

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

渡邊 正輝

Development of a novel podocyte injury model for
pathophysiological elucidation of chronic kidney disease

Masaki Watanabe

目次

I. 略語	1
II. 序論	3
III. 倫理声明	7
IV. 第 1 章 C57BL/6J における ADR 腎症モデルの開発	8
1. 緒言	9
2. 材料・方法	11
3. 結果	19
4. 考察	23
5. 図表	27
V. 第 2 章 新規ポドサイト傷害モデル Pod-TRECK の開発	45
1. 緒言	46
2. 材料・方法	48
3. 結果	53
4. 考察	56
5. 図表	58
VI. 第 3 章 B6- <i>Prkdc</i> ^{R2140C} 、及び [®] Pod-TRECK の比較解析	74
1. 緒言	75
2. 材料・方法	77
3. 結果	81
4. 考察	84
5. 図表	87
VII. 総括	102

VIII. 謝辭	106
IX. 引用文獻	107

I. 略語

ADR: Adriamycin

AKI: Acute Kidney Injury

Alb: Albumin

BUN: Blood Urea Nitrogen

B6J: C57BL/6J

CBB: Coomassie Brilliant Blue

CKD: Chronic Kidney Disease

Cre: Creatinine

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic
Repeats

DNA-PK: DNA-Dependent Protein Kinase

DSBs: Double-Strand Break

EF-2: Elongation Factor 2

ESRD: End Stage Renal Disease

FFA: Free Fatty Acids

FSGS: Focal Segmental Glomerulosclerosis

GFR: Glomerular Filtration Rate

HB-EGF: Heparin-Binding EGF-like Growth Factor

IF: Immunofluorescence

IHC: Immunohistochemistry

NAD: Nicotinamide Adenine Dinucleotide

PAN: Puromycin Aminonucleosidase

PAS: Periodic Acid Schiff

PFA: Paraformaldehyde

Prkdc: Protein Kinase, DNA-Activated, Catalytic Polypeptide

RNP: Ribonucleoprotein

SPF: Specific Pathogen Free

II. 序論

ヒトの疾患を実験的に再現することは困難を極め、そのため医学研究は主に実験動物に依存している。疾患モデル動物は、ヒトや動物で見られる疾患プロセスを実験的に再現しようとする手法で、疾患のメカニズム解明や新薬・新規治療法の評価に、大きな役割を果たしている。また、大量の化合物に対する効果のスクリーニングは培養細胞での特定の細胞への影響を調査するために確立されているが、一部の生物学的プロセスは培養細胞では再現できず、生きた動物そのものに代わる完全な代替法が未だ存在しないために、人や動物の健康に関する科学を進展させるためには基礎研究において動物実験が必要である。しかしながら、現在でもヒトの病態を精緻に再現するモデル動物は限られている [62]。このヒト病態モデル動物の不在が、基礎研究から臨床研究への移行における「死の谷」の要因となっており、病態解明、バイオマーカーの探索、薬剤開発において厚い障壁となっている [74]。本博士論文研究においては、慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease: CKD) のモデルマウスとして、ゲノム編集技術を用いて、2 系統のマウスを開発したので、ここに報告する。

CKD は、糖尿病性腎症、慢性糸球体腎炎、腎硬化症など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 [90]。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 [11, 25]。CKD は、腎機能を示す指標である糸球体濾過量 (Glomerular Filtration rate: GFR) が 60 mL/分/1.73m^2 未満であるか、あるいは腎臓の障害マーカー (蛋白尿等) の上昇が認められ、いずれも 3 ヶ月以上続く状態を示す [1]。GFR が 15 mL/分/1.73m^2 未満となり、末期腎不全 (End Stage Renal

Disease: ESRD) 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 は糖尿病、高血圧、心疾患といった重要疾患と密接に関連しているため [32, 37, 83]、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、多くの場合、糸球体障害に続く蛋白尿症、尿細管障害、腎間質線維化は共通の病態として経過する [38, 82]。糸球体は、ポ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 [23]。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、糸球体基底膜を外側から覆う細胞であり、足突起を有する。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 [30]。ポドサイトに障害が生じると、スリット膜構造の機能不全が生じて血中タンパクが漏出し、タンパク尿が生じる。長期にわたるタンパク尿はタンパク質が尿細管を通過する過程で細胞に損傷を与え、炎症や線維化を誘発することで尿細管間質傷害を引き起こす [2, 69]。その結果、腎機能の更なる低下を招き、電解質異常や腎性貧血を伴う CKD の進行へと繋がる [66, 68]。治療としては、原疾患の管理と、蛋白尿量の減少を目指す食事療法が肝要である。また、血圧のコントロールも一般的に推奨されるが、完全な治癒は期待できない [29]。従って、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。

既存のポドサイト障害モデルはアドリアマイシン (Adriamycin: ADR)腎症、ピューロマイシン (Puromycin Aminonucleosidase: PAN)腎症、抗ポ

ドサイト抗体モデル等が報告されている [95]。ADR 腎症は、アントラサイクリン系の抗腫瘍性抗生物質である ADR の単回投与により作出し、CKD モデルとして頻繁に利用されている [78]。しかし、ADR 腎症はマウス系統では BALB/c 系統のみ感受性であり、標準系統である C57BL/6J (B6J) 系統が ADR 腎症を適用できないという問題がある [98, 99]。PAN 腎症はラットに PAN の単回投与または、片腎摘出と複数回投与の併用により作出する [33, 67]。単回投与の PAN (50 mg/kg) により、数日以内に大量の蛋白尿が発症し、投与から 10 週以降に巣状分節性糸球体硬化 (Focal Segmental Glomerulosclerosis: FSGS) が認められる [18]。また、片腎摘出と複数回投与の併用 (最初の投与量は 10 mg/kg、その後、4 週間ごとに 40mg/kg の追加投与) では、8 週以降に FSGS が見られる [3]。PAN 腎症はラットの FSGS モデルとして頻用されているが、近年、高濃度の PAN 投与 (450 mg/kg) がマウスでもポドサイト障害を引き起こすという報告が見られた [65]。これらの薬剤感受性モデルでは、病態進展の機序および、ポドサイト以外の細胞に対する薬剤の影響も未だ不明な点が多い。また、抗体を用いたポドサイト障害モデルも多数作成されているが、抗体を大量に投与する必要があることや、エピトープ部位が不明で他の組織との交差反応を否定できない等問題点も多い [53, 57]。

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 章では、多くの研究におけるスタンダードマウスである B6J 系統で ADR 腎症モデルを適用することを目的とした。B6J-BALB/c 系統間の多型の内、R2140C 変異を導入した B6-*Prkdc*^{R2140C} を Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)/Cas9 法にて作出した。当該マウスを用いて ADR に対する感受性の評価を行った結果、B6-*Prkdc*^{R2140C} は、重篤

な蛋白尿を呈し、CKDに至った。第2章では、Toxin Receptor-mediated Cell Knockout (TRECK)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 *Nephrosis2* (*Nphs2*) 遺伝子の内因性プロモーター下流にヒト由来の EGF-like growth factors (HB-EGF)を発現するノックインマウス Pod-TRECK を作出した。当該マウスにジフテリア毒素 (Diphtheria Toxin: DT)を投与すると、顕著なアルブミン尿症に続く、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。第3章では、第1章および第2章で作出したポドサイト障害モデルで発現変動が認められる遺伝子およびタンパク質の比較を行う目的で、ADR および DT 投与1週間後の腎臓を対象に RNA-sequencing (RNA-seq)解析およびプロテオーム解析を実施した。ADR は直接的に尿細管障害を引き起こし重篤な炎症を示し急性腎障害 (Acute Kidney Injury: AKI)から CKD へ移行するモデルと考えられる一方、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いうことが示唆された。

III. 倫理声明

すべての動物実験は、北里大学の動物実験委員会の審査を受けた後に、学長により承認された（承認 ID: 19-163, 22-060）。また、動物の取り扱いに関しては、「北里大学獣医学部における実験動物等に関する規定」にしたがって実施した。マウスが瀕死の状態、急激な体重減少（数日以内に体重の 20% 減少）、あるいは著しい浮腫を示した場合、人道的なエンドポイントを適用した。

IV. 第 1 章

C57BL/6J における ADR 腎症モデルの開発

1. 緒言

ADR 腎症モデルは ADR の単回投与によりポドサイト障害を誘発でき、ポドサイト障害により重度の蛋白尿症およびヒトの代表的な糸球体疾患である FSGS と類似した病理像を示す [24]。ADR 腎症モデルは、Sternberg によって最初に報告され、その簡便さと再現性から、現在では最も広く使用されている CKD モデルである [78]。しかし、ADR 腎症モデルはマウスでは BALB/c 系統をはじめとする一部の系統に適用が限定され、多くの研究でスタンダードの B6J 系統で利用できない欠点がある [98, 99]。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) 遺伝子のエクソン 49 の C6418T 変異による R2140C 多型に起因するとの仮説が提唱されている [61]。

Prkdc 遺伝子は、3 量体として機能する DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) のサブユニットをコードしており、DNA の修復、シグナル伝達、転写の活性化に不可欠である。DNA-PK は PRKDC、Ku70、Ku80 から構成され、非相同末端結合による 2 本鎖 DNA 切断 (DSBs) の修復に寄与する [5, 20]。DNA-PK の機能欠損は、免疫不全、放射線高感受性、早老を引き起こす [26]。DSBs が発生すると、PRKDC は Ku70 と Ku80 を動員し、DNA ポリメラーゼや他のライゲーションファクターと相互作用して、切断末端を修復する。この 2 本鎖修復プロセスは V(D)J リコンビネーションを介したリンパ球の成熟や抗体の産生にも不可欠であり、その欠損は免疫不全の原因となる [26]。また、PRKDC はアポトーシスによる細胞死、テロメアのメンテナンス、ゲノムの保全にも関与する [13]。そして、PRKDC の多様な機能には厳格な制御閾値が存在する。例えば、PRKDC の発現量が低下している BALB/c 系統ではリンパ球の成熟は観察される

が、ADR 投与による DNA 障害後の DNA の修復は不十分である [13]。さらに、PRKDC はミトコンドリアゲノムのメンテナンスにも間接的に関与している。ADR 腎症の場合、ADR によるミトコンドリア DNA (mtDNA) への直接的なインターカレーション、または活性酸素種 (ROS) の産生による間接的な影響が mtDNA のコピー数の減少を引き起こす。この mtDNA のコピー数の減少は、ミトコンドリアの数が減少することに関連しており、結果としてポドサイトの死滅が引き起こされる可能性が示唆されている [61]。

本章では、B6J-BALB 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を行い、ADR 腎症の原因変異が、PRKDC の R2140C 変異であることを実験的に証明し、B6J 系統で ADR 腎症モデルの適用をすることを目的とした。

2. 材料・方法

2-1. 実験供与マウス

すべてのマウスは Specific Pathogen Free (SPF) 環境下で飼育し、室温 22±4 °C、湿度 40-60% に維持し、12 時間の明暗サイクルで飼育した。水および標準飼料 CE-2 (CLEA Japan, Tokyo, Japan) は、自由摂取とした。

B6J 系統背景での *Prkdc* 変異マウス B6-*Prkdc*^{R2140C} は常法により CRISPR/Cas9 システムを用いて作出した [50, 51, 86]。 *Prkdc* のエクソン 49 を標的とし、CRISPR/Cas9 のターゲット配列は 5'-AGCTTGTTATTAA TACAGAA -3'とした (図 1)。Cas9 mRNA は mMACHINE T7 ULTRA Transcription Kit (Thermo Fisher scientific, MA, USA) を使用して合成した。sgRNA は MEGAshortscript T7 transcription kit (Thermo Fisher scientific, MA, USA) を使用して合成した。Single-stranded Oligodeoxynucleotide (ssODN) は株式会社 Exigen (Tokyo, Japan) に合成を依頼し作成した。上記の ssODN を Cas9:sgRNA:ssODN = 20ng/μL:10ng/μL:100ng/μL となる様に蒸留水を用いて調整し、37 °C、15 分インキュベートして、gRNA/Cas9 複合体 (RNP) を形成させた後、約 100 個の B6J (C57BL/6JJcl, CLEA Japan, Tokyo, Japan) の受精卵の細胞質にマイクロインジェクションした。4 週齢で離乳後、群飼育を行い産仔の *Prkdc* 遺伝子の exon49 を増幅した。PCR 産物を DNA シーケンスすることによって R2140C 変異の導入を確認した。

sgRNA 配列: 5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGTTCTGTATTAA
TAACAAGCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCT
AGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTT
T-3'

ssODN 配列: GCATCAGTATCTTTAAATATCTGTCTCTTCTTAGCAA
AGCTTGTTATTAATACAGAAGAGgtatctaact(導入する変異を太字で
示した。)

2-2. PCR による遺伝子型の判定

4 週齢の N2 以降の雌雄マウスをイソフルランで麻酔し、耳をパンチして組織片を得た。そして組織片に Lysis buffer (TEN 200 μ L, 10% SDS 4 μ L, Proteinase K 1 μ L)を加え、組織を完全に浸し、37°Cで 16–26 時間インキュベートし組織を溶解した。その後、PCI (フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール、25:24:1)を加え、vortex を 15 秒以上行い、完全に溶液を白濁させた。遠心 13000 rpm、10 分を室温で行い、上層を回収し、上清と等量の 2-プロパノールと混合した。遠心 15000 rpm、30 分、4 °Cで行い、上清を捨て、70% EtOH を加えた。遠心を 15000 rpm、2 分、4 °Cで行い、上清を除去して 37 °Cでドライアップした。TE を 100 μ L 加え、DNA 抽出液とした。DNA 抽出液 1.5 μ L に対して、蒸留水 (DW) 1.8 μ L、2 \times KOD Buffer 7.5 μ L、2mM dNTPs 3 μ L、10 μ M プライマーミックス (Forward: 5'-TTTTGTAAAGTGAAAGCTGTCGCTAGG-3'、Reverse: 5'-GGTGATGCTAACATAGACGGTCAGAAC-3') 1 μ L、KOD 0.2 μ L を加え、PCR 反応を行った。PCR 反応は、95 °C 2 分間、98 °C 10 秒間、60 °C 30 秒間、68 °C 30 秒間を 30 サイクル行った。PCR 産物は、ユーロフィンジェノミクス株式会社 (東京)の受託解析サービスを使用し、DNA シーケンスを行うことで変異を確認し、実験には得られた野生型 (B6-*Prkdc*^{WT})および *Prkdc*^{R2140C/R2140C} ホモ型の個体 (B6-*Prkdc*^{R2140C})を使用した。

2-3. ウェスタンブロッティング

実験には、8 週齢の、B6J (C57BL/6JJcl, CLEA Japan, Tokyo, Japan)、BALB/c (BALB/cByJJcl, CLEA Japan, Tokyo, Japan)および、B6-*Prkdc*^{R2140C}を用いた。三種混合麻酔 [塩酸メドミジン 0.75 mg/kg (日

本全薬工業, Fukushima, Japan)、ミダゾラム 4 mg/ kg (サンド株式会社, Tokyo, Japan)、酒石酸ベトルファノール 5 mg/ kg (Meiji Seika ファルマ株式会社, Tokyo, Japan)、生理食塩水 (大塚製薬, Tokyo, Japan)]をマウスの体重 1 kg 当たり 10 ml を腹腔内投与して麻酔し [42]、後大静脈から放血し安楽殺を行ったのち腎臓を摘出した。摘出した腎臓を、RIPA Buffer (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)を 1000 μ l 加え、ホモジナイズ後、超音波処理により破碎を行った。氷上で 30 分インキュベート後、13000 rpm、4°C、2 分間遠心分離を行った。抽出液のタンパク質濃度は Precision Red Advanced Protein Assay (Cytoskeleton, Inc., CO, USA) を用いて測定した。タンパク質 2 μ g を 2×サンプルバッファー (0.5 mM Tris-HCl (pH6.8), 20% Glycerol, 10% SDS, Xylene cyanol, 2-mercaptoethanol)で希釈し、95°C、10 分間インキュベートした。サンプルを 5~20% ポリアクリルアミドゲル (e-PAGEL, Cat# E-T/RD520L, ATTO, Tokyo, Japan)で泳動し、その後メンブレン (Amersham Hybond-P PVDF Transfer Membrane, GE Healthcare, IL, USA)上にブロットした。ブロッキング溶液 (Bullet Blocking One, Cat# 13779, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)にメンブレンを 5 分浸漬した。一次抗体にマウスモノクローナル抗 DNA-PK 抗体 (18-2) (1 : 200, Invitrogen, MA, USA)、およびマウスモノクローナル抗 GAPDH 抗体 (1 : 5000, HRP-60004, Proteintech, IL, USA)を用い、メンブレンを 4 °Cオーバーナイトで浸漬し、十分に洗浄した後、二次抗体に M-IgG κ BP-HRP:sc-516102 (1:1000, Santa cruz biotechnology, Inc, TX, USA)を用いて常温で 1 時間浸漬した。化学発光試薬は ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva, Tokyo, Japan)を用い、発光を Omega Lum C (Gel company, CA, USA)により検出した。得られたバンドのシグナル強度は画像解析ソフト Image J software version 1.52 a (National Institutes of Health, MD, USA)で測定し、GAPDH でノーマライゼーションし、比較を行った。

2-4. ADR の投与

ADR の投与は、B6-Prkdc^{WT}、BALB/c および、B6-Prkdc^{R2140C} の 8 週齢のオスマウスを用いた。ADR (製品名:ドキシソルビシン塩酸塩, 富士フィルム和光純薬株式会社、Osaka, Japan)は ADR10 mg を生理食塩水 (大塚製薬)1 mL に溶解し 10 mg/mL とした溶液を保存溶液とし-30 °C で保管した。使用時は生理食塩水で 5 倍希釈し 2 mg/mL の溶液をマウスに投与した。B6-Prkdc^{R2140C} の ADR の感受性を評価するため、ADR を 10 mg/kg で尾静脈から投与し 2 週間経過した後、採材を行った。また、慢性期での腎障害を評価するため、ADR を 13 mg/kg で尾静脈から投与し 4 週間経過した後、採材を行った。ADR 非投与群は等量の生理食塩水を投与した。採材は、マウスに三種混合麻酔 [塩酸メドミジン 0.75 mg/ kg (日本全薬工業, Fukushima, Japan)、ミダゾラム 4 mg/ kg (サンド株式会社, Tokyo, Japan)、酒石酸ベトルファノール 5 mg/ kg (Meiji Seika ファルマ株式会社, Tokyo, Japan)、生理食塩水 (大塚製薬, Tokyo, Japan)]をマウスの体重 1 kg 当たり 10 ml を腹腔内投与して麻酔し[42]、後大静脈から放血し安楽殺を行ったのち腎臓を摘出した。

2-5. 尿中タンパク質量の測定

ADR 投与後 1 週目に膀胱圧迫によりマウスから尿を採取し、尿中の Alb を SDS-PAGE により検出した。採取した尿および 5 µg/µl の牛血清アルブミン (BSA)はそれぞれ 3 µL、2×サンプルバッファー (0.5 M Tris-HCl (pH6.8)、10% SDS、グリセロール、Bromophenolblue (BPB)、DW、2-メルカプトエタノール) 15 µL、超純水 (UPW) 12 µL を混合し、95°C で 10 分間加熱した。その後、SDS-ポリアクリルアミドゲル (7.5% running gel :30% アクリルアミド溶液 3 ml、Running gel 用 buffer 6 ml、純水 3 ml、20% ペルオキシ二硫酸アンモニウム (APS) 80 µL、テトラメチルエチレ

ンジアミン (TEMED) 12 μ l 4.5% stacking gel : 30% アクリルアミド溶液 1.2 ml、Stacking gel 用 buffer 2 ml、純水 4.8 ml、20% APS 50 μ l、TEMED 10 μ l)を用いて 10 μ L (サンプル 1 μ L 分)電気泳動した。泳動後のゲルに CBB 染色 (ラピッドステイン CBB キット, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)を行ったのち、DW 中で 24 時間脱色し、市販のスキャナー (GTX-820, EPSON, Nagano, Japan) を使用して染色像を撮影した。得られたバンドのシグナル強度は、画像解析ソフト Image J software version 1.52 a (National Institutes of Health, MD, USA)により BSA と比較して、Alb 量の定量を行った。また同一尿サンプルの尿中クレアチニン (Cre)を、Creatinine (urinary) Colorimetric Assay Kit (Cayman Chemical, MI, USA)を使用し測定した。測定は付属のマニュアルに従って行った。測定した Alb を尿中 Cre で補正し Alb/Cre 比を算出した。

2-6. 血液生化学検査

ADR 投与後 4 週目のマウスでは、三種混合麻酔 [塩酸メドミジン 0.75 mg/ kg (日本全薬工業, Fukushima, Japan)、ミダゾラム 4 mg/ kg (サンド株式会社, Tokyo, Japan)、酒石酸ベトルファノール 5 mg/ kg (Meiji Seika ファルマ株式会社, Tokyo, Japan)、生理食塩水 (大塚製薬, Tokyo, Japan)]をマウスの体重 1 kg 当たり 10 ml を腹腔内投与して麻酔し [42]、後大静脈より注射器を用いて 500-1000 μ l 採血し、1,700 \times g で 15 分間遠心分離して上清 (血清)を得た。これを生化学分析装置 (日立自動分析装置 7180, 株式会社日立ハイテク, Tokyo, Japan)にて血清尿素窒素 (BUN)、血清 Cre について測定した。

