

北里大学大学院獣医学系研究科

博士課程学位論文審査の結果と最終試験の成績

2024年2月15日

学位論文題目

慢性腎臓病の病態解明に向けた新規ポドサイト障害モデルマウスの開発

氏名 渡邊 正輝 所属 獣医学専攻 実験動物学

審査委員 主査 北里大学 教授 折野 宏一



副査 北里大学 教授 吉岡 一機



副査 北里大学 准教授 岩井 聡美



副査 鹿児島大学 教授 浅野 淳



副査 茨城大学 教授 鈴木 穂高








審査の結果

合格

最終試験の成績

優

最終試験の結果の 要旨および担当者






学位申請者	渡邊 正輝 (DV21006 実験動物学)				
学位論文題目	慢性腎臓病の病態解明に向けた新規ポドサイト障害モデルマウスの開発				
担当者	主査	北里大学	教授	折野 宏一	
	副査	北里大学	教授	吉岡 一機	
	副査	北里大学	准教授	岩井 聡美	
	副査	鹿児島大学	教授	浅野 淳	
	副査	茨城大学	教授	鈴木 穂高	

成績：優

最終試験の結果の要旨

審査員一同は、論文提出者に対し、2024年2月15日、その論文内容および関連事項について詳細な質疑を行った。その結果、論文提出者は博士（獣医学）の学位を受けるに相応しい学識と能力を有するものと認め、優と判定した。

論文審査の要旨および担当者

学位申請者	渡邊 正輝 (DV21006 実験動物学)				
学位論文題目	慢性腎臓病の病態解明に向けた新規ポドサイト障害モデルマウスの開発				
担当者	主査	北里大学	教授	折野 宏一	
	副査	北里大学	教授	吉岡 一機	
	副査	北里大学	准教授	岩井 聡美	
	副査	鹿児島大学	教授	浅野 淳	
	副査	茨城大学	教授	鈴木 穂高	

論文審査の要旨

慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease : CKD) は、多様な原疾患により生じ、腎臓の機能および構造が長期にわたり不可逆的に変化する疾患である。CKD は、2020 年における全世界の死因として 8 位にランクされている。また、2040 年には全世界の死因の 5 位にランクが上昇することが予測されており、国際的な問題となっている。CKD は、腎機能の低下を示す指標である糸球体濾過量の減少並びに尿タンパク量の上昇が認められ、いずれも 3 ヶ月以上続く状態を示す。末期腎不全に至ると腎移植や生涯にわたる透析といった腎置換療法が必要となる。さらに、CKD は心臓病、糖尿病、高血圧といった基礎疾患と密接に関連しているため、健康上の問題に加え医療費面からも解決を迫られる重要な疾患であるが、現時点で根治的な治療法は確立されていない。CKD の初期段階には原疾患特異的な病態を呈するが、糸球体障害に続くタンパク尿、尿細管障害、腎間質線維化は共通の病態として経過する。糸球体は、ボーマン囊に包まれる毛細血管から成り、循環血液の選択的ろ過を行う高度な機能を有する小器官である。糸

球体毛細血管壁は、血管内皮細胞、基底膜および糸球体上皮細胞（ポドサイト）によって構成されている。ポドサイトは、隣接するポドサイトの足突起との間にスリット膜を形成することで、血液の濾過バリアーとして機能している。スリット膜構造の機能不全を伴うポドサイト障害ではタンパク尿が生じるが、ポドサイトは再性能を持たず、腎機能は進行的に低下する。このため、ポドサイト障害の軽減は腎疾患治療において極めて重要であり、治療法の開発や病態メカニズムの解明にはヒトのポドサイト障害を再現するモデル動物の確立が必要となる。そこで、本研究では、CKD の治療法の開発および病態メカニズムの解明を目的として、新規ポドサイト障害モデルマウスを開発した。

