. 研究の目的

この輸送蛋白は、ポドシンの細胞膜への輸送に関係すると考えられ、in vitro の実験によって示唆された機能を in vivo で確かめることが目的である。

3. 研究の方法

この輸送蛋白の F1 ヘテロマウスを作成し、このマウスから Neo カセット FLP カセットを除去し、この輸送蛋白の flox ヘテロマウスを作成した。

これとポドシンのプロモーターを有しポドサイト特異的に Cre を発現する B6.Cg-Tg(NPHS2-cre)295Lbh/J を購入してかけ合わせ、ポドサイト特異的なヘテロ欠損マウスを作成した。

これを使用してポドサイト特異的なホモ欠損マウスを作成した。

4. 研究成果

6週齢のポドサイト特異的なヘテロ欠損マウスを代謝ゲージにて蓄尿し、尿中総蛋白 アルブミン クレアチンを測定し、尿潜血もチェックしたが、有意な所見はえられなかった。

このマウスを解剖し、腎組織について検討を行ったが、有意な病理変化をおこしていなかった。

6-7週齢と14-15週齢のホモ欠損マウスに関しても同様に、代謝ゲージにて蓄尿し、尿中総蛋白 アルブミン クレアチンを測定し、尿潜血もチェックしたが、現時点までの検討では、いずれにおいても有意な所見は

えられていない。

高齢のホモ欠損マウスに関しても同様に、代謝ゲージにて蓄尿し、尿中総蛋白 アルブミン クレアチンを測定し、尿潜血もチェックする予定である。

胎児マウスについては、組織の一部をジェノタイピングに用いて、発生段階の腎組織について検討を行うことを計画している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Miyai T Aya K et al. Functional analysis of NPHS1 mutations in Japanese patients Histol Histopathol 査読あり 29(2) 2014 279-284

綾邦彦 宮井貴之 遺伝性ネフローゼ症候群原因分子の解析 annual review 腎臓 査読なし 2013巻 2013 118-124

綾邦彦 先天性ネフローゼ症候群 腎と透析 査読なし 72巻増刊 2012 271-274

〔学会発表〕(計2件)

宮原宏幸 綾邦彦他 ポドシンの輸送システムの探索 日本小児腎臓病学会 2012.6.29-30 東京

綾邦彦他 ポドシン細胞内輸送システムの探索 日本腎臓病学会 2012.6.1-3 横浜

〔図書〕(計1件)

綾邦彦 南山堂 臨床腎臓内科学を分担執筆 2013 1051(726-730)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

綾 邦彦(AYA KUNIHICO)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号:20379762

(2)研究分担者

大内田 守(OUCHIDA MAMORU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号:80213635