2-7. 腎臓の組織染色

採取した腎臓は、4%パラホルムアルデヒド (PFA)で固定後、パラフィンで包埋した。Periodic Acid Schiff (PAS)染色および Picrosirius Red 染色のためにパラフィンブロックをそれぞれ 2 μm および 4 μm の厚さで薄切した。PAS 染色は、先行研究に従い [71]、0.5% 過ヨウ素酸液 (5 分)、蒸留水で洗浄、コールドシッフ液 (富士フィルム和光純薬, Osaka, Japan) (30 分)、0.8%重亜硫酸水 (3 分、3 回)、流水洗、ヘマトキシリン (4 分)、流水洗、蒸留水で洗浄、透徹、封入の順に行った。Picrosirius Red 染色は先行研究に従い [81]、脱パラフィン、流水洗、蒸留水で洗浄 (1 分)、A 液 (0.5g シリウスレッド染色 (富士フィルム和光純薬, Osaka, Japan)、500 mL ピクリン酸飽和液) (1 時間)、B 液 (酢酸 5 mL、DW 1000 mL) (3 秒、3 回)、透徹、封入の順に行なった。

2-8. 腎障害の組織学的評価

ADR 投与後 2 週目の PAS 染色を行った腎臓切片を用いて、顕微鏡にて糸球体を 1 個体あたり 50 個の糸球体を無作為に撮影し、糸球体の障害の程度を以下のスコアにより評価した。0: 正常, 1: メサンギウム領域のわずかな拡大, 2: 部分的な糸球体基底膜の肥厚, 3: 毛細血管の狭窄と部分的なメサンギウム領域の拡大, 4: メサンギウム領域の全体的な拡大, 5: 血管内腔の拡大, 6: 糸球体の崩壊. [71] また、CKD の尿細管では萎縮が見られるため、間質障害の程度を近位尿細管の高さを測定し評価した [81]。1 個体当たり 50 個の尿細管の高さを画像解析ソフト Image J software version 1.52 a (National Institutes of Health, MD, USA)により測定した。

2-9. 線維化の定量

Picrosirius Red 染色した組織切片を用いて線維化の定量を行った。線維化領域の定量は、腎皮質領域を無作為に 6 視野 ($\times 40$)撮影し、染色領域を画像解析ソフト Image J software version 1.52 a (National Institutes of Health, MD, USA)により測定して、腎切片の面積に対する割合を算出した。尿細管間質の線維化を評価するため、Picrosirius Red により染色された糸球体および血管は計測から除外した。

2-10. 免疫組織化学 (IHC)染色

パラフィン包埋ブロックを 5 μm の厚さで薄切した。抗原賦活試薬 (Immunosaver: Nissin EM, 東京)中で 98°C、45 分間インキュベートすることにより抗原賦活を行った。内因性ペルオキシダーゼを不活性化するため、切片を 3% 過酸化水素 (H_2O_2)で 30 分間インキュベートした。10% 正常ヤギ血清で 30 分間ブロッキングした後、切片をウサギモノクローナル抗 NGAL 抗体 (1: 1000, ab63929, abcam, UK)または、ウサギポリクローナル抗 αSMA (ACTA2)抗体 (1: 500, 23081-1-AP, Proteintech, IL, USA)で 4°C一晩インキュベートした。切片をペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (418261, Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan)と 30 分間反応させ、3, 3-diaminobenzidine (DAB: 040-27001, Wako, Tokyo, Japan)により染色した。染色像は倒立顕微鏡 (ECLIPSE, Nikon, Tokyo, Japan)を用いて画像化した。抗 NGAL 抗体による IHC では、DAB の染色陽性面積を Image J software (National Institutes of Health, MD, USA)で測定し腎切片の面積に対する割合を算出した。

2-11. 統計解析

すべてのデータは平均値±標準偏差 (SD) で示した。統計解析には、他群間のパラメトリックデータに対しては **One way Anarysis of Variance (ANOVA)** を、事後検定として **Tukey-Kramer** 検定を用いた。ノンパラメトリックデータに対しては **Kruskal-Wallis** 検定と **Steel-Dwass** による 3 群以上の事後事後検定を用いた。生存曲線は Kaplan-Meier 曲線で作成し、検定は **Logrank** 検定を用いた。 $p < 0.05$ は有意差ありとした。すべての統計分析は、**JMP Pro 17 (SAS Institute, NC, USA)** を使用した。

3. 結果

3-1. CRISPR/Cas9 による R2140C 変異ノックインの確認

CRISPR/Cas9 システムを用いて、B6J の PRKDC に R2140C 変異を導入した。R2140C 変異が導入されていることを確認するため作出したファウンダーマウスのエクソン 49 の PCR 産物をシーケンス解析したところ、*Prkdc* のエクソン 49 に C6418T 変異 (R2140C 変異)が入っていることが確認された。同時にターゲットの PAM 配列に再切断を防止するために導入した C6432A 変異も確認された。C6432A 変異はサイレント変異なので、アミノ酸の置換は起こらない (図 1, 2)。

3-2. B6-*Prkdc*^{R2140C} マウスの系統化

上記の実験で得られたマウスを B6-*Prkdc*^{R2140C} とした。同雄マウスを正常 B6 雌マウスと 2 回交配することによって N2 マウスを作出し、CRISPR/Cas9 システムによって誘発されるオフターゲット変異を除去した。N2 以降のマウスの兄妹交配によりホモの B6-*Prkdc*^{R2140C} を作出し、以後の実験に供した。B6-*Prkdc*^{R2140C} マウスは腎臓における組織学的異常は認められなかった。また、正常マウスに比べ、成長、行動、繁殖率に差が見られなかった (data not shown)。

3-3. ウェスタンブロッティングによる PRKDC 発現の確認

先行研究によると、R2140C 変異を持つ BALB/c 系統での PRKDC タンパク質の発現量は通常の PRKDC の約 1/10 であり、この PRKDC の安定性の低下がアドリアマイシン (Adriamycin: ADR) に対し感受性になっていることが示唆されている [61]。ウェスタンブロッティングにより腎臓での

PRKDC の発現を確認したところ、C57BL/6J (B6J) に対して、B6-*Prkdc*^{R2140C} および BALB/c では、PRKDC の有意な発現減少が確認された(図 3A, B)。

3-4. ADR 投与マウスのタンパク尿の検出

B6-*Prkdc*^{R2140C} において、BALB/c と同様に、PRKDC の発現量の減少が観察されたため、ADR 投与が B6-*Prkdc*^{R2140C} において ADR 腎症を引き起こすかを確認した。BALB/c での ADR 腎症に関する先行研究に基づき [6]、ADR 投与後 7 日目に尿を採取し、SDS-PAGE および Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色を用いてアルブミン (Alb) 量を測定した。その結果、B6-*Prkdc*^{WT} ではほとんど尿中の Alb が検出されなかったのに対して、BALB/c および B6-*Prkdc*^{R2140C} では重篤な Alb 尿が認められた (図 4A)。その後、クレアチニン (Cre) で補正した値を比較したところ、BALB/c と B6-*Prkdc*^{R2140C} の間に有意な差は認められなかった (図 4B)。

3-5. 腎臓の病理組織学的所見

ADR 投与から 2 週間後には、BALB/c で糸球体硬化が観察されることが報告されている [6]。このため、ADR 投与後 2 週間経過した B6-*Prkdc*^{R2140C} から採取された腎臓を用いて、PAS 染色による糸球体及び尿細管の損傷度の評価を行った。その結果、ADR 投与により B6-*Prkdc*^{WT} では腎障害は認められなかったが、BALB/c および B6-*Prkdc*^{R2140C} では糸球体障害 (メサンギウム領域の拡大、ポドサイトの減少、血管狭窄) 及び尿細管障害 (尿細管腔の拡張、萎縮、平坦化、尿円柱形成) が認められた (図 5A)。一方、BALB/c と B6-*Prkdc*^{R2140C} 間での糸球体障害スコアに有意な差は確認されず (図 5B)、尿細管障害に関連する尿細管の

高さについても、両系統間で有意な差は認められなかった (図 5C)。

3-6. 尿細管障害マーカーNGAL の発現量の確認

急性腎障害のマーカーとして広く使用され、CKD における尿細管障害と関連する NGAL について [40]、免疫組織 (IHC) 染色を行い尿細管障害についての評価を行った。B6-Prkdc^{WT} では NGAL の発現は認められなかったが、BALB/c および B6-Prkdc^{R2140C} マウスの平坦化した尿細管上皮細胞において NGAL の発現が認められた (図 6A)。抗 NGAL 抗体陽性面積を Image J software で測定し腎切片の面積に対する割合を算出したところ NGAL の発現量を BALB/c マウスと B6-Prkdc^{R2140C} マウス間で NGAL の発現割合に有意な差は認められなかった (図 6B)。

3-7. 生存数と臨床症状

これらの結果から、B6-Prkdc^{R2140C} は、BALB/c と同様に、ADR に対する感受性を示し、糸球体および尿細管障害が生じることが明らかとなった。しかし、ADR 投与後に B6-Prkdc^{R2140C} が CKD へ進行するかどうかは不明である。そのため、ADR 投与後に B6-Prkdc^{R2140C} が CKD に進行するかを検証した。まず、ADR 投与後 4 週目をエンドポイントとして生存率を比較した結果、実験に使用された B6-Prkdc^{R2140C} の 14 匹全てが生きていたのに対し、BALB/c では 11 匹中 6 匹が死亡し、生存率には有意な差が認められた (図 7)。また、ADR 投与後 4 週目における腎機能の評価するために BUN および血清 Cre の測定を行ったところ、BALB/c で ADR 非投与コントロール群と比較して有意な BUN および Cre の上昇が認められた一方、B6-Prkdc^{R2140C} では ADR 非投与コントロール群と比較して有意な差が認められなかった (図 8)。

3-8. 尿細管間質の線維化の確認

尿細管間質の線維化は CKD で最も頻繁に認められる病理所見であり、腎機能の低下に大きく寄与する [12]。腎臓の線維化は、 α -SMA 陽性筋線維芽細胞が細胞外マトリックスを過剰に産生することによって引き起こされることが示されている [45, 47]。そこで、抗 α -SMA 抗体を用いた IHC により筋線維芽細胞を確認したところ、ADR 投与 4 週後の BALB/c および B6-*Prkdc*^{R2140C} で α -SMA 陽性の筋線維芽細胞が認められた (図 9)。次に、Picrosirius Red 染色により線維化面積を測定した結果、ADR 投与 4 週後では BALB/c 同様に、B6-*Prkdc*^{R2140C} は重度な尿細管間質の線維化を呈し、Picrosirius red 陽性面積は BALB/c と比べ有意な差は認められなかった (図 10)。

4. 考察

BALB/c のアドリアマイシン (Adriamycin: ADR)腎症感受性の原因遺伝子は、PRKDC の R2140C 変異であることが示唆されていた [61]。本章では、標準系統である C57BL/6J (B6J)で ADR 腎症モデルを適用することを目的に、CRISPR/Cas9 法にて、B6J-BALB 系統間の多型である R2140C 変異を導入した B6-*Prkdc*^{R2140C} を作出した。R2140C 変異を導入した B6 において PRKDC の発現低下および ADR 投与による蛋白尿の漏出、病理組織的な腎障害が確認されたことから、R2140C 変異が ADR 腎症感受性の原因であることが実験的に証明された。また、B6-*Prkdc*^{R2140C} において ADR 投与後 4 週目には、ヒトの慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease: CKD)に類似した病理組織学的特徴 (尿管間質の線維化)が観察され、これにより B6-*Prkdc*^{R2140C} のヒトの CKD モデルとしての妥当性が示された。

まず、ADR に対する感受性を評価するため、ADR 投与 1 週目に尿中 Alb 量を測定し、2 週目には病理組織学的解析を実施した。その結果、B6-*Prkdc*^{R2140} と BALB/c の両方で同程度のアルブミン (Alb)量が示され、病理組織学的な障害スコアも同等であった。PRKDC はミトコンドリア DNA (mtDNA)の維持に関与することが示唆されており、腎臓の mtDNA の減少が、ADR による腎症を引き起こすメカニズムの一つであると考えられている [61]。近年の研究では、ミトコンドリア呼吸鎖の重要な電子伝達体である Coenzyme Q の生合成に関連する遺伝子の変異が FSGS の患者で特定され [7, 19, 34]、マウスにおいて、*Coq6*、*Pdss2*、*Adck4* などの遺伝子変異がポドサイト障害を引き起こすことが報告されている [10, 91, 92]。これらの知見から、ポドサイトはミトコンドリア依存度の高い細胞であることが示唆される。よって、ADR 腎症モデルはミトコンドリアの異常によって引き起こされ

る腎疾患を模倣するモデルとしても価値があると考えられる。

次に、*B6-Prkdc^{R2140C}* が ADR 投与後に CKD に進行するかどうかを検証するため、ADR 投与から 4 週後の腎症の重篤度を、BALB/c と *B6-Prkdc^{R2140C}* で比較した。*B6-Prkdc^{R2140C}* は全て生存していたが、BALB/c マウス 11 匹中 6 匹が死亡した。ADR は直接、糸球体と腎尿細管に対して毒性を持ち、尿細管間質において炎症と線維化を引き起こす。その結果、ADR 投与は BUN および Cre レベルを増加させ、最終的に末期腎不全を引き起こす [54, 93]。BALB/c マウスでは *B6-Prkdc^{R2140C}* マウスに比べて、血清尿素窒素 (BUN) および血清クレアチニン (Cre) レベルが著しく高く、高い死亡率が認められた。すなわち、BALB/c での ADR 腎症の重篤度は *B6-Prkdc^{R2140C}* よりも重度であり、B6 の遺伝的背景が ADR 腎症に対して抵抗性を持っていることが示唆された。BALB/c 系統と B6J 系統間で、ADR 投与後の BUN 値および病理学的重篤度を量的形質とした数理統計遺伝学的解析を行った研究によれば、B6J には *Prkdc* 遺伝子以外に ADR 腎症に抵抗性を持つ遺伝子が存在し、その原因遺伝子は B6J の第 9 染色体の *D9Mit182-D9Mit229* 間に座位することが示唆されている [61]。さらに、この領域は遺伝性のヒト糸球体疾患であるアルポート症候群モデル *Col4a3* 欠損マウスにおける、B6J の抵抗性遺伝子領域 (*Renfl*) と重複しているが [4]、いまだに抵抗性遺伝子の同定には至っていない。この B6J の領域により約 30% の組織学的障害スコアの低下が認められ [61]、本研究で認められた系統差に関連がある可能性がある。今後、本抵抗性遺伝子が同定できれば、腎症の新たな予防/治療分子標的の発見に繋がるかもしれない。

一方、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る。ADR は、アントラサイクリン系の抗

腫瘍性抗生物質であり、その広範な治療効果から充実性腫瘍や、血液腫瘍の治療に多く用いられているが、蓄積性の心毒性や腎毒性のために、その使用が制限されている [17, 22]。実際、ADR は ADR 心症、ADR 肝症として、心筋症モデルおよび肝線維化モデルとしても使用されている。ADR 投与による心筋症モデルは R2140C 変異を問わず低ドーズの ADR 投与により作出され、ADR 投与により急性期に TRPC3/NOX2 タンパク複合体が増加することで、酸化ストレスにより心筋細胞が障害されることが原因の一つであると考えられている [64, 76]。著者らの知見では ADR 投与による肝線維化は、ポドサイト障害と同様に PRKDC の発現量に依存しており、WT マウスと比較して、B6-*Prkdc*^{R2140C} では ADR の投与により ALT および AST の上昇、肝線維化といった慢性肝炎様の所見が顕著である [89]。また、ADR は尿細管にも細胞毒性を及ぼし、腎近位尿細管上皮細胞株 (HK2) では ADR を添加することによりカスパーゼ経路が変化しアポトーシスに至ることが報告されている [89]。これらの広域な毒性は解析時のノイズとなり、解析が非常に困難になることが本モデルの問題点であると考えられる。

結論として、本章では、B6J 系統に *Prkdc* の R2140C 変異を導入した B6-*Prkdc*^{R2140C} を作出し、B6J 系統での ADR 腎症モデルを適用可能とした。現在、B6 系統を標準系統として、米国を中心に全遺伝子の網羅的遺伝子改変マウス作出プロジェクトが進んでいる (<https://www.mousephenotype.org/about-impic/about-ikmc/>)。今後、本研究で開発した B6-*Prkdc*^{R2140C} マウスと、上記の B6 を遺伝的背景とする遺伝子改変系統を交配することにより作出した複合変異マウスにおいて、ADR 腎症の適応が可能となった。このことにより、様々な遺伝子や関連シグナル経路と腎障害の関係を精査することが可能となる。一方、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。

5. 図表

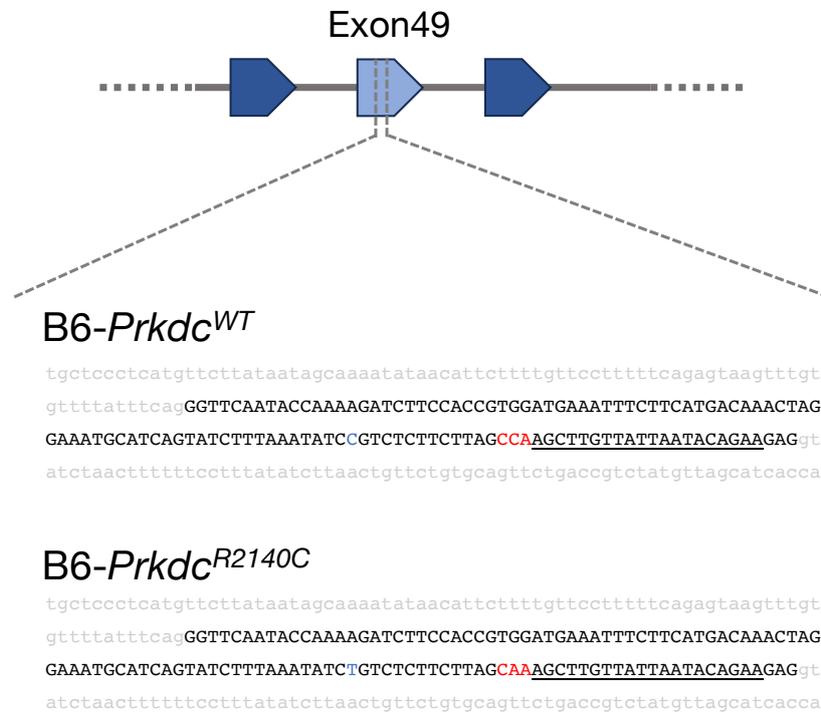
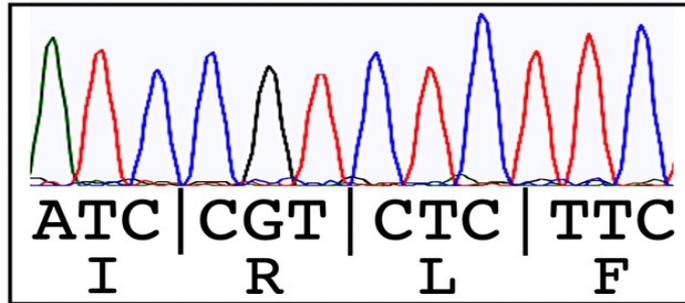


図 1. 導入変異およびターゲット配列

Prkdc のエクソン 49 を標的とし、CRISPR/Cas9 のターゲット配列は 5'-AGCTTGTTATTAATACAGAA -3' (下線部)とし、PAM 配列は CCA (赤文字)とした。変異の導入により、C6418T 変異 (R2140C 変異: 青文字) および、C6432A 変異 (サイレント変異)が起こる。

B6-*Prkdc*^{WT}



B6-*Prkdc*^{R2140C}

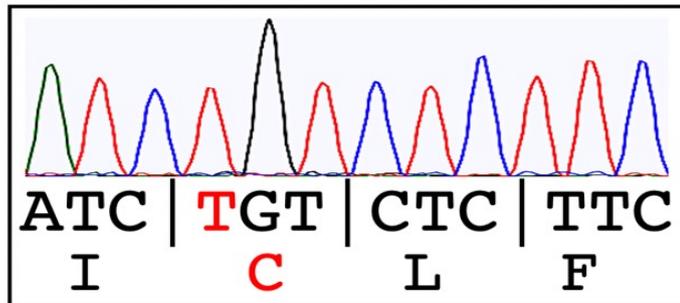
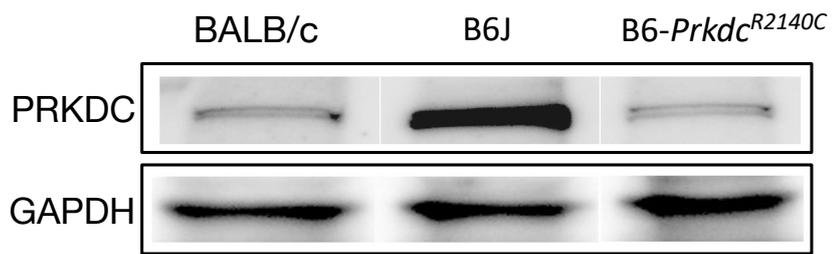


図 2. シーケンス解析

シーケンス解析により、*Prkdc* のエクソン 49 に C6418T 変異 (R2140C 変異) が確認された。

A.



B.