第1章 マウスにおいてアドリマイシン（ADR）腎症がポドサイト障害モデルとして広く用いられている。このモデルは不可逆的なポドサイト障害を高い再現性で誘発することが可能であり、CKD の病態ステージの一部を再現するため頻繁に利用されている。しかし、ADR 腎症モデルは、BALB/c 系統のみ感受性であり、多くの研究でスタンダードの C57BL/6J (B6J) 系統では適用が困難であった。BALB/c 系統の遺伝学的解析により ADR 感受性は、*Prkdc* (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) 遺伝子のアミノ酸多型に起因するとの仮説が立てられていた。そこで、B6J-BALB/c 系統間の多型の内、R2140C 変異を導入した B6-*Prkdc*^{R2140C} マウスを CRISPR/Cas9 法にて作出し、ADR に対する感受性の評価した結果、当該マウスは、重篤な CKD を発症した。従って、PRKDC の R2140C 変異が ADR 腎症の原因変異であることが確認された。今後、B6-*Prkdc*^{R2140C} マウスと B6 背景で作出された様々な遺伝子変異マウスを交配することによって作出した系統を用いれば、CKD に関与する様々な遺伝子産物の治療効果の検証に用いることが可能となる。また、ADR 腎症モデルは ADR がポドサイトだけでなく多種の細胞に対して障害を引き起こすという問題があり、特に尿細管の障害は、解析

時のノイズとなり、解析が非常に困難になり得る。このことから、多種の細胞に対して障害を引き起こす広域細胞毒である ADR が複数の細胞種にわたり障害を及ぼすことが本モデルの制約と考えられ、よりヒトの腎症に近いモデルの開発が必要とされた。

第2章 Toxin Receptor-mediated Cell Knockout (TRECK) 法は、マウスの Heparin-binding EGF-like growth factors (HB-EGF:ジフテリア毒素レセプター: DTR)がジフテリア毒素 (DT)に対して親和性がないことを利用して、標的細胞特異的に、DT に親和性のあるヒト HB-EGF を発現させ、特定の時期に DT を投与することにより標的細胞を死滅させる手法である。この方法により、ポドサイトに特異的な障害を起こし、ヒトの腎症に近似するモデルの開発を目指し、CRISPR/Cas9 法により、ポドサイト特異的に発現する *Nphs2* (*Podocin*) 遺伝子の内因性プロモーター下流にヒト由来の HB-EGF を発現するノックインマウス Pod-TRECK を作出した。本マウスでは、非免疫的なメカニズムで特異的なポドサイトの消失を誘導することで、他の糸球体構成成分に傷をつけることなく DT 用量依存的にポドサイト障害が起こることを期待した。Pod-TRECK の腹腔内に DT を投与すると、顕著なアルブミン尿症が起こり、その後尿細管障害および腎尿細管間質の広範な線維化が観察された。また、尿アルブミン量の増加は DT の投与量に依存し、さらに DT の投与量により、軽度～重度までのポドサイト特異的な傷害を誘発することが可能となり、多様な腎症タイプや腎症の各ステージを再現することが出来た。

第 3 章 本研究で開発したポドサイト障害モデルマウス B6-*Prkdc*^{R2140C} 及び Pod-TRECK を使用して RNA-sequencing (RNA-seq) やプロテオーム解析を行った。ADR 腎症モデルでは初期の段階で、FABP1 や NGAL といった急性腎障害

(Acute Kidney Injury : AKI)マーカーの上昇が認められた。また、AKIからCKDへの移行に関与する遺伝子の発現の変動も認められた。近年、ヒトの疫学的研究から、AKI後、腎機能は完全に回復されず、CKDに移行しやすい現象(AKI-to-CKD transition)が明らかになってきたが、マウスADR腎症は、AKI-to-CKD transitionのモデルとしても有効であることが初めて明らかとなった。一方、Pod-TRECKはポドサイト障害を特異的に誘発するため、ヒトのポドサイト障害を起因とするCKDの病態メカニズムをより精確に再現するモデルとしての価値が高いと評価できる。両モデルで共通して発現が変動する遺伝子は、原疾患の種類に関係なく、ポドサイト障害により発現が変動するものである。将来的に、これらの遺伝子が関与する腎臓の恒常性を制御するシグナル経路が特定できれば、腎疾患の病態進展機構の解明や予防・治療薬の開発に資することが期待される。

【論文審査の結果】

本研究の成果から、ポドサイト障害モデルマウスを作成しAKIからCKDへの移行の機序を明らかにすることが可能となった。これにより、AKIからCKDへの移行に伴う発現タンパク質およびシグナル伝達を分子生物学的に解析出来ると思われる。この研究はヒトにおける腎症の病態メカニズムをより精確に再現するモデルとしての価値が高く、この病気の病態の解明・治療に繋がる研究であり、極めて高い価値を有するものと判断された。審査員一同は、本論文が新規の知見を多く含み医学や獣医学の発展に寄与するものとの認識で一致した。さらに著者が真摯な研究態度と豊かな人間性を持ち、将来研究成果を社会に還元できる能力を有するものであり、博士(獣医学)の学位の授与に値すると判断した。