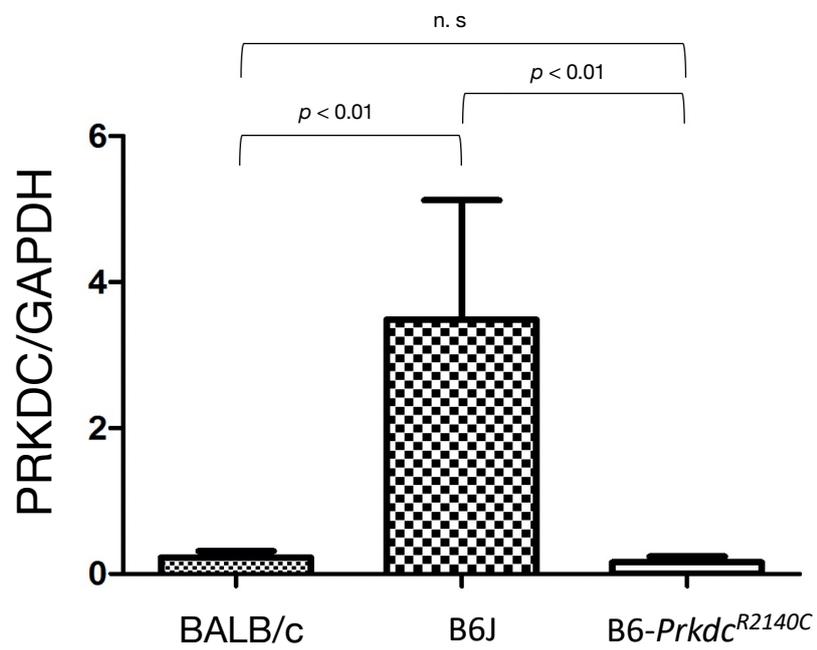
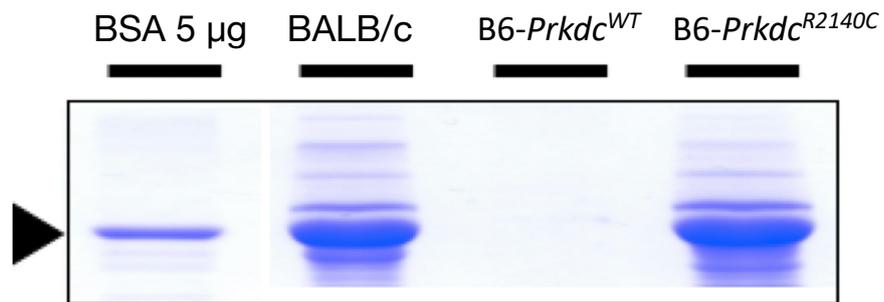


図 3. PRKDC の発現量の確認

A. ウエスタンブロッティングにより B6-*Prkdc*^{WT}, BALB/c および B6-*Prkdc*^{R2140C} での PRKDC 発現量を確認した。B. B6-*Prkdc*^{WT} と比較して、BALB/c および B6-*Prkdc*^{R2140C} では PRKDC の発現量が有意に低下していた (各系統 n = 3)。

A.



B.

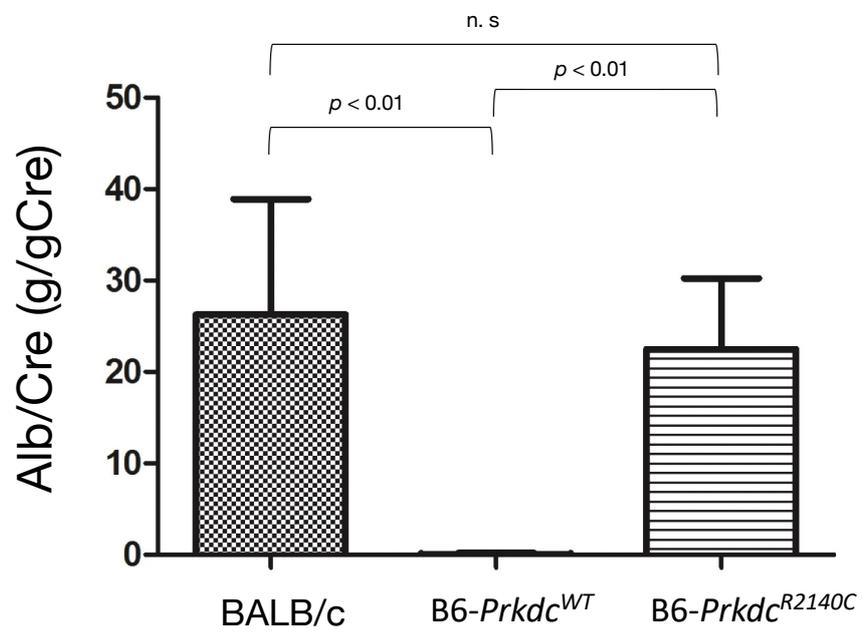
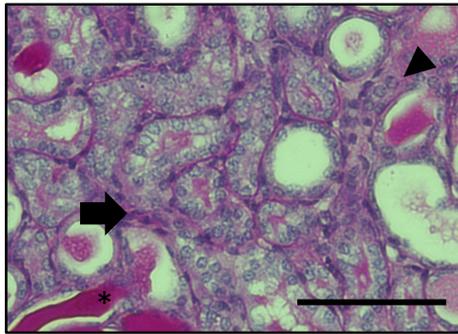


図 4. 尿中アルブミンの測定

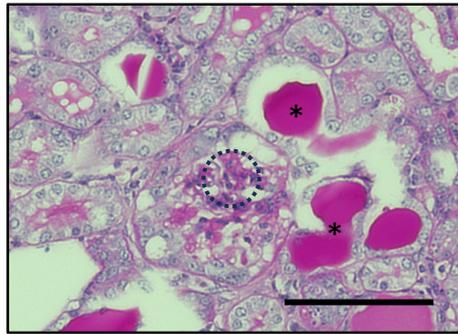
A. 尿中アルブミン (Alb) の検出 (BSA: Bovine serum albumin) B. 尿中 Alb を尿中クレアチニン (Cre) で補正し比較したところ B6-*Prkdc*^{WT} と BALB/c、B6-*Prkdc*^{R2140C} では有意な差が認められた ($p < 0.01$) が、BALB/c、B6-*Prkdc*^{R2140C} では有意な差が認められなかった。

A.

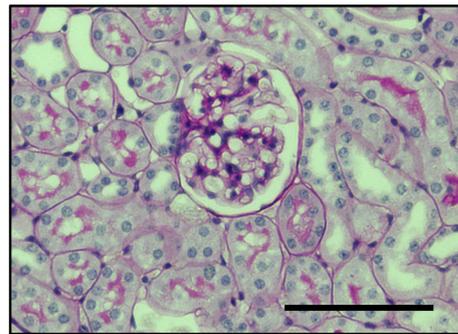
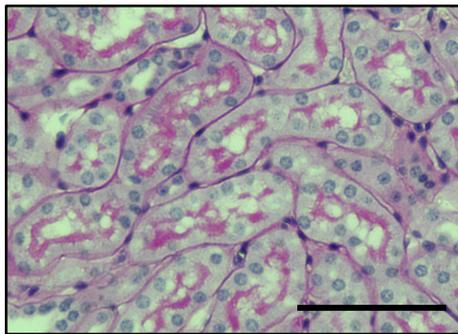
BALB/c 尿管



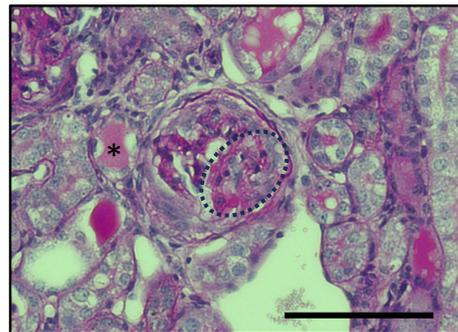
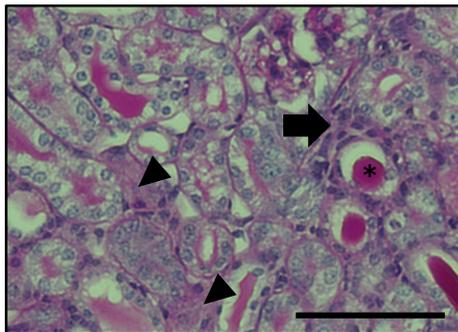
糸球体



B6-*Prkdc*^{WT}

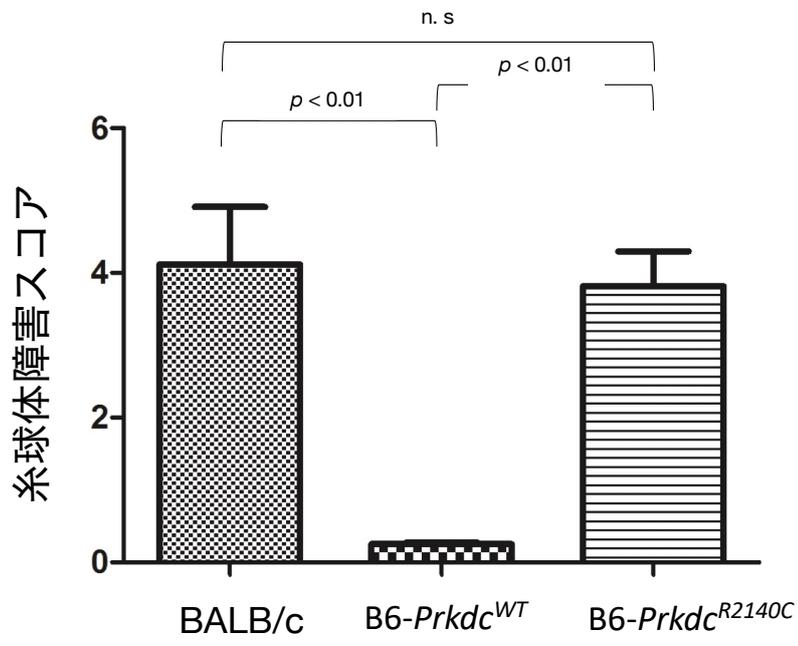


B6-*Prkdc*^{R2140C}



200 μm

B.



C.

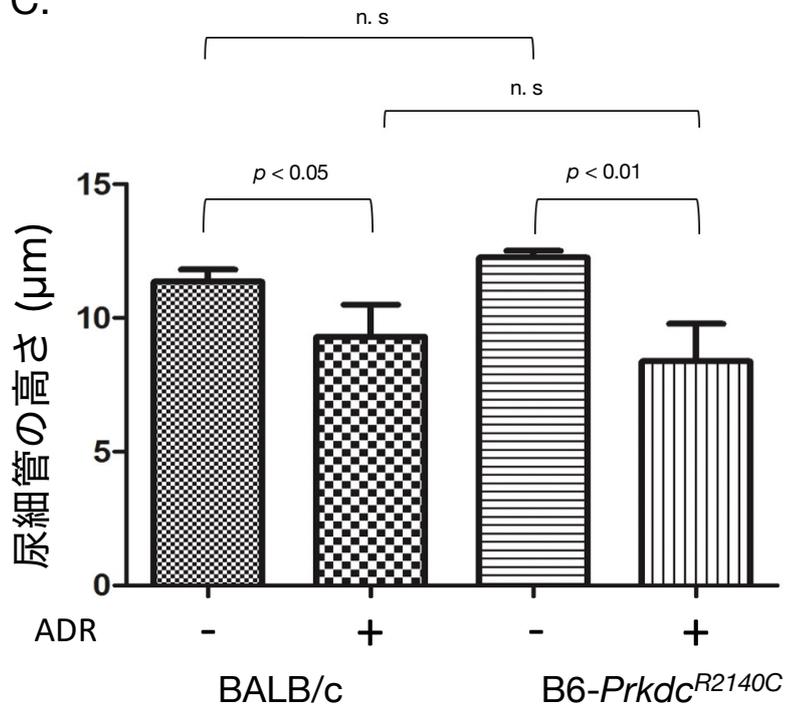
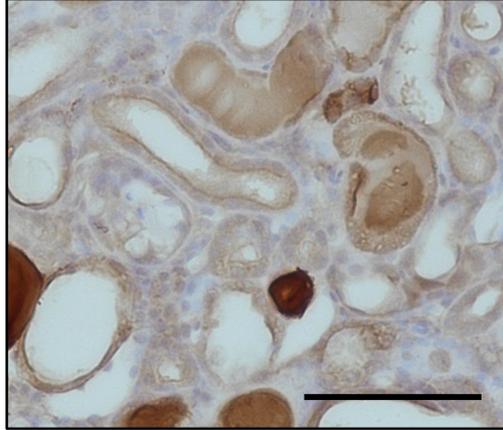


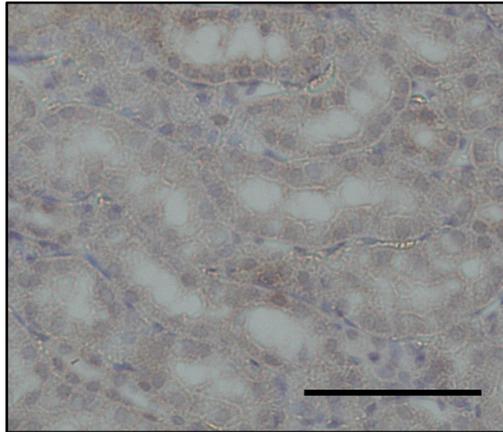
図 5. 組織学的解析

A. アドリアマイシン (ADR) 投与 2 週目の腎臓での Periodic Acid Schiff (PAS) 染色像。B6-Prkdc^{WT} では、糸球体の障害や尿円柱の蓄積は認められない。一方、BALB/c、B6-Prkdc^{R2140C} において、尿細管の壊死 (矢頭)、尿細管腔の尿円柱 (*) の出現、間質への炎症細胞の浸潤 (矢印) が認められ、糸球体ではポドサイトの脱落像やメサンギウム領域の拡大及び血管の狭窄といった糸球体硬化 (丸点線) の所見が認められた。倍率: ×400、スケールバーは 200 μm を示す。B. 糸球体障害をスコアリングし比較したところ、B6-Prkdc^{WT} (n = 3) と比較して、BALB/c (n=7) または B6-Prkdc^{R2140C} (n = 7) では有意なスコアの上昇が認められたが、BALB/c と B6-Prkdc^{R2140C} の間で有意な差は見られなかった。C. 尿細管障害に関連する尿細管の高さを測定した。B6-Prkdc^{WT} (n = 3) と比較して、BALB/c (n=7) または B6-Prkdc^{R2140C} (n = 7) では有意な尿細管の高さの減少が認められたが、BALB/c と B6-Prkdc^{R2140C} の間で有意な差は見られなかった。

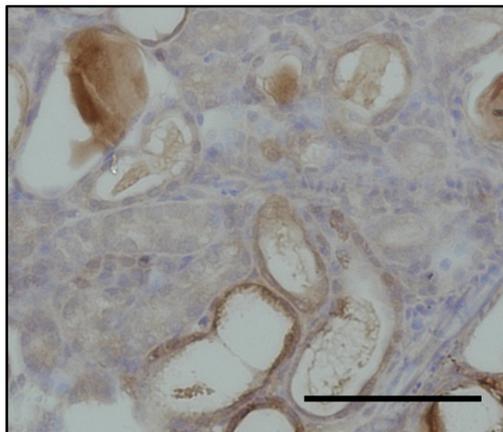
A. BALB/c



B6-*Prkdc*^{WT}



B6-*Prkdc*^{R2140C}



200 μ m

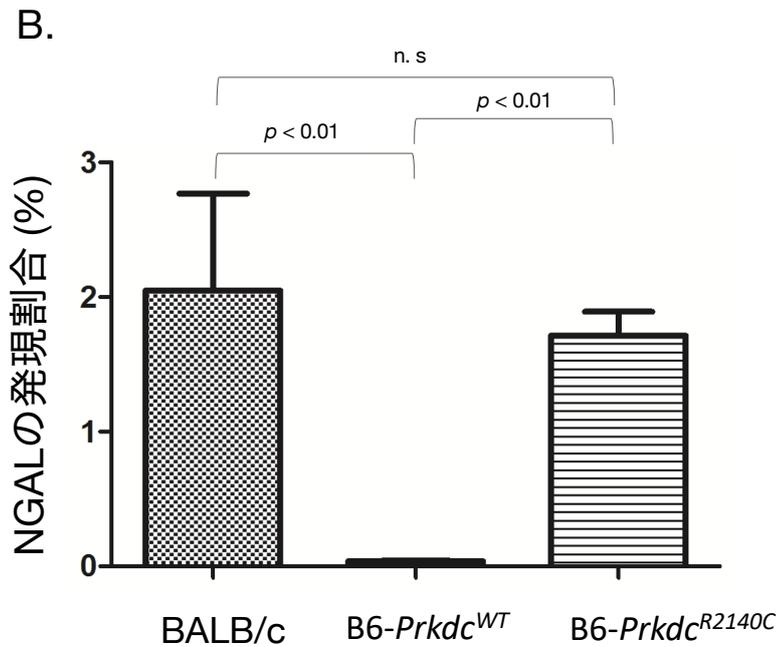


図 6. 抗 NGAL 抗体による免疫組織 (IHC) 染色

A. 抗 NGAL 抗体による IHC 染色像. 倍率: $\times 400$ 、スケールバーは $200 \mu\text{m}$ を示す。B. NGAL の発現割合は B6-Prkdc^{WT} (n = 3)と比較して、BALB/c (n = 7)、B6-Prkdc^{R2140C} (n = 7)では有意な上昇が認められ、BALB/c と B6-Prkdc^{R2140C} で有意な差は認められなかった。

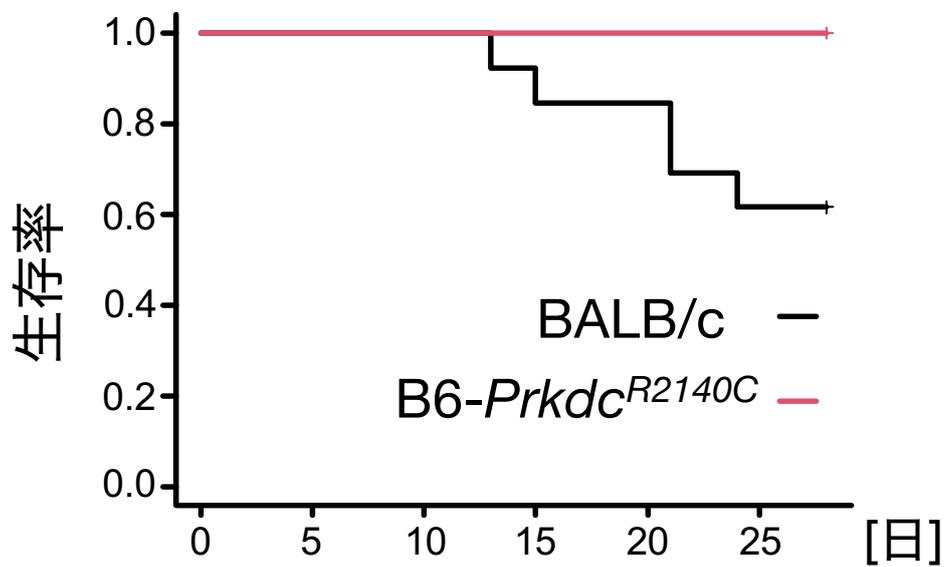


図 7. 生存曲線

ADR 投与 4 週目までの生存率は、B6-Prkdc^{R2140C} (n = 14)は BALB/c (n = 11)と比較して有意に高かった ($p < 0.05$)。人道的なエンドポイントは、マウスが瀕死の状態、急激な体重減少 (数日以内に体重の 20% 減少)、あるいは著しい浮腫を示した場合とした。

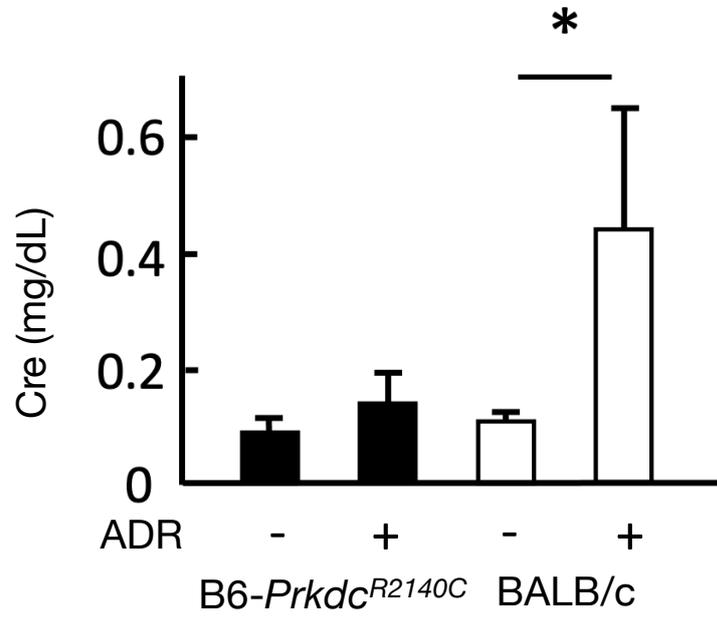
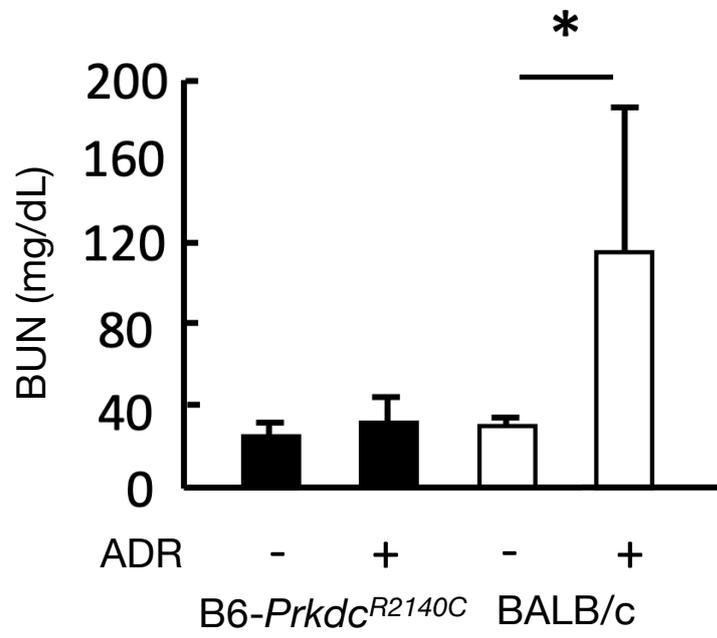
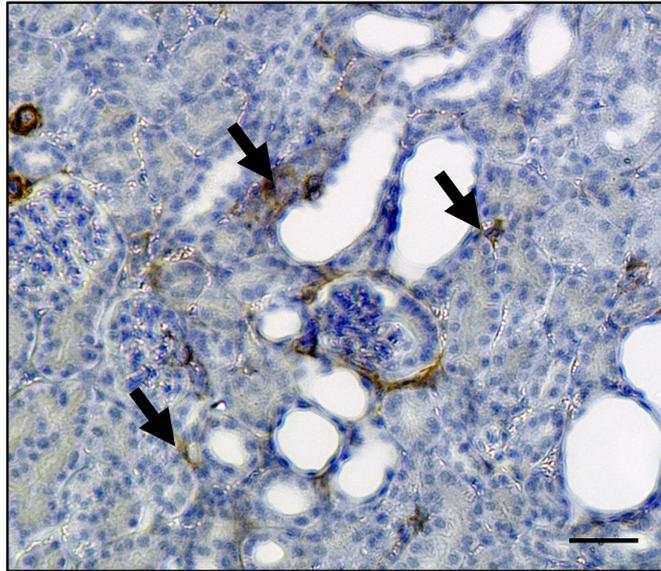


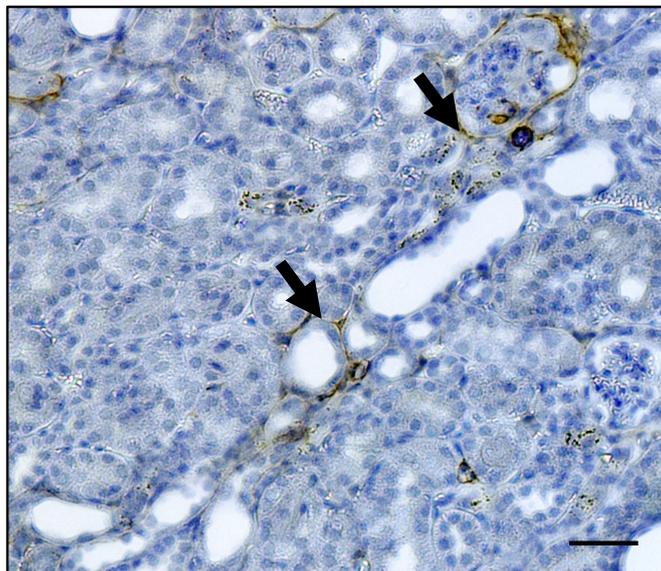
図 8. 血液生化学検査

ADR 投与 4 週目において、採取した血液から血清を分離し、生化学的検査を行った。血中 ADR 非投与の BALB/c (n = 4) と B6-*Prkdc*^{R2140C} (n = 4) および、ADR 投与 BALB/c (n = 6) と B6-*Prkdc*^{R2140C} (n = 10) の血清尿素窒素 (BUN) および血清クレアチニン (Cre) 濃度を測定した。* : $p < 0.05$ 。

B6-*Prkdc*^{R2140C}



BALB/c

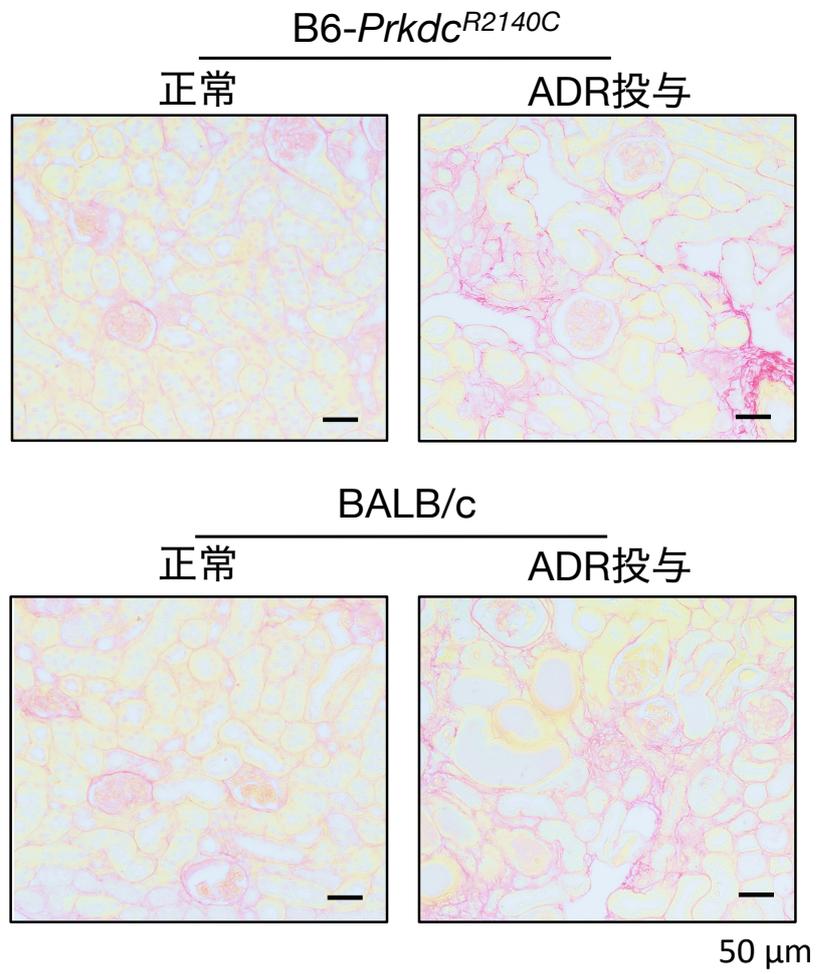


50 μ m

図 9. 抗 α -SMA 抗体による IHC 染色

ADR 投与 4 週後の BALB/c および B6-*Prkdc*^{R2140C} で α -SMA 陽性の筋線維芽細胞 (矢印) が認められた。倍率 $\times 100$ 、スケールバーは 100 μm を示す。

A



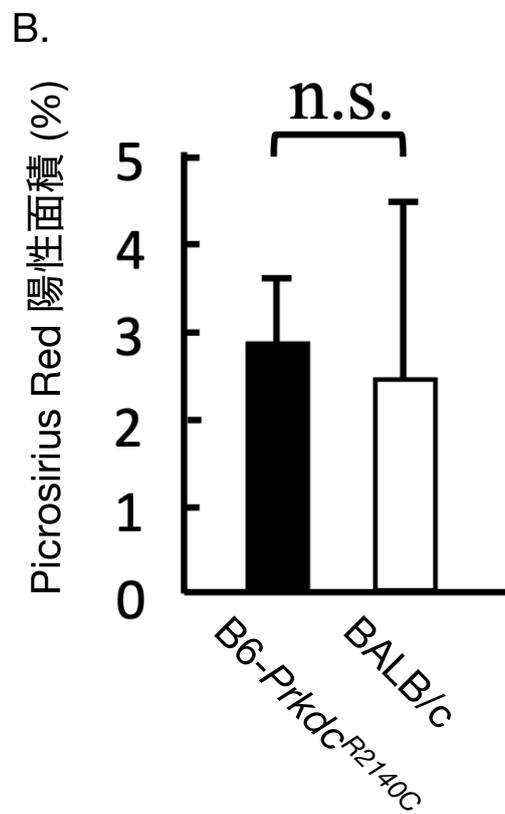


図 10. 線維化面積の測定

A. Picrosirius Red 染色像 B. Picrosirius red 陽性面積は BALB/c (n = 6) と比べ B6-Prkdc^{R2140C} (n = 6) で有意な差は認められなかった。

V. 第 2 章

新規ポドサイト傷害モデル Pod-TRECK の開発

1. 緒論

ジフテリア毒素 (Diphtheria Toxin: DT)はニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD)存在下で Elongation Factor 2 (EF-2)を ADP リボシル化し、これによってタンパク質の合成を阻害する [84]。その結果、DT 感受性細胞にアポトーシスが誘導される。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)が 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 [52]。HB-EGF は EGF ファミリーに属するヘパリン結合性の増殖因子であり、他の EGF ファミリーと同様に、膜型蛋白質 (proHB-EGF) として合成される [72]。proHB-EGF は細胞接着を介した細胞間情報伝達に機能する同時に、ジフテリア毒素受容体としても機能する。この proHB-EGF は細胞表面で多様な刺激に伴って酵素的切断を受け、その結果、分泌型 (sHB-EGF) が細胞外に放出され、EGF 受容体あるいは ErbB4 に結合し、細胞増殖・運動など種々のシグナルを伝達することが知られている [58]。TRECK 法ではヒト HB-EGF の Juxtamembrane domain 中のメタロプロテアーゼ認識部位に変異 (L148S/P149T)を導入することで酵素的切断に対して抵抗性を獲得した変異 HB-EGF が用いられる。この変異型 HB-EGF の採用によって、sHB-EGF に起因するオフターゲットな活性が防がれ、ジフテリア毒素受容体としての機能のみが発揮される [28, 35, 94]。

本章では、TRECK 法を用いて、ポドサイト特異的に発現する *Nephrosis2* (*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 を発現させるノックインマウス、Pod-TRECK を作出することを

目的とした。第 1 章にて作出した B6-*Prkdc*^{R2140C} による ADR 腎症モデルは、広域細胞毒である ADR を用い、多種多様な種類の細胞に広範な損傷が生じ、顕著な炎症反応が見られた。従って、その後の腎障害において、どの要素がポドサイトの損傷に関係し、どの要素がその後の反応に関係するかを決定することは困難である。しかし、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本マウスは、ポドサイト障害を他の糸球体構成成分に傷をつけることなく解析することを可能とすることが期待される。

2. 材料・方法

2-1. 実験供与マウス

すべてのマウスは SPF 環境下で飼育し、室温 22±4 °C、湿度 40-60% に維持し、12 時間の明暗サイクルで飼育した。水および標準飼料 CE-2 (CLEA Japan, Tokyo, Japan) は、自由摂取とした。

B6J 系統 (C57BL/6Jcl, CLEA Japan, 東京) を遺伝背景とする Pod-TRECK マウスは常法により CRISPR/Cas9 システムを用いて作出した [50, 51, 86]。マウスから *Nphs2* のプロモーターとエクソン 1 を含むゲノム断片をクローニングし、エクソン 1 内にインフレームで L148S/P149T 変異の入ったヒト *HBEGF* (NCBI accession No. NM_001945) を導入した DNA 断片 (*Nphs2-HBEGF*) を作成した (図 1)。Cas9 タンパク (60 ng/ml, NEB, MA, USA) と、下記 crRNA (0.61 pmol/μl, Fasmac, Kanagawa, Japan) および tracrRNA (0.61 pmol/μl, Fasmac, Kanagawa, Japan) および DNA 断片を混合して 37 °C、15 分インキュベートして、gRNA/Cas9 複合体 (リボヌクレオタンパク質 : RNP) を形成させた後、約 100 個の C57BL/6J マウスの受精卵の細胞質にマイクロインジェクションした。2 細胞期胚を偽妊娠マウスに移植し、産仔を得た。4 週齢で離乳後、群飼育を行い産仔の *Nphs2* 遺伝子の exon1 を増幅した。PCR 産物を DNA シーケンスすることによってヒト HB-EGF の導入を確認した。

TracerRNA :
AAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU
UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU
crRNA :
UUGCACCGCUGCAUUGACCCGCUCUGGUUUUAGAGCUAUGCUGU

UUUG

2-2. ノックイン変異を有するマウスの確認

4 週齢の雌雄 N2 マウスをイソフルランで麻酔し、耳をパンチして組織片を得た。そして組織片に Lysis buffer (TEN 200 μ L, 10% SDS 4 μ L, ProK 1 μ L を混合したもの)を加え、組織を完全に浸し、37°Cで 16–26 時間インキュベートし組織を溶解した。その後、PCI (フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール、25:24:1)を加え、vortex を 15 秒以上行い、完全に溶液を白濁させた。遠心 13000 rpm、10 分を室温で行い、上層を回収し、上清と等量の 2-プロパノールと混合した。遠心 15000 rpm、30 分、4 °Cで行い、上清を捨て、70% EtOH を加えた。遠心を 15000 rpm、2 分、4 °Cで行い、上清を除去して 37 °Cでドライアップした。TE を 100 μ L 加え、DNA 抽出液とした。DNA 抽出液 1.5 μ L に対して、蒸留水 (DW) 1.8 μ L、KOD Buffer 7.5 μ L、dNTPs 3 μ L、10 μ M プライマーミックス (Forward: 5'-AGAAAGCTGGGGCTGCGACTCT-3'、Reverse: 5'-CTCTGCCGCTCTGCTCCAGGCAT-3') 1 μ L、KOD 0.2 μ L を加え、PCR 反応を行った。PCR 反応は、95 °C 2 分間、98 °C 10 秒間、58 °C 30 秒間、68 °C 40 秒間を 30 サイクル行った。PCR 産物を 0.8% アガロースゲルで電気泳動を行った。1×TBE Buffer (50 mM Tris-Borate、2 mM EDTA) を用いて泳動し、目的のバンドの確認をした。実験には得られた *Nphs2-HBEGF* ヘテロ型の個体 (Pod-TRECK)を使用した。

2-3. ジフテリア毒素の投与

8 週齢の雄の Pod-TRECK と野生型 (WT)マウスに DT を投与した。実験には体重 22.1 \pm 3.5g のマウスを用いた。DT (富士フィルム 和光純薬株

株式会社, Osaka, Japan) 4 $\mu\text{g}/2 \mu\text{L}$ を生理食塩水 500 μL に溶解して、8 $\text{ng}/\mu\text{L}$ とした。マウスに DT を 20 ng 、50 ng 、100 ng 、250 ng 、500 ng および 750 ng 投与となるよう DT 液を調整し、それぞれマウスに投与した。

2-4. 尿中アルブミン量の測定

DT 投与後 7 日目に膀胱圧迫によりマウスから尿を採取し、尿中のアルブミン (Alb) を SDS-PAGE により検出した。尿中 Alb の測定は第 1 章と同様の方法で行った。

2-5. 組織学的観察

DT 投与 14 日目のマウスに三種混合麻酔 [塩酸メドミジン 0.75 mg/kg (日本全薬工業, Fukushima, Japan)、ミダゾラム 4 mg/kg (サンド株式会社, Tokyo, Japan)、酒石酸ベトルファノール 5 mg/kg (Meiji Seika ファルマ株式会社, Tokyo, Japan)、生理食塩水 (大塚製薬, Tokyo, Japan)] を体重 1 g 当たり 10 μl を腹腔内投与して麻酔し [42]、後大静脈から放血し安楽殺を行った。腎臓を摘出後、4% PFA で固定し、パラフィンで包埋した後、2 μm と 4 μm の厚さで薄切した。その後、第 1 章と同様の方法で、それぞれ PAS 染色および Picrosirius Red 染色を行った。

2-6. 糸球体の組織学的評価

PAS 染色を行った腎臓切片を用いて、顕微鏡にて糸球体を 1 個体あたり 50 個の糸球体を無作為に撮影し、糸球体の障害の程度を以下のスコアにより評価した。0: 正常, 1: 分節性糸球体硬化, 2: 全節性糸球体硬化, 3: 糸球体の崩壊 [88]

2-7. 線維化の定量

Picrosirius Red 染色した組織切片を用いて線維化の定量を行った。線維化領域の定量は、腎皮質領域を無作為に 3 視野 (×40)撮影し、染色領域を画像解析ソフト Image J software version 1.52 a (National Institutes of Health, MD, USA)により測定して、腎切片の面積に対する割合を算出した。尿細管間質の線維化を評価するため、Picrosirius Red により染色された糸球体および血管は計測から除外した。

2-8. 免疫蛍光 (IF)染色

パラフィン包埋ブロックを 5 μm の厚さで薄切した。抗原賦活試薬 (Immunosaver: Nissin EM, 東京)中で 98°C、45 分間インキュベートすることにより抗原賦活を行った。非特異的結合をブロックするために、切片を 5% ヤギ血清と 0.1% Triton X in PBS で 1 時間室温インキュベートした。ブロッキング後、切片をウサギポリクローナル抗 αSMA (ACTA2)抗体 (1:500, Proteintech, IL, USA)とウサギポリクローナル抗 NPHS1 抗体 (1:4000, Proteintech, IL, USA)で 4°C一晩インキュベートした。次に、切片を Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗ウサギ IgG 二次抗体 (1:1000, A11034: Cell Signaling Technology, MA, USA)で室温 30 分間インキュベートした。切片を ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)で封入した。染色を行った切片は LSM 710 共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)を使用することで画像化した。

2-9. 統計解析

相関係数は、パラメトリックなデータにはすべての統計分析は、JMP Pro 17 (SAS Institute, NC, USA)を使用した。パラメトリックデータに対してはピアソンの相関係数を、ノンパラメトリックデータに対してはスピアマンの相関係数を用いた。 $p < 0.05$ は有意差ありとした。すべての統計分析は、JMP Pro 17 (SAS Institute, NC, USA)を使用した。

3. 結果

3-1. CRISPR /Cas9 によるノックインの確認

4 週齢の N2 以降の雄マウスのゲノム DNA から得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により確認し、ノックイン変異をヘテロ接合体で有する Pod-TRECK マウスを選出した (図 2)。さらに、Pod-TRECK マウスは生後 1 年時点でジフテリア毒素 (Diphtheria Toxin: DT) を投与していない状態において、蛋白尿を示さず正常であった。また、腎臓における組織学的異常は認められず、正常マウスに比べ、成長、行動、繁殖率に差が見られなかった (data not shown)。

3-2. 蛋白尿の検出

作出した Pod-TRECK に DT を至適投与量および容量依存的なポドサイト障害を呈するかを確認するために複数の DT 量を割り振り投与し、DT 投与 7 日目の尿を採取した。尿中のアルブミン (Alb) を測定したところ、Pod-TRECK は、DT の投与により重篤な Alb 尿を呈した (図 3A)。尿中 Alb 量を画像解析ソフト Image J により定量し、尿中クレアチニン (Cre) 量で補正した上で比較したところ、Alb/Cre 比と DT の投与量には相関が認められた (図 3B)。

3-3. 腎臓の病理組織学的解析

DT 投与 2 週間後に採取した腎臓において病理組織像を確認した。DT 投与により、Pod-TRECK においては、尿細管の壊死、尿円柱の出現、および間質への炎症細胞の浸潤が確認された。また、糸球体ではポドサイトの脱落像、メサンギウム領域の拡大、血管の狭窄といった糸球体硬化の所見が認められた (図 4A)。50 ng、100 ng の DT 投与では、分節性の糸球体硬化が多く認められ、250 ng、500 ng の DT 投与では全節性の糸球体硬化や崩壊像が多く認められた。糸球体障害の程度を、糸球体硬化を指標としてスコアリングしたところ、糸球体障害の程度と DT の投与量には強い相関が認められた ($R^2=0.725$) (図 4B)

3-4. NPHS1 の発現の確認

Nephrin (NPHS1)の発現はヒト CKD および各種の腎疾患モデル動物において著しく低下し、また、ポドサイト障害時には、NPHS1 と 2 量体を形成する NPHS2 からの解離することにより、その細胞内局在が変化することが知られている [9, 36, 44, 46, 70, 75]。そこで、NPHS1 の腎臓内発現を免疫蛍光染色で確認した。免疫蛍光染色 (IF)により、非投与群では NPHS1 陽性細胞の減少は確認されなかったが、Pod-TRECK マウスでは NPHS1 陽性細胞の数が減少していることが確認された。また、DT 投与量が 50 ng、100 ng では、NPHS1 陽性細胞のドット状の分布が認められ、250 ng、500 ng では糸球体全域で NPHS1 陽性細胞の減少が認められた (図 5)。

3-5. α -SMA 陽性筋線維芽細胞の確認

Pod-TRECK での CKD への移行を調べるため IF 染色により α -SMA 陽性筋線維芽細胞の確認を行った。DT 非投与の Pod-TRECK および DT を投与した WT では、 α -SMA 陽性筋線維芽細胞の増加は認められなかった。一方で、DT を投与した Pod-TRECK では α -SMA 陽性細胞の増加が確認された (図 6)。

3-6. 尿細管間質の線維化の測定

Picrsirius Red 染色を用いて、尿細管間質の線維化を投与量別に比較した。DT 非投与群と比較して、投与後 14 日目の Pod-TRECK においては、間質領域にシリウスレッド陽性のコラーゲン線維が蓄積し、尿細管の

間質領域の線維化が認められた(図 7A)。50 ng および 100 ng の DT 投与では軽度の線維化が、250 ng および 500 ng の DT 投与では重度の線維化が認められ、線維化面積と DT の投与量には相関が認められた (図 7B)。

4. 考察

本研究では、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、ポドサイト特異的な *Nephrosis2* (*Nphs2*, *Podocin*) 遺伝子の内因性プロモーター下流にヒト由来の Heparin-binding EGF-like growth factors (HB-EGF, ジフテリア毒素レセプター) を発現させるノックインマウス Pod-TRECK の作出、およびモデル動物としての有用性の検証を行った。

作出したマウスは、DT 投与により投与 1 週間時点で重篤なタンパク尿を示した。さらに、尿中のアルブミン (Alb)/ クレアチニン (Cre) 比と DT の投与量との間に正の相関が認められた。次に、DT 投与 2 週間後に病理学的な解析を行い、糸球体では DT 投与により分節性の糸球体硬化、全節性の糸球体硬化および糸球体の崩壊が認められ、糸球体障害の程度と DT の投与量には相関が認められた。

微小変化型腎症、FSGS、ループス腎炎、糖尿病性腎症といった多様な原疾患に起因する慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease: CKD) および各種の腎疾患モデル動物において、Nephrin (NPHS1) の発現が低下し、NPHS2 からの解離によりその局在が変化することが知られている [9, 36, 44, 46, 70, 75]。本研究では、IF 染色により NPHS1 の発現を調べたところ、低容量の DT により NPHS1 の発現が低下し、その分布が顆粒状となることから、ポドサイト障害が発生していることが示された。また、高容量の DT 投与により NPHS1 の発現が消失し、ポドサイトが全て脱落していた。したがって、低容量の DT 投与がポドサイト障害モデルとして適用可能であると結論づけられた。

CKD は初期段階では原疾患に特有の病態を示すものの、特定の病変が明瞭でない場合も多い。しかし、多くの CKD 症例における最終的な共通の病理学的所見は線維化である。腎線維化は、慢性的かつ持続的な腎組織への損傷が瘢痕形成として現れ、糸球体硬化、尿細管萎縮、および尿細管間質線維化を特徴とする [90]。尿タンパクの主成分は Alb であるが、Alb 自体が病変を引き起こすのではなく、キャリアータンパクとして働いている Alb に結合する遊離脂肪酸 (FFA) が尿細管障害の原因だと考

えられている。Alb と FFA は結合状態で存在し、エンドサイトーシス後には、Alb はリソソームに移行してアミノ酸へ分解される。一方、FFA は脂肪酸結合タンパク質と共にミトコンドリアへ移行する。ミトコンドリア内で FFA が過剰に蓄積すると、活性酸素種の産生が促進され、酸化ストレスによる尿細管障害が引き起こされる [80, 85]。本モデルマウスも顕著な尿円柱及び、尿細管の萎縮、といった尿細管障害が生じているが、ポドサイト障害による Alb の濾過機構の破綻により多量の Alb が尿細管腔に漏出したためだと考えられる。また、Pod-TRECK では、DT の投与により、 α -SMA 陽性腎線維芽細胞の増殖、および広域な尿細管間質の線維化が認められ、DT 投与量と線維化の面積は相関が認められた。蛋白尿により腎線維化が引き起こされることから、高容量の DT ほど重篤なタンパク尿症を示し、尿細管間質の線維化が引き起こされることが示された。

これらの結果から Pod-TRECK は DT の腹腔内単回投与により簡便に投与量依存的なポドサイト特異的傷害を誘発しヒトとよく近似した様々なステージの CKD モデル動物となりうることを示された。

5. 図表

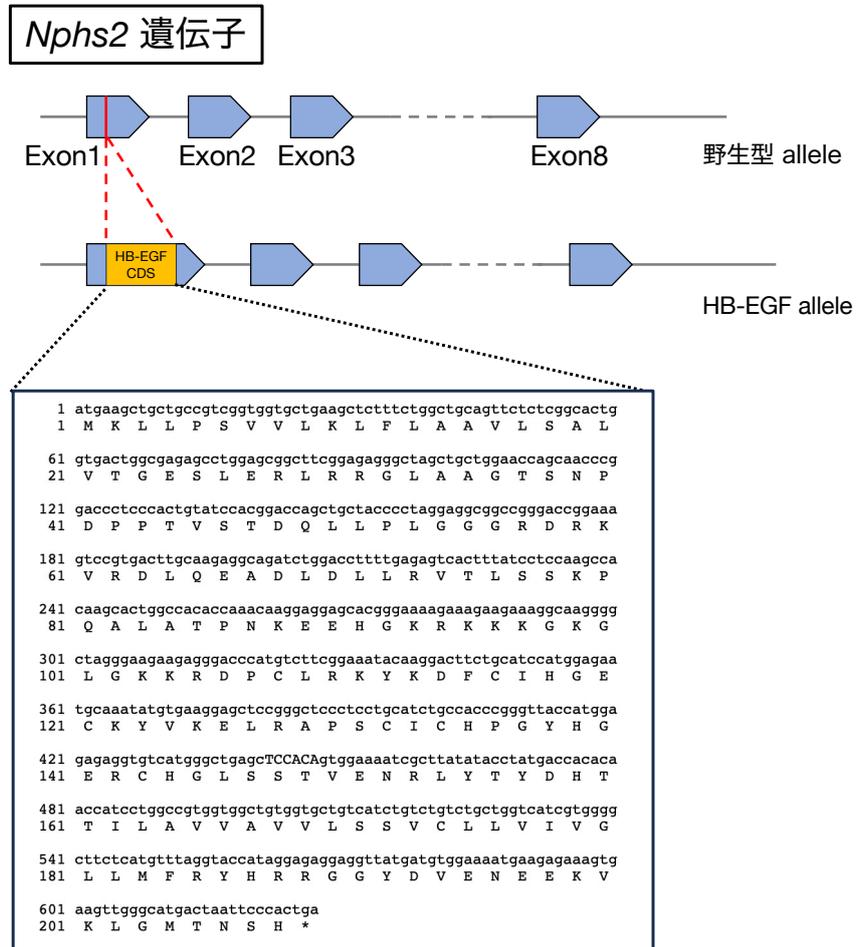
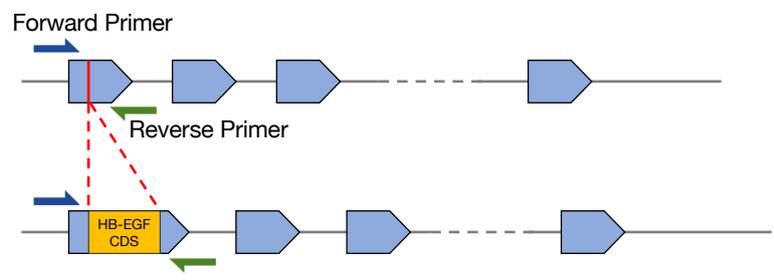


図 1. 導入変異の概略図

Nphs2 遺伝子のプロモーター下流に Heparin-binding EGF-like growth factors (HB-EGF) 遺伝子断片を挿入した。挿入した cDNA は L148S/P149T 変異を有しており、ジフテリア毒素 (DT) と親和性は保持されるが、分泌型 HB-EGF として機能しないため、当該レセプターの EGF 受容体を活性化しない。

A.



B.

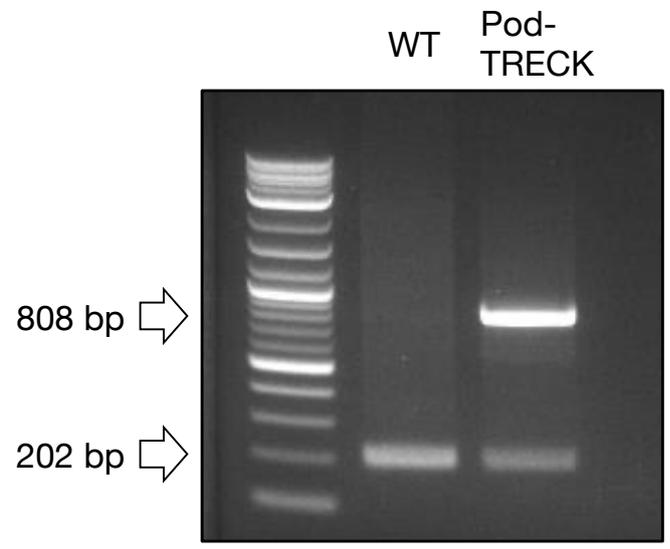
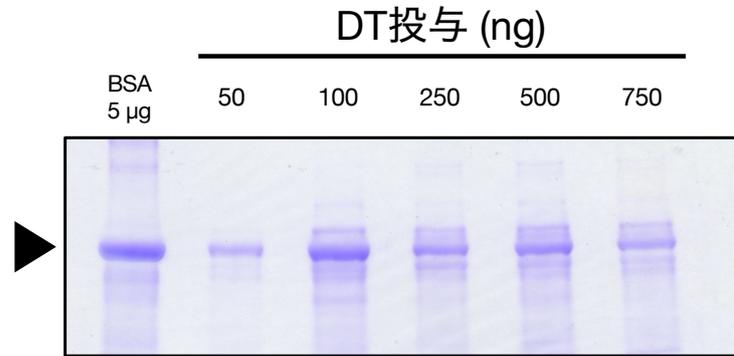


図 2. 遺伝子型判別

A. Pod-TRECK の遺伝子型を確認するために HB-EGF を挟んだ領域を増幅するプライマーを設計した (Forward Primer: 5'-AGAAAGCTGGG GCTGCGACTCT-3'、Reverse Primer: 5'-CTCTGCCGCTCTGCTCCAGGCAT-3')。B. PCR 産物を 0.8%アガロースゲルで電気泳動し、バンドが 1 本 (202bp)である個体は野生型 (WT)、2 本 (808, 202bp)である個体は Pod-TRECK である。

A.



B.

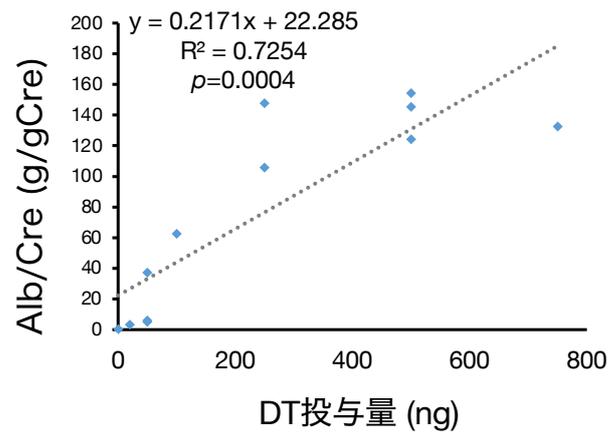


図 3. 尿中 Alb の測定

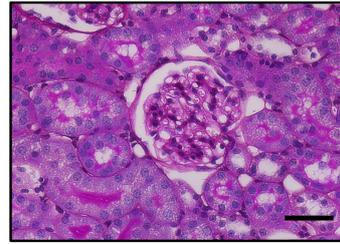
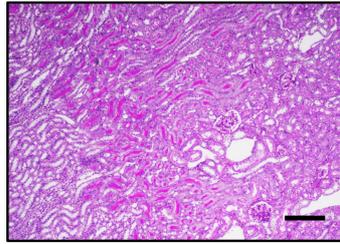
A. 尿中 Alb の検出 (BSA: Bovine serum albumin) B. Alb/クレアチニン (Cre)比と DT の投与量には有意な正の相関が認められた ($n = 12$, $p = 0.0004$)

A.

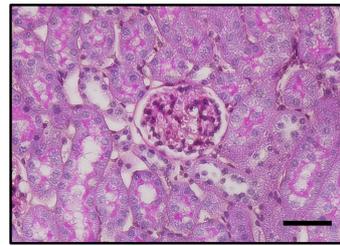
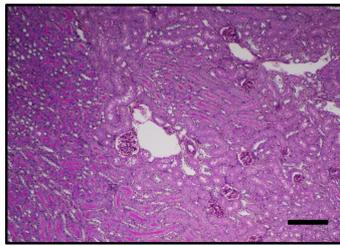
WT
DT 500 ng

腎皮質

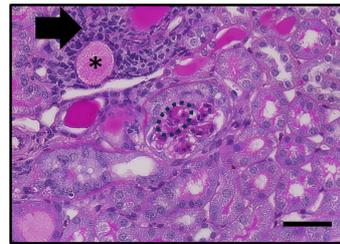
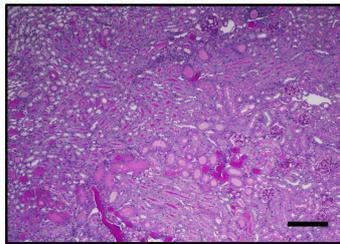
糸球体



Pod-TRECK
コントロール



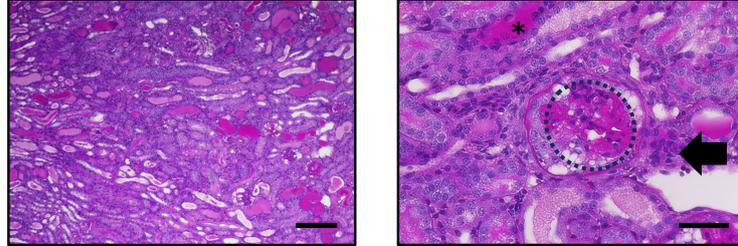
Pod-TRECK
DT 50 ng



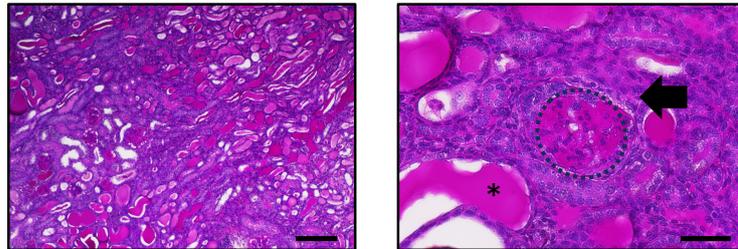
200 μ m

50 μ m

Pod-TRECK
DT 100 ng



Pod-TRECK
DT 250 ng



200 μm

50 μm

B.

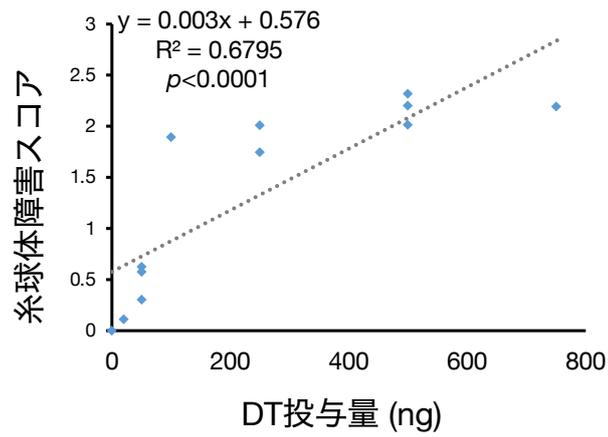
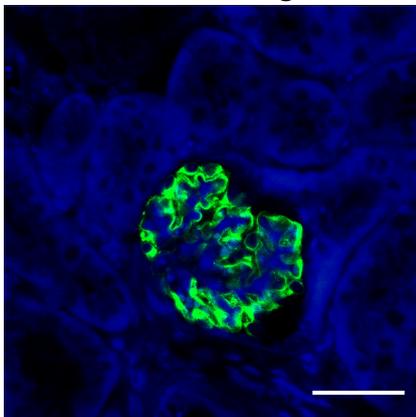


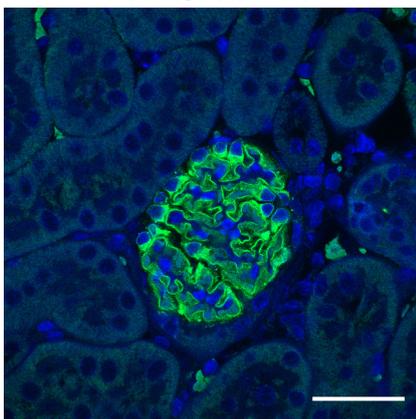
図 4. 組織学的解析

A. Pod-TRECK において、尿細管の壊死、尿細管腔の尿円柱 (*) の出現、間質への炎症細胞の浸潤 (矢印) が認められ、糸球体ではポドサイトの脱落像やメサンギウム領域の拡大及び血管の狭窄といった糸球体硬化 (丸点線) の所見が認められた。倍率 左: $\times 100$ 、右: $\times 400$ 、スケールバーはそれぞれ 200, 50 μm を示す。B. 糸球体障害スコアと DT の投与量には有意な正の相関が認められた ($n = 12, p < 0.0001$)

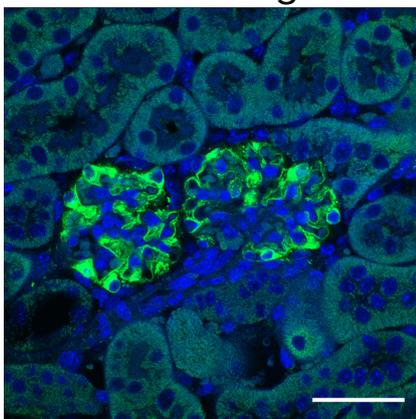
WT
DT 500 ng



Pod-TRECK
コントロール

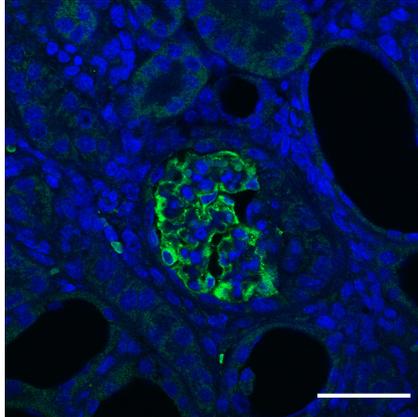


Pod-TRECK
DT 50 ng

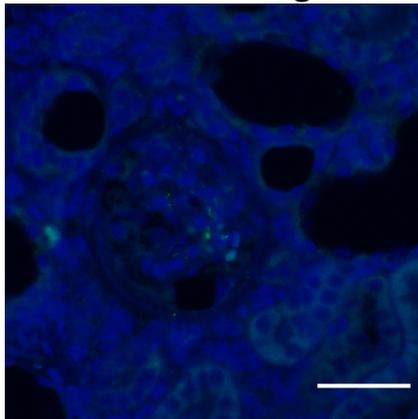


50 μ m

Pod-TRECK
DT 100 ng



Pod-TRECK
DT 250 ng

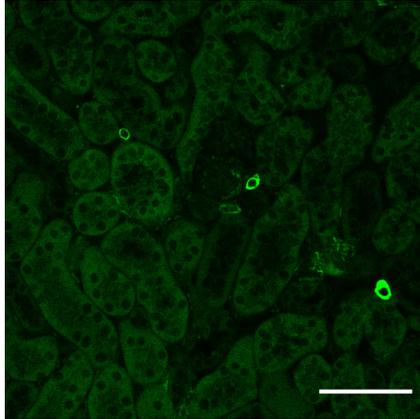


50 μ m

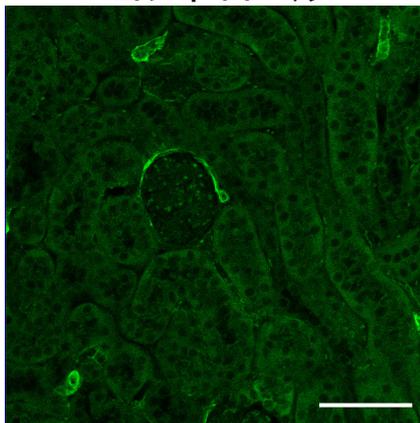
図 5. 抗 NPHS1 抗体による免疫蛍光染色 (IF) 像

DT 投与 Pod-TRECK では、NPHS1 陽性細胞の減少が認められた。特に 250 ng、500 ng では糸球体全域で NPHS1 陽性細胞の減少が認められた。また低容量の DT 投与では、顆粒状の染色像を示した。スケールバーは、50 μ m を示す。

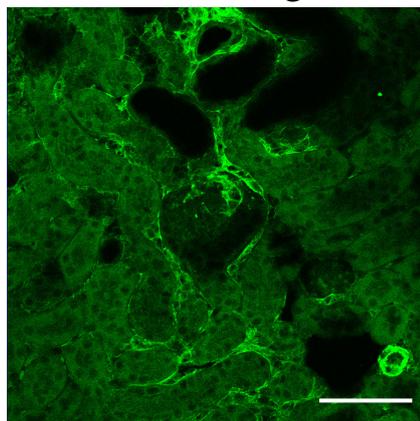
WT
DT 500 ng



Pod-TRECK
コントロール

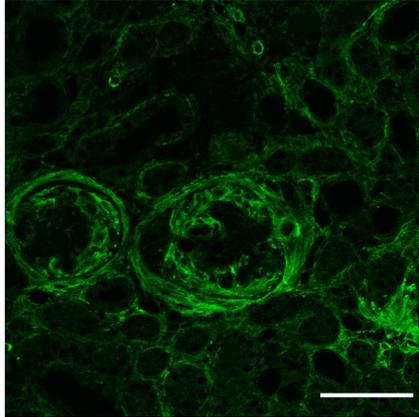


Pod-TRECK
DT 50 ng

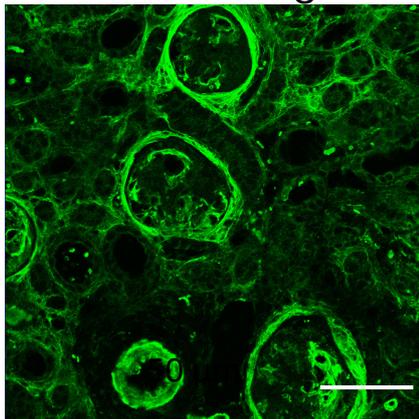


50 μ m

Pod-TRECK
DT 100 ng



Pod-TRECK
DT 250 ng



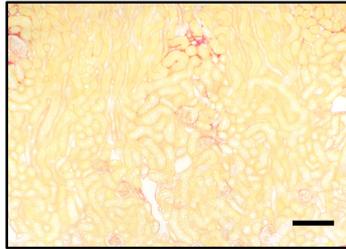
50 μ m

図 6. 抗 α -SMA 抗体による IF 像

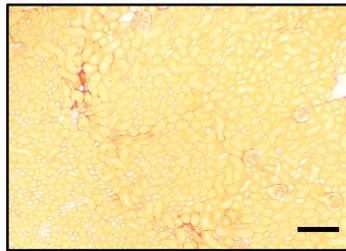
DT 投与 Pod-TRECK では α -SMA 陽性の筋線維芽細胞の増加が認められた。スケールバーは、50 μ m を示す。

A.

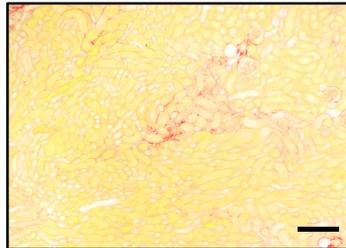
WT
DT 500 ng 腎皮質



Pod-TRECK
コントロール

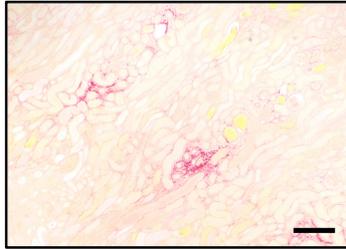


Pod-TRECK
DT 50 ng

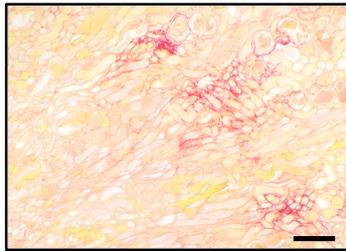


200 μ m

Pod-TRECK
DT 100 ng



Pod-TRECK
DT 250 ng



200 μ m

B.

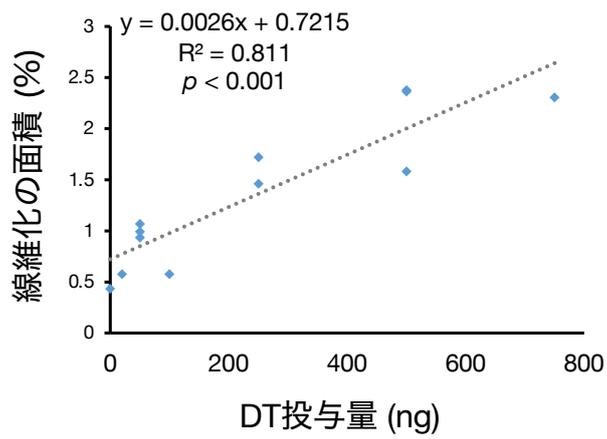


図 7. 腎皮質における線維化の定量

A. DT 投与後 14 日目の Pod-TRECK において、間質領域にシリウスレッド陽性のコラーゲン線維が蓄積し、尿細管の間質領域の線維化が認められた。50 ng、100 ng では軽度、250 ng、500 ng では重度の線維化であった。スケールバーは 100 μm を示す。B.尿細管間質の線維化と DT の投与量には有意な正の相関が認められた ($n = 12, p < 0.001$)

VI. 第3章

B6-*Prkdc*^{R2140C}、及び Pod-TRECK の比較解析

1. 緒論

近年に至るまで、科学は仮説を立てて検証する、いわゆる「仮説先行」のサイクルを繰り返すことで進展してきた。しかし、この人によるバイアスを許容する手法は、特定の領域への関心が集中し、一部の領域の研究が顕著に進展する一方で、他の重要な領域が未踏のままであることもある。例えば、上位 100 個の分子に関する研究は、全論文の 4 分の 1 を占めているが、一報も論文がない分子は数千にも上る。近年、次世代シーケンサーやバイオインフォマティクス技術の進展により、仮説形成よりも先に偏りのないデータを取得するケースが増えている。つまり、研究方法はデータ取得に始まり、その後、仮説を立て、検証するという「データ先行」のサイクルに変化しつつある。これに伴い、RNA-sequencing (RNA-seq) 解析やプロテオーム解析などのオミックス解析における大規模データの収集が、日増しに重要になってきている [100]。

RNA-Seq 解析は、遺伝子発現を定量化するための強力な手法である。この手法は次世代シーケンサー (Next Generation Sequencing: NGS) を利用し、細胞内に存在する全 mRNA の塩基配列を読み取ることによって実施される。このプロセスを通じて、遺伝子発現の包括的なプロファイルが提供されるのである [59, 87]。一方、プロテオーム解析は、微量のタンパク質断片の質量を正確に測定する技術である。この技術では、種々の電気泳動やクロマトグラフィーを組み合わせ、分離されたタンパク質を断片化し、その質量を測定する。その後、得られたデータはゲノム解析から推定されるタンパク質のアミノ酸配列と比較され、タンパク質を同定することが可能である [43, 77]。

本章では、第 1 章および第 2 章で作出した、アドリアマイシン (ADR) およびジフテリア毒素 (DT) 投与による 2 つのポドサイト障害モデルで発現変

動を示す遺伝子およびタンパク質を比較する目的で、ADR および DT 投与 1 週間後の腎臓を対象に RNA-seq 解析およびプロテオーム解析を実施した。このオミックス解析により作成された分子的な基盤は、今後の腎臓病研究における重要な足がかりとなることが期待される。

2. 材料・方法

2-1. 実験供与マウス

すべてのマウスは Specific Pathogen Free (SPF) 環境下で飼育し、室温 22±4 °C、湿度 40-60% に維持し、12 時間の明暗サイクルで飼育した。水および標準飼料 CE-2 (CLEA Japan, Tokyo, Japan) は、自由摂取とした。

2-2. ADR および DT の投与

第 1 章および、第 2 章で作出した B6-*Prkdc*^{R2140C} および、Pod-TRECK を実験に使用した。8 週齢の雄の B6-*Prkdc*^{R2140C} に ADR を 13 mg/kg で尾静脈から投与した。対照コントロールとして等量の生理食塩水を尾静脈から投与した同腹仔の B6-*Prkdc*^{R2140C} を用いた。また、8 週齢の雄の Pod-TRECK に DT を 50 ng 腹腔内に投与した。対照コントロールとして等量の生理食塩水を腹腔内投与した同腹仔の Pod-TRECK を用いた。

2-3. 腎臓の採取

ADR および DT 投与 1 週目のマウスに三種混合麻酔 [塩酸メデトミジン 0.75 mg/kg (日本全薬工業, Fukushima, Japan)、ミダゾラム 4 mg/kg (サンド株式会社, Tokyo, Japan)、酒石酸ベトルファノール 5 mg/kg (Meiji Seika ファルマ株式会社, Tokyo, Japan)、生理食塩水 (大塚製薬, Tokyo, Japan)] をマウスの体重 1 kg 当たり 10 ml を腹腔内投与して麻酔し [42]、後大静脈から放血し安楽殺を行い、腎臓を摘出した。

2-4. 組織学的解析

採取した腎臓 (右腎) を 4% パラホルムアルデヒド (PFA) で固定し、パラ

フィンで包埋した後、2 μm の厚さで薄切した。その後、薄切したスライドを脱パラフィン、流水洗、0.5% 過ヨウ素酸液 (5 分)、蒸留水で洗浄、ワールドシッフ液 (富士フィルム和光純薬, Osaka, Japan) (30 分)、重亜硫酸水 (3 分、3 回)、流水洗、ヘマトキシレン (4 分)、流水洗、蒸留水で洗浄、透徹、封入の順に行った。染色像は倒立顕微鏡 (ECLIPSE, Nikon, Tokyo, Japan)を用いて画像化した。

2-5. IHC 染色

パラフィン包埋ブロックを 5 μm の厚さで薄切した。抗原賦活試薬 (Immunosaver: Nissin EM, Tokyo, Japan)中で 98°C、45 分間インキュベートすることにより抗原賦活を行った。内因性ペルオキシダーゼを不活性化するため、切片を 3% 過酸化水素 (H_2O_2)で 30 分間インキュベートした。10% 正常ヤギ血清で 30 分間ブロッキングした後、切片をウサギポリクローナル抗 NPHS1 抗体 (1:4000, Proteintech, IL, USA)で 4 °Cで一晩インキュベートした。切片をペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (418261, Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan)と 30 分間反応させ、3, 3-diaminobenzidine (DAB: 040-27001, Wako, Tokyo, Japan)により染色した。染色像は倒立顕微鏡 (ECLIPSE, Nikon, Tokyo, Japan)を用いて画像化した。

2-6. RNA-seq 解析

各系統 (ADR 非投与 B6-*Prkdc*^{R2140C}、ADR 投与 B6-*Prkdc*^{R2140C}、DT 非投与 Pod-TRECK、DT 50ng 投与 Pod-TRECK)から採取した腎臓 (左腎頭側 1/2)を用いて、NucleoSpin® RNA (タカラバイオ, Shiga, Japan)によって添付された手順に従い、RNA の抽出を行った。抽出した

RNA を RNA-seq 解析に使用した。RNA-seq 解析は GENEWIZ 社 (Tokyo, Japan) の受託解析サービスを使用した (Illumina NovaSeq 2x150bp configuration, 6Gb per sample)。シーケンサーは NovaSeq 6000 System (Illumina, CA, USA) を使用し、Poly-A 選択法によるストランド特異的 RNA-seq 解析を行った。遺伝子発現解析は負の二項分布に基づくモデルである DESeq2 Bioconductor パッケージによって Different expression gene analysis を行った。遺伝子の Padj は < 0.01 に設定し、発現量の差があるものを抽出した。

2-7. プロテオーム解析

RNA-seq と同時に採取した腎臓 (左腎尾側 1/2) を用いてプロテオーム解析を行った。プロテオーム解析は株式会社プロテオバイオロジクス (Osaka, Japan) の受託解析サービスを使用した (標準感度 DIA 解析)。サンプルに PTS buffer (終濃度 12 mM sodium deoxycolate, 12 mM sodium lauroyl-sarcosinate, 50 mM Ammonium bicarbonate, Complete EDTA-free) を加えて溶解、95°C 5 分で失活させた。PTS buffer で 50µg / 100µL にノーマライズし 500mM TCEP を 1/20 (v/v) 量加えて室温で 60 分間インキュベートし、500mM ヨードアセトアミド 1/10 (v/v) 量加え、室温で 30 分間遮光してインキュベート、525 mM L-Cysteine 1/10 (v/v) 量加え、室温で 10 分間インキュベートした。その後、SeraMag Speed Beads を用いてタンパク質を精製し、80% エタノールで洗浄し、Lys-C (2mAU/µL)、トリプシン (1µg/µL) 溶液を添加し、37°C で 1 晩インキュベートした。次に、20% TFA を添加し、酸性にした後、各ペプチド 10µg 分を StageTip を用いて精製、スピードバックで乾固、10µL の Buffer (0.1% ギ酸 2% アセトニトリル) に再溶解したものを LC-MS/MS 解析に使用した。試料調製されたサンプルは以下の分析条件で測定を行った。

試料調製されたサンプルは以下の分析条件で測定を行った。

A. LC 分析条件

カラム：インハウスで充填した逆相カラム

(ReproSil -Pur 120 C18-AQ1.9 μ m resin, Length 300mm \times I.D. 75 μ m)

ナノトラップカラム：Acclaim C18 PepMap100 5 μ m 100A (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)

移動相 A：2%アセトニトリル 0.1%ギ酸添加蒸留水

移動相 B：90%アセトニトリル 0.1%ギ酸添加蒸留水

流速：280 μ L

カラム温度：60 $^{\circ}$ C

注入量：0.5 μ g

B. MS 条件

System: Q Exactive Plus 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)

イオン化法：Positive

Method Duration (min)= 120

Spectrum data type = Profile

得られたデータは DIA-NN 1.8 を用いてタンパク質同定・定量解析を行った。

2-8. 取得データの解析

オミックス解析により取得したデータの解析に関して、ヒートマップ作成およびクラスタリング解析は Heatmapper (<http://www.heatmapper.ca>)を用いて行った [8]。

3. 結果

3-1. 腎臓病理組織学的所

アドリマイシン (ADR) およびジフテリア毒素 (DT) を投与した B6-*Prkdc*^{R2140C} および Pod-TRECK は投与 1 週間の時点で著しい蛋白尿を示した (data not shown)。また、Periodic Acid Schiff (PAS) 染色による病理組織学的解析を行ったところ、ADR および DT の投与により B6-*Prkdc*^{R2140C} および Pod-TRECK は糸球体ではメサンギウム領域の軽度の拡大は認められるものの形態的な変化はほとんど認められず、尿細管および間質では、尿細管の壊死、尿円柱の出現、および間質への炎症細胞の浸潤が確認された。尿円柱および炎症細胞の浸潤は B6-*Prkdc*^{R2140C} でより重度であった (図 1)。

3-2. NPHS1 の発現

PAS 染色による形態の観察では糸球体の異常がほとんど認められなかったため、糸球体障害を確認するために Nephtrin (NPHS1) による IHC を行った。ADR および DT の投与により B6-*Prkdc*^{R2140C} および Pod-TRECK では、NPHS1 の発現の低下が認められた (図 2)。

3-3. RNA-seq 解析による遺伝子発現解析

ADR および DT 投与による 2 つのポドサイト障害モデルで発現変動を示す遺伝子を比較する目的で、ADR および DT 投与一週間後の腎臓を対象に RNA-seq 解析を行った。その結果、ADR 腎症においては 1163 種類、Pod-TRECK においては 114 種類の遺伝子で有意な発現変動が認められた。

3-4. Gene Ontology (GO)解析

RNA-seq 解析によって得られた遺伝子発現データに関して、GO 解析を行った。GO 解析の結果は図 3 に示すように、ADR 腎症では、Cellular component (遺伝子産物が機能を果たす細胞構造の位置や細胞区画) に関する GO term で多くの遺伝子の発現の有意な変動が認められている。一方で、Pod-TRECK の Cellular component に関する GO term では、Extracellular region のみ有意な遺伝子群の発現変動が認められた。

3-5. AKI 関連遺伝子の解析

ADR は、尿細管も直接的に障害し、尿細管障害を引き起こす。急性腎障害 (Acute Kidney Injury: AKI)は尿細管障害を主徴とし、ADR 腎症モデルは AKI から CKD へ移行するモデルとして有用であることが予測される。そこで、先行研究 [49]から明らかとなっている AKI に関連する遺伝子の発現量を調べ図 4 に示した。AKI 関連タンパクとして ADR 腎症モデルでは *Fabp1* (B6-*Prkdc*^{R2140C}, 2.50 倍 : Pod-TRECK, 0.95 倍), *Timd2* (B6-*Prkdc*^{R2140C}, 2.50 倍 : Pod-TRECK, 0.95 倍), *Tgf-β1* (B6-*Prkdc*^{R2140C}, 2.50 倍 : Pod-TRECK, 0.95 倍), *Hif1a* (B6-*Prkdc*^{R2140C}, 2.50 倍 : Pod-TRECK, 0.95 倍), *Havcr1* (B6-*Prkdc*^{R2140C}, 2.50 倍 : Pod-TRECK, 0.95 倍), *Vcam1* (B6-*Prkdc*^{R2140C}, 2.50 倍 : Pod-TRECK, 0.95 倍), *Nfe2l2* (B6-*Prkdc*^{R2140C}, 2.50 倍 : Pod-TRECK, 0.95 倍)等の遺伝子の発現が上昇し、*Vegfa* (B6-*Prkdc*^{R2140C}, 2.50 倍 : Pod-TRECK, 0.95 倍)の発現が低下していた。

3-6. プロテオーム解析

ADR および DT 投与による 2 つのポドサイト障害モデルで発現変動を示

タンパク質を比較する目的で、ADR および DT 投与一週間後の腎臓を対象にプロテオーム解析を実施した。その結果、B6-*Prkdc*^{R2140C} では、6845 種類、ADR 投与 B6-*Prkdc*^{R2140C} では 6822 種類、Pod-TRECK では 6850 種類、DT 50ng 投与 Pod-TRECK では 6794 種類のタンパクが同定・定量された。コントロール個体と比較して、発現量が 2 倍以上に上昇したタンパクは Pod-TRECK で 145 種、ADR 腎症では 336 種であった。また、発現量が 1/2 以下に低下したタンパク質は Pod-TRECK で 131 種、ADR 腎症では 160 種であった

4. 考察

第 1 章および第 2 章の結果を踏まえ、本章ではアドリアマイシン (ADR) 腎症および Pod-TRECK モデルを用いて、ADR およびジフテリア毒素 (DT) の投与 1 週間後の初期病態における組織学的解析、RNA-seq 解析、プロテオーム解析を行い、両モデルの比較を行った。まず、組織学的解析による腎障害の比較を行ったところ、ADR 腎症および Pod-TRECK モデルで共に尿細管障害が認められた。尿細管の壊死、尿円柱の出現、および間質への炎症細胞の浸潤が特徴であった。しかし、ADR 腎症モデルでは尿円柱および炎症細胞の浸潤がより多く認められた。一方、糸球体の形態的な異常はほとんど認められなかったため、抗 Nephrin (NPHS1) 抗体を用いた IHC で糸球体障害の程度を評価した。その結果、ADR および DT の投与により、*B6-Prkdc^{R2140C}* および Pod-TRECK で糸球体障害が見られた。これらの結果から、ADR 腎症では ADR による尿細管への直接的な障害で炎症が強く起こっていることが示唆された。

次に、RNA-seq 解析により両モデルでの発現が変動した遺伝子を明らかにした。Pod-TRECK では 247 の遺伝子に有意な発現変動が認められた一方、ADR 腎症モデルでは 1424 の遺伝子で有意な変動が認められた。変動が認められた遺伝子による Gene ontology (GO) 解析では、ADR 腎症の GO Cellular component の GO term では細胞膜やオルガネラ、細胞外領域など広範囲にわたって遺伝子群の変動が認められた。したがって、ADR 腎症では ADR による広範な細胞毒性が様々な細胞画分に影響を及ぼしていることが示唆された。一方、Pod-TRECK の GO Cellular component の GO term では細胞外領域のみで有意な遺伝子群の発現変動が認められ、*Fgll*, *Apcs*, *Thbs4*, *Hpx* が有意な発現の上昇が認められた。これらの遺伝子はいずれもコラーゲンの産生および線維化の進展に

関与している [27, 48, 60, 63]。したがって、Pod-TRECK は CKD の線維化に至る過程をより精確に再現するモデルとして有効であることが示唆された。

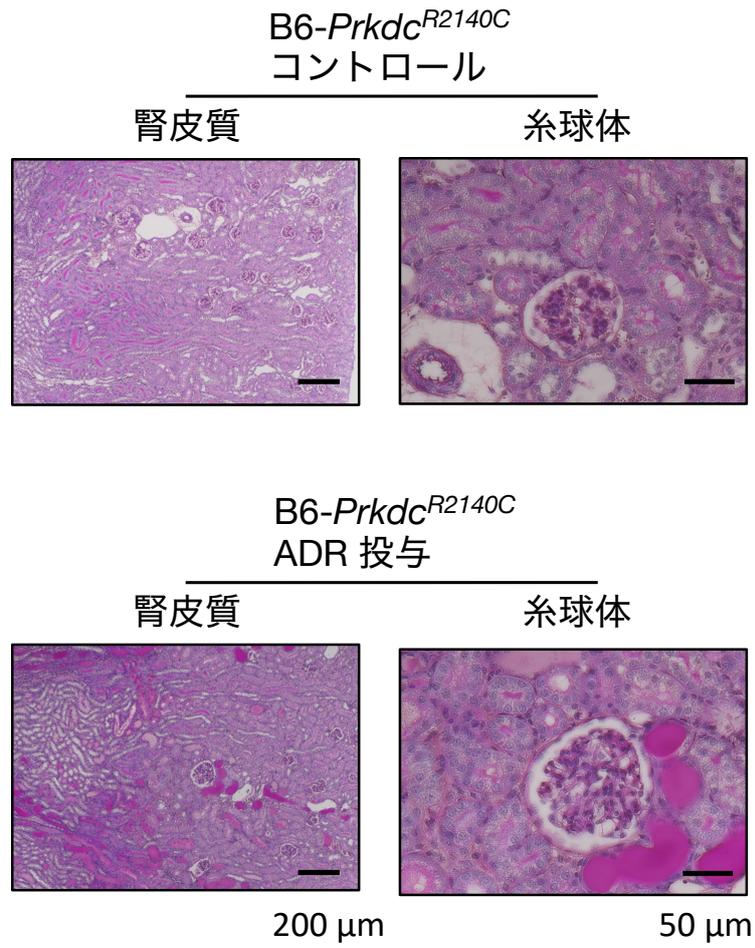
続いて、AKI に関連する遺伝子の発現量を比較した結果、ADR 腎症モデルが AKI to CKD モデルとして有用であることが示唆された。AKI は急激な腎機能低下を特徴とし、これにより腎不全が引き起こされ、生命維持のために透析または腎移植が必要とされる [73, 79]。最近の研究では、AKI が CKD および ESRD の進行と関連していることが示されており、AKI が CKD を進行させた場合の死亡率は高いと疫学調査で明らかになっている (AKI to CKD transition) [14, 16]。AKI to CKD transition には、尿細管細胞周期の異常、血管内皮の損傷、エピジェネティクス、ミトコンドリア機能の異常、レニンアンギオテンシン系の異常活性化、炎症の持続などが関与している [49]。特に尿細管上皮細胞が G2/M 期に停止している場合、大量の TGF- β 1 が産生され、隣接する線維芽細胞やペリサイトを活性化し、筋線維芽細胞型細胞への変化を促し、間質の線維化を促進する [96]。さらに、HIF-1 α によって誘導される血管内皮成長因子 (*Vegf*) の発現上昇は死亡リスクの低下と関連している [21, 41, 56]。ADR 腎症モデルでは、上述した遺伝子の発現量が Pod-TRECK とは異なり、大きく変動していた。したがって、ADR 腎症モデルが AKI to CKD モデルとして有用であることが本研究において初めて確認された。

最後に、プロテオーム解析を行い、両腎症モデルで発現が変動しているタンパクを網羅的に同定した。プロテオーム解析においても、ADR 腎症で尿細管障害マーカーである NGAL [40] および KIM1 [39, 97] の発現の上昇が認められた。両モデルで共通して発現が上昇したタンパク質は 3 種類、減少したタンパク質は 22 種類であった。これらのタンパクでは既に CKD と

の関与が報告されているものがあるが、例えば、共通して上昇していたタンパクとして EPHA2 は腎障害時の回復に寄与し [55]、MMP2 は CKD の進行に寄与する [15]。一方、共通して減少したタンパクとして EMP2 は変異により遺伝性のネフローシスを呈する [31]。その他の共通して変化したタンパクに関しても CKD との関わりが示唆されるため、今後さらなる解析が必要である。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されれば、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。

結論として、マウス ADR 腎症が AKI-to-CKD transition のモデルとしても有効であることが示唆された。一方で、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評価できる。さらに、本章で行われたオミックス解析によって明らかになった分子的な基盤は、将来の腎臓病研究にとって重要な足がかりとなると考えられる。

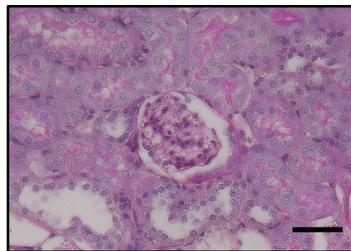
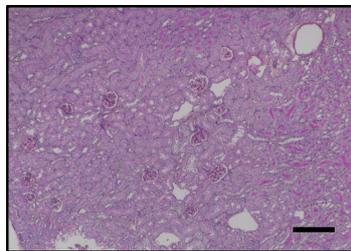
5. 図表



Pod-TRECK
コントロール

腎皮質

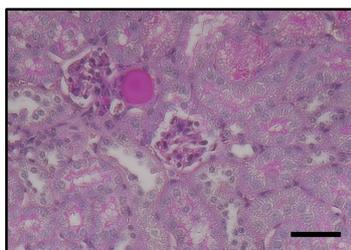
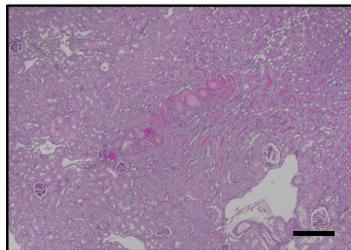
糸球体



Pod-TRECK
DT 投与

腎皮質

糸球体



200 μ m

50 μ m

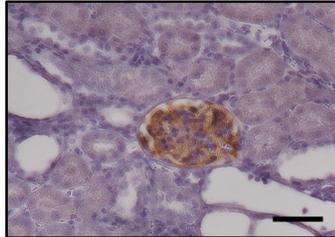
図 1. 組織学的解析

ADR 腎症モデルおよび Pod-TRECK において、尿細管の壊死、尿細管腔の尿円柱の出現、間質への炎症細胞の浸潤が認められ、糸球体では軽度なメサンギウム領域の拡大が認められた。倍率 左 : $\times 100$ 、右 : $\times 400$ 、スケールバーはそれぞれ 200, 50 μm を示す。

B6-Prkdc^{R2140C}
コントロール



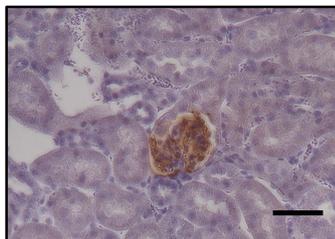
B6-Prkdc^{R2140C}
ADR 投与



Pod-TRECK
コントロール



Pod-TRECK
DT 投与

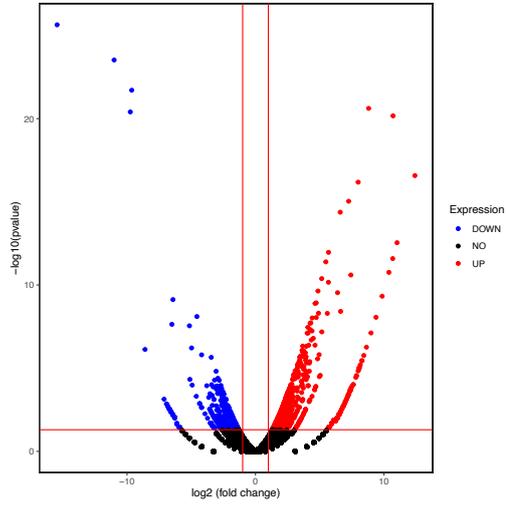


50 μm

図 2. 抗 NPHS1 抗体による免疫組織化学 (IHC) 染色像

ADR 腎症モデルおよび Pod-TRECK において、NPHS1 陽性細胞の減少が認められた。

B6-Prkdc^{R2140C}



Pod-TRECK

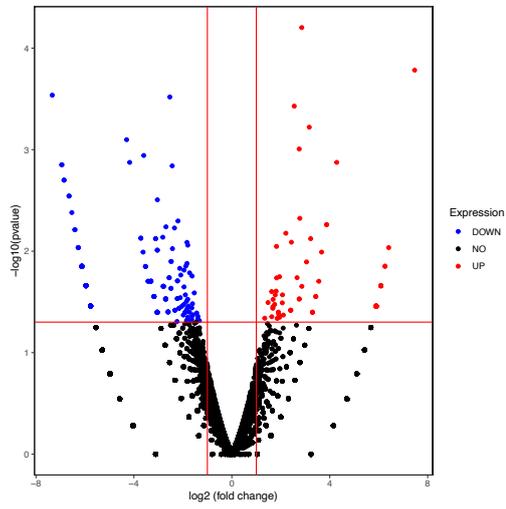
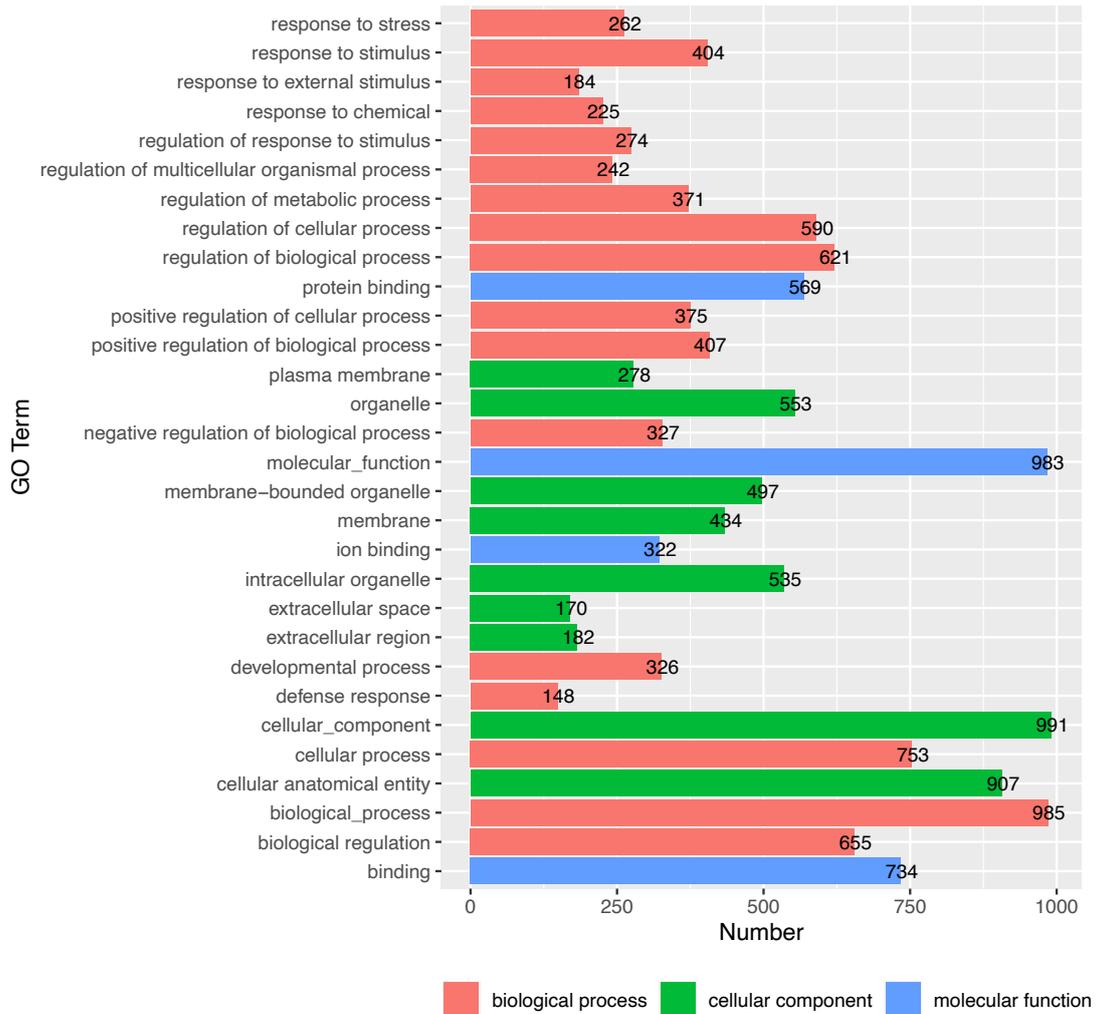


図 3. ADR 腎症モデルおよび Pod-TRECK の発現変動遺伝子

RNA-seq 解析の結果、ADR 腎症においては 1163 種類、Pod-TRECK においては 114 種類の遺伝子で有意な発現変動が認められた ($n = 1$)。

B6-Prkdc^{R2140C}



Pod-TRECK

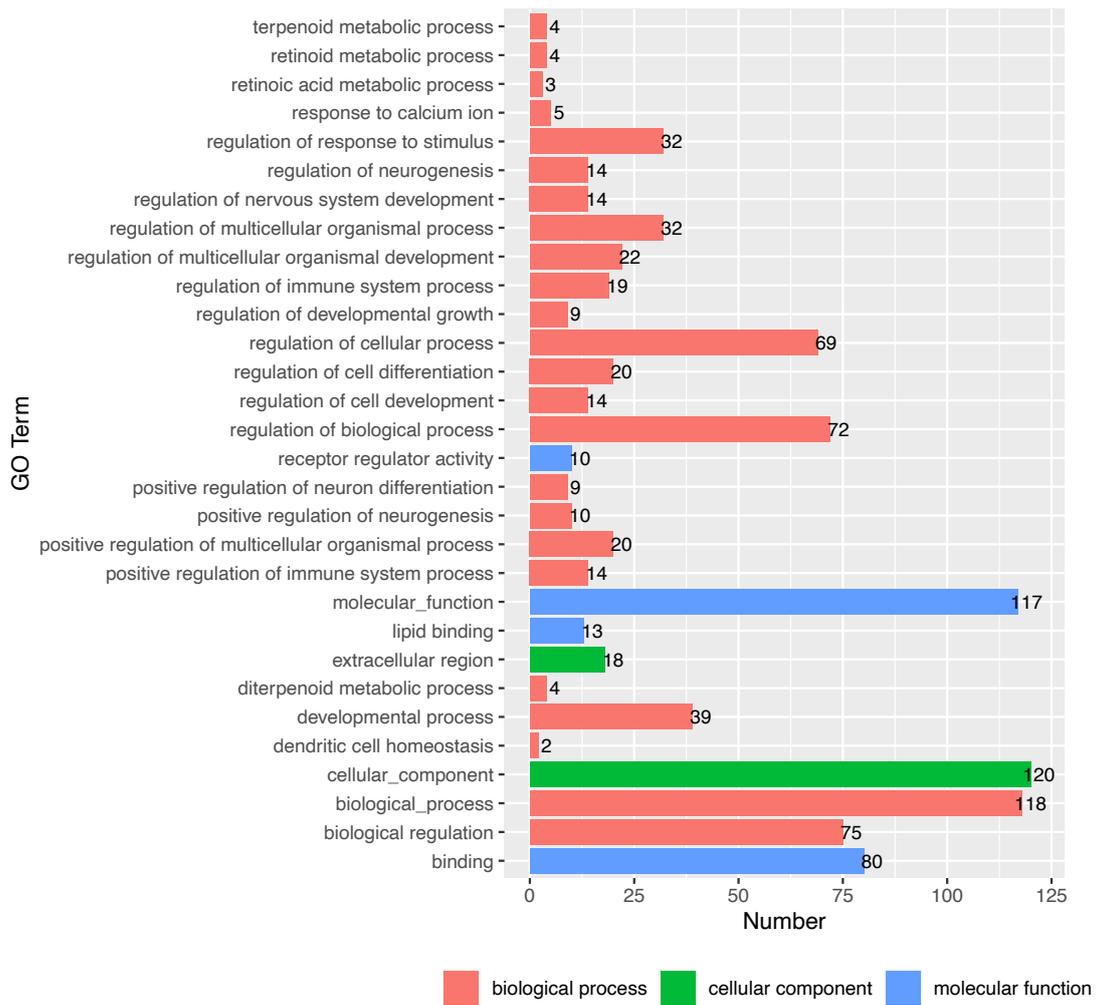


図 4. Gene Ontology (GO)解析

RNA-seq 解析で有意な発現変動を示した遺伝子による GO 解析を行った。A. B6-*Prkdc*^{R2140C} コントロール vs. B6-*Prkdc*^{R2140C} ADR 投与。B. Pod-TRECK コントロール vs. Pod-TRECK DT 投与

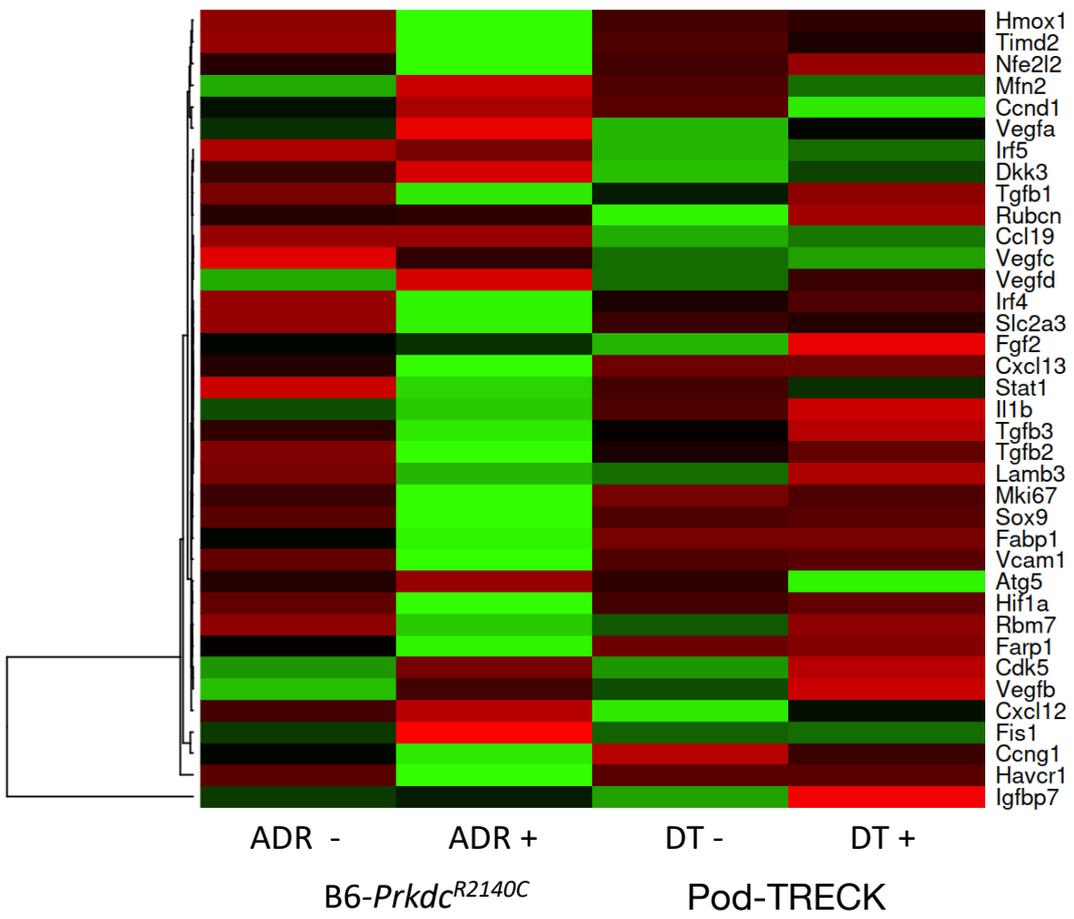
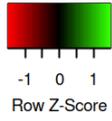


図 5. 急性腎障害 (AKI) 関連遺伝子の発現解析

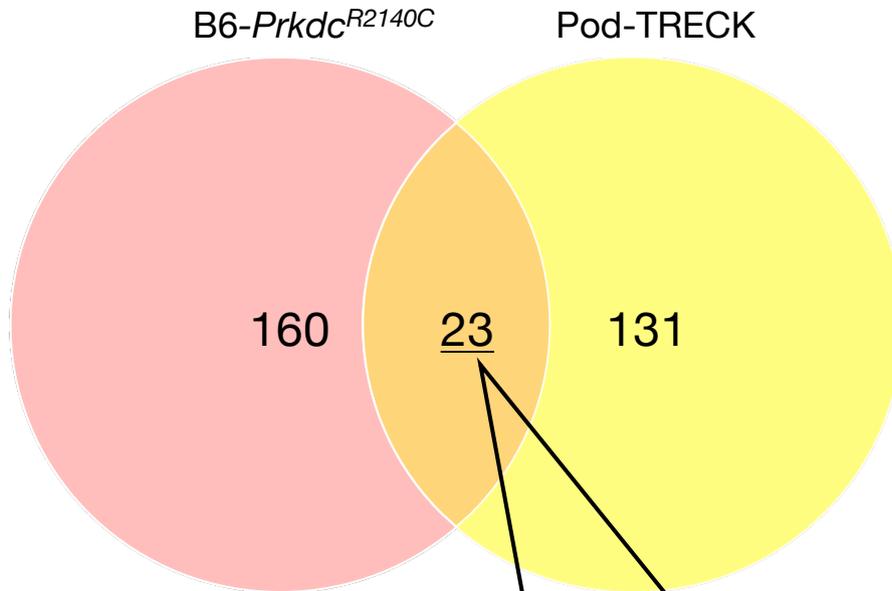
AKI 関連遺伝子の発現変動を示したヒートマップ.

UP Regulated



ACSBG1	ADGRL4	AMY1	ANGPTL3	APOC3
APOF	CA13	CRP	CSF1R	EGFL7
EPHA2	FBXW5	FKBP11	FPGT	FTL1
GNB3	HAGHL	IGSF5	MBNL2	MED15
MMP2	NAA11	NAA38	NFAT5	NUDT22
OBP1A	RIOK2	RPL9	SCGB1A1	SEC11C
TTC17	TTR	WDR4		

DOWN Regulated



AKAP8L	BTBD7	CADPS2	CLIC6	CLOCK
DHX57	EMCN	EMP2	FGD3	GTPBP2
LPAR3	LVRN	MARVELD1	MFSD6	MKNK1
MPP2	PPHLN1	RGS3	RNASEK	SFXN4
TUBB1	TYMS			

図 6. プロテオーム解析

コントロール個体と比較して、2倍以上発現量が上昇したタンパクがADR腎症では336種、Pod-TRECKで145種であり、発現量が1/2以下となっているタンパクはADR腎症では160種、Pod-TRECKで131種であった。両モデルで共通して発現が上昇したタンパク質は33種類、減少したタンパク質は22種類であった。

VII. 総括

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、腎機能を示す指標である糸球体濾過量 (Glomerular Filtration Rate : GFR)が 60 mL/分/1.73m² 未満であるか、あるいは腎臓の傷害マーカー (蛋白尿等)の上昇が認められ、いずれも 3 ヶ月以上続く状態を示す。GFR が 15mL/分/1.73m² 未満となり、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 は糖尿病、高血圧、心疾患といった重要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、多くの場合、糸球体障害に続く蛋白尿症、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、ボーマン嚢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。ポドサイトに障害が生じると、スリット膜構造の機能不全が生じて血中タンパクが漏出し、タンパク尿が生じるが、ポドサイトは再性能を持たず、その障害により、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アマイシン (Adriamycin : 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である。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うる。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 *Nephrosis2 (Nphs2)* 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とその後、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、尿中のアルブミン量は DT の投与量に依存した増加が認められ、DT の投与量を変動させることで、軽度～重度までのポドサイト特異的な傷害を誘発し、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可能となった。

第 3 章 本研究において、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本研究において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されれば、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。

VIII. 謝辞

本学位論文を取りまとめるにあたり多くの方々のご支援およびご指導を賜りました。お世話になった皆様方に深く感謝の意を表します。

はじめに、北里大学獣医学部実験動物学研究室に配属されてから今日に至るまで、佐々木 宣哉 教授には研究の手法から論文の執筆まで研究に関するあらゆることをご指導いただきました。終始変わらぬ懇切丁寧なご指導ご鞭撻を賜りましたこと厚く御礼申し上げます。

また、ノックアウトマウス作製等、格別なる御支援、御協力、貴重なコメントを賜りました、国立国際医療研究センター研究所、岡村 匡史 室長、中野 堅太 専任研究員、に心より御礼申し上げます。

本研究遂行にあたりご助力いただき、温かい励ましを頂きました北里大学獣医学部実験動物学研究室、佐々木 隼人 講師および北里大学獣医学部実験動物学研究室の皆様我心から感謝を申し上げます。

本論文を査読いただき、大変有意義なご助言を賜りまして、北里大学獣医学部獣医生化学研究室、折野 宏一 教授、鹿児島大学共同獣医学部獣医学科、浅野 淳 教授、茨城大学 農学部食生命科学科 鈴木 穂高 教授、北里大学獣医学部獣医解剖学研究室、吉岡 一機 教授、北里大学獣医学部小動物第 2 外科学研究室、岩井 聡美 准教授に深く感謝の意を表します。

最後になりましたが、この研究を行うにあたり犠牲になった多くの実験動物への追悼の意を表します。また、この学位論文が彼らの犠牲に対する私自身の応えとなりうることを願っています。

IX. 引用文献

1. KDIGO 2021 clinical practice guideline for the management of blood pressure in chronic kidney disease.
2. Abbate, M., Zoja, C. and Remuzzi, G. 2006. How does proteinuria cause progressive renal damage? *J. Am. Soc. Nephrol.* 17: 2974-2984
3. Anderson, S., Diamond, J. R., Karnovsky, M. J. and Brenner, B. M. 1988. Mechanisms underlying transition from acute glomerular injury to late glomerular sclerosis in a rat model of nephrotic syndrome. *J. Clin. Invest.* 82: 1757-1768.
4. Andrews, K. L., Mudd, J. L., Li, C. and Miner, J. H. 2002. Quantitative trait loci influence renal disease progression in a mouse model of Alport syndrome. *Am. J. Pathol.* 160: 721-730.
5. Araki, R., Fujimori, A., Hamatani, K., Mita, K., Saito, T., Mori, M., Fukumura, R., Morimyo, M., Muto, M., Itoh, M., Tatsumi, K. and Abe, M. 1997. Nonsense mutation at Tyr-4046 in the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit of severe combined immune deficiency mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 2438-2443.
6. Asanuma, K., Akiba-Takagi, M., Kodama, F., Asao, R., Nagai, Y., Lydia, A., Fukuda, H., Tanaka, E., Shibata, T., Takahara, H., Hidaka, T., Asanuma, E., Kominami, E., Ueno, T. and Tomino, Y. 2011. Dendrin location in podocytes is associated with disease progression in animal and human glomerulopathy. *Am. J. Nephrol.* 33: 537-549.
7. Ashraf, S., Gee, H. Y., Woerner, S., Xie, L. X., Vega-Warner, V.,

- Lovric, S., Fang, H., Song, X., Cattran, D. C., Avila-Casado, C., Paterson, A. D., Nitschké, P., Bole-Feysot, C., Cochat, P., Esteve-Rudd, J., Haberberger, B., Allen, S. J., Zhou, W., Airik, R., Otto, E. A., Barua, M., Al-Hamed, M., Kari, J. A., Evans, J., Bierzynska, A., Saleem, M. A., Böckenhauer, D., Kleta, R., El Desoky, S., Hacıhamdioglu, D. O., Gok, F., Washburn, J., Wiggins, R. C., Choi, M., Lifton, R. P., Levy, S., Han, Z., Salviati, L., Prokisch, H., Williams, D. S., Pollak, M., Clarke, C. F., Pei, Y., Antignac, C. and Hildebrandt, F. 2013. ADCK4 mutations promote steroid-resistant nephrotic syndrome through CoQ10 biosynthesis disruption. *J. Clin. Invest.* 123: 5179-5189.
8. Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J. R., Maciejewski, A. and Wishart, D. S. 2016. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res.* 44: 147.
9. Baelde, H. J., Eikmans, M., Doran, P. P., Lappin, D. W. P., de Heer, E. and Bruijn, J. A. 2004. Gene expression profiling in glomeruli from human kidneys with diabetic nephropathy. *Am. J. Kidney Dis.* 43: 636-650.
10. Barisoni, L., Madaio, M. P., Eraso, M., Gasser, D. L. and Nelson, P. J. 2005. The kd/kd mouse is a model of collapsing glomerulopathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16: 2847-2851
11. Bikbov, B., Purcell, C. A., Levey, A. S., Smith, M., Abdoli, A., Abebe, M., Adebayo, O. M., Afarideh, M., Agarwal, S. K., Agudelo-Botero, M., Ahmadian, E., Al-Aly, Z., Alipour, V., Almasi-Hashiani, A., Al-Raddadi, R. M., Alvis-Guzman, N.,

Amini, S., Andrei, T., Andrei, C. L., Andualem, Z., Anjomshoa, M., Arabloo, J., Ashagre, A. F., Asmelash, D., Ataro, Z., Atout, M. M. W., Ayanore, M. A., Badawi, A., Bakhtiari, A., Ballew, S. H., Balouchi, A., Banach, M., Barquera, S., Basu, S., Bayih, M. T., Bedi, N., Bello, A. K., Bensenor, I. M., Bijani, A., Boloor, A., Borzì, A. M., Cámara, L. A., Carrero, J. J., Carvalho, F., Castro, F., Catalá-López, F., Chang, A. R., Chin, K. L., Chung, S., Cirillo, M., Cousin, E., Dandona, L., Dandona, R., Daryani, A., Das Gupta, R., Demeke, F. M., Demoz, G. T., Desta, D. M., Do, H. P., Duncan, B. B., Eftekhari, A., Esteghamati, A., Fatima, S. S., Fernandes, J. C., Fernandes, E., Fischer, F., Freitas, M., Gad, M. M., Gebremeskel, G. G., Gebresillassie, B. M., Geta, B., Ghafourifard, M., Ghajar, A., Ghith, N., Gill, P. S., Ginawi, I. A., Gupta, R., Hafezi-Nejad, N., Haj-Mirzaian, A., Haj-Mirzaian, A., Hariyani, N., Hasan, M., Hasankhani, M., Hasanzadeh, A., Hassen, H. Y., Hay, S. I., Heidari, B., Herteliu, C., Hoang, C. L., Hosseini, M., Hostiuc, M., Irvani, S. S. N., Islam, S. M. S., Jafari Balalami, N., James, S. L., Jassal, S. K., Jha, V., Jonas, J. B., Joukar, F., Jozwiak, J. J., Kabir, A., Kahsay, A., Kasaeian, A., Kassa, T. D., Kassaye, H. G., Khader, Y. S., Khalilov, R., Khan, E. A., Khan, M. S., Khang, Y., Kisa, A., Kovesdy, C. P., Kuate Defo, B., Kumar, G. A., Larsson, A. O., Lim, L., Lopez, A. D., Lotufo, P. A., Majeed, A., Malekzadeh, R., März, W., Masaka, A., Meheretu, H. A. A., Miazgowski, T., Mirica, A., Mirrakhimov, E. M., Mithra, P., Moazen, B., Mohammad, D. K.,

Mohammadpourhodki, R., Mohammed, S., Mokdad, A. H., Morales, L., Moreno Velasquez, I., Mousavi, S. M., Mukhopadhyay, S., Nachega, J. B., Nadkarni, G. N., Nansseu, J. R., Natarajan, G., Nazari, J., Neal, B., Negoi, R. I., Nguyen, C. T., Nikbakhsh, R., Noubiap, J. J., Nowak, C., Olagunju, A. T., Ortiz, A., Owolabi, M. O., Palladino, R., Pathak, M., Poustchi, H., Prakash, S., Prasad, N., Rafiei, A., Raju, S. B., Ramezanzadeh, K., Rawaf, S., Rawaf, D. L., Rawal, L., Reiner, R. C., Rezapour, A., Ribeiro, D. C., Roeber, L., Rothenbacher, D., Rwegerera, G. M., Saadatagah, S., Safari, S., Sahle, B. W., Salem, H., Sanabria, J., Santos, I. S., Sarveazad, A., Sawhney, M., Schaeffner, E., Schmidt, M. I., Schutte, A. E., Sepanlou, S. G., Shaikh, M. A., Sharafi, Z., Sharif, M., Sharifi, A., Silva, D. A. S., Singh, J. A., Singh, N. P., Sisay, M. M. M., Soheili, A., Sutradhar, I., Teklehaimanot, B. F., Tesfay, B. E., Teshome, G. F., Thakur, J. S., Tonelli, M., Tran, K. B., Tran, B. X., Tran Ngoc, C., Ullah, I., Valdez, P. R., Varughese, S., Vos, T., Vu, L. G., Waheed, Y., Werdecker, A., Wolde, H. F., Wondmieneh, A. B., Wulf Hanson, S., Yamada, T., Yeshaw, Y., Yonemoto, N., Yusefzadeh, H., Zaidi, Z., Zaki, L., Zaman, S. B., Zamora, N., Zarghi, A., Zewdie, K. A., Ärnlöv, J., Coresh, J., Perico, N., Remuzzi, G., Murray, C. J. L. and Vos, T. 2020. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017. *Lancet* 395: 709-733.

12. Bohle, A., Müller, G. A., Wehrmann, M., Mackensen-Haen, S. and Xiao, J. C. 1996. Pathogenesis of chronic renal failure in the primary glomerulopathies, renal vasculopathies, and chronic interstitial nephritides. *Kidney Int. Suppl.* 54: S2-9.
13. Burma, S., Kurimasa, A., Xie, G., Taya, Y., Araki, R., Abe, M., Crissman, H. A., Ouyang, H., Li, G. C. and Chen, D. J. 1999. DNA-dependent protein kinase-independent activation of p53 in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* 274: 17139-17143.
14. Cerdá, J., Lameire, N., Eggers, P., Pannu, N., Uchino, S., Wang, H., Bagga, A. and Levin, A. 2008. Epidemiology of acute kidney injury. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 3: 881-886.
15. Cheng, Z., Limbu, M. H., Wang, Z., Liu, J., Liu, L., Zhang, X., Chen, P. and Liu, B. 2017. MMP-2 and 9 in chronic kidney disease. *Int. J. Mol. Sci.* 18: 776.
16. Coca, S. G., Singanamala, S. and Parikh, C. R. 2012. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Kidney Int.* 81: 442-448.
17. Delemasure, S., Vergely, C., Zeller, M., Cottin, Y. and Rochette, L. 2006. Preventing the cardiotoxic effects of anthracyclins. From basic concepts to clinical data. *Ann. Cardiol. Angeiol. (Paris)* 55: 104-112.
18. Diamond, J. R. and Karnovsky, M. J. 1986. Focal and segmental glomerulosclerosis following a single intravenous dose of puromycin aminonucleoside. *Am. J. Pathol.* 122: 481-487.
19. Diomedi-Camassei, F., Di Giandomenico, S., Santorelli, F. M.,

- Caridi, G., Piemonte, F., Montini, G., Ghiggeri, G. M., Murer, L., Barisoni, L., Pastore, A., Muda, A. O., Valente, M. L., Bertini, E. and Emma, F. 2007. COQ2 nephropathy: a newly described inherited mitochondriopathy with primary renal involvement. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18: 2773-2780.
20. Dip, R. and Naegeli, H. 2005. More than just strand breaks: the recognition of structural DNA discontinuities by DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. *FASEB. J.* 19: 704-715.
21. Doi, K., Noiri, E. and Fujita, T. 2010. Role of vascular endothelial growth factor in kidney disease. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 8: 122-128.
22. Edwardson, D. W., Narendrula, R., Chewchuk, S., Mispel-Beyer, K., Mapletoft, J. P. J. and Parissenti, A. M. 2015. Role of drug metabolism in the cytotoxicity and clinical efficacy of anthracyclines. *Curr. Drug Metab.* 16: 412-426.
23. Fissell, W. H. and Miner, J. H. 2018. What is the glomerular ultrafiltration barrier? *J. Am. Soc. Nephrol.* 29: 2262-2264.
24. Fogo, A. B. 2003. Animal models of FSGS: Lessons for pathogenesis and treatment. *Seminars in nephrology* 23: 161-171.
25. Foreman, K. J., Marquez, N., Dolgert, A., Fukutaki, K., Fullman, N., Mcgaughey, M., Pletcher, M. A., Smith, A. E., Tang, K., Yuan, C., Brown, J. C., Friedman, J., He, J., Heuton, K. R., Holmberg, M., Patel, D. J., Reidy, P., Carter, A., Cercy, K., Chapin, A., Douwes-Schultz, D., Frank, T., Goettsch, F., Liu, P. Y., Nandakumar, V., Reitsma, M. B., Reuter, V., Sadat, N., Sorensen,

- R. J. D., Srinivasan, V., Updike, R. L., York, H., Lopez, A. D., Lozano, R., Lim, S. S., Mokdad, A. H., Vollset, S. E. and Murray, C. J. L. 2018. Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016–40 for 195 countries and territories. *Lancet* 392: 2052-2090.
26. Franco, S., Murphy, M. M., Li, G., Borjeson, T., Boboila, C. and Alt, F. W. 2008. DNA-PKcs and Artemis function in the end-joining phase of immunoglobulin heavy chain class switch recombination. *J. Exp. Med.* 205: 557-564.
27. Frolova, E. G., Sopko, N., Blech, L., Popovic, Z. B., Li, J., VasANJI, A., Drumm, C., Krukovets, I., Jain, M. K., Penn, M. S., Plow, E. F. and Stenina, O. I. 2012. Thrombospondin-4 regulates fibrosis and remodeling of the myocardium in response to pressure overload. *FASEB J.* 26: 2363-2373.
28. Furukawa, N., Saito, M., Hakoshima, T. and Kohno, K. 2006. A diphtheria toxin receptor deficient in epidermal growth factor-like biological activity. *J. Biochem.* 140: 831-841.
29. Garcia Sanchez, J. J., Thompson, J., Scott, D. A., Evans, R., Rao, N., Sörstadius, E., James, G., Nolan, S., Wittbrodt, E. T., Abdul Sultan, A., Stefansson, B. V., Jackson, D. and Abrams, K. R. 2022. Treatments for chronic kidney disease: A systematic literature review of randomized controlled trials. *Adv. Ther.* 39: 193-220.
30. Garg, P. 2018. A Review of Podocyte Biology. *Am. J. Nephrol.* 47: 3-13.

31. Gee, H. Y., Ashraf, S., Wan, X., Vega-Warner, V., Esteve-Rudd, J., Lovric, S., Fang, H., Hurd, T. W., Sadowski, C. E., Allen, S. J., Otto, E. A., Korkmaz, E., Washburn, J., Levy, S., Williams, D. S., Bakkaloglu, S. A., Zolotnitskaya, A., Ozaltin, F., Zhou, W. and Hildebrandt, F. 2014. Mutations in EMP2 cause childhood-onset nephrotic syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 94: 884-890.
32. Georgianos, P. I. and Agarwal, R. 2023. Hypertension in chronic kidney disease—treatment standard 2023. *Nephrol. Dial. Transplant.* 38: 2694-2703.
33. Grond, J., Weening, J. J., van Goor, H. and Elema, J. D. 1988. Application of puromycin aminonucleoside and adriamycin to induce chronic renal failure in the rat. *Contrib. Nephrol.* 60: 83-93.
34. Heeringa, S. F., Chernin, G., Chaki, M., Zhou, W., Sloan, A. J., Ji, Z., Xie, L. X., Salviati, L., Hurd, T. W., Vega-Warner, V., Killen, P. D., Raphael, Y., Ashraf, S., Ovunc, B., Schoeb, D. S., McLaughlin, H. M., Airik, R., Vlangos, C. N., Gbadegesin, R., Hinkes, B., Saisawat, P., Trevisson, E., Doimo, M., Casarin, A., Pertegato, V., Giorgi, G., Prokisch, H., Rötig, A., Nürnberg, G., Becker, C., Wang, S., Ozaltin, F., Topaloglu, R., Bakkaloglu, A., Bakkaloglu, S. A., Müller, D., Beissert, A., Mir, S., Berdeli, A., Özgen, S., Zenker, M., Matejas, V., Santos-Ocaña, C., Navas, P., Kusakabe, T., Kispert, A., Akman, S., Soliman, N. A., Krick, S., Mundel, P., Reiser, J., Nürnberg, P., Clarke, C. F., Wiggins, R. C., Faul, C. and Hildebrandt, F. 2011. COQ6 mutations in human

- patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness. *J. Clin. Invest.* 121: 2013-2024.
35. Hirata, M., Umata, T., Takahashi, T., Ohnuma, M., Miura, Y., Iwamoto, R. and Mekada, E. 2001. Identification of serum factor inducing ectodomain shedding of proHB-EGF and sStudies of noncleavable mutants of proHB-EGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283: 915-922.
36. Hosoyamada, M., Yan, K., Nishibori, Y., Takiue, Y., Kudo, A., Kawakami, H., Shibasaki, T. and Endou, H. 2005. Nephrin and Podocin expression around the onset of puromycin aminonucleoside nephrosis. *J. Pharmacol. Sci.* 97: 234-241.
37. House, A. A., Wanner, C., Sarnak, M. J., Piña, I. L., McIntyre, C. W., Komenda, P., Kasiske, B. L., Deswal, A., Defilippi, C. R., Cleland, J. G. F., Anker, S. D., Herzog, C. A., Cheung, M., Wheeler, D. C., Winkelmayr, W. C., McCullough, P. A., Abu-Alfa, A. K., Amann, K., Aonuma, K., Appel, L. J., Baigent, C., Bakris, G. L., Banerjee, D., Boletis, J. N., Bozkurt, B., Butler, J., Chan, C. T., Costanzo, M. R., Dubin, R. F., Filippatos, G., Gikonyo, B. M., Gikonyo, D. K., Hajjar, R. J., Iseki, K., Ishii, H., Knoll, G. A., Lenihan, C. R., Lentine, K. L., Lerma, E. V., Macedo, E., Mark, P. B., Noiri, E., Palazzuoli, A., Pecoits-Filho, R., Pitt, B., Rigatto, C., Rossignol, P., Setoguchi, S., Sood, M. M., Störk, S., Suri, R. S., Szummer, K., Tang, S. C. W., Tangri, N., Thompson, A., Vijayaraghavan, K., Walsh, M., Wang, A. Y. and Weir, M. R. 2019. Heart failure in chronic kidney disease:

- conclusions from a kidney disease: improving global outcomes (KDIGO) controversies conference. *kidney Int.* 95: 1304-1317.
38. Huang, R., Fu, P. and Ma, L. 2023. Kidney fibrosis: from mechanisms to therapeutic medicines. *Sig. Transduct. Target. Ther.* 8: 129.
39. Ichimura, T., Bonventre, J. V., Bailly, V., Wei, H., Hession, C. A., Cate, R. L. and Sanicola, M. 1998. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, Is Up-regulated in Renal Cells after Injury*. *J. Biol. Chem.* 273: 4135-4142.
40. Kai, K., Yamaguchi, T., Yoshimatsu, Y., Kinoshita, J., Teranishi, M. and Takasaki, W. 2013. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, a sensitive urinary biomarker of acute kidney injury in dogs receiving gentamicin. *J. Toxicol. Sci.* 38: 269-277.
41. Kang, D., Joly, A. H., Oh, S., Hugo, C., Kerjaschki, D., Gordon, K. L., Mazzali, M., Jefferson, J. A., Hughes, J., Madsen, K. M., Schreiner, G. F. and Johnson, R. J. 2001. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: i. potential role of vascular endothelial growth factor and Thrombospondin-1. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: 1434-1447.
42. Kawai, S., Takagi, Y., Kaneko, S. and Kurosawa, T. 2011. Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Exp Anim.* 60: 481-487.
43. Knezevic, V., Leethanakul, C., Bichsel, V. E., Worth, J. M., Prabhu, V. V., Gutkind, J. S., Liotta, L. A., Munson, P. J.,

- Petricoin III, E. F. and Krizman, D. B. 2001. Proteomic profiling of the cancer microenvironment by antibody arrays. *Proteomics* 1: 1271-1278.
44. Koop, K., Eikmans, M., Baelde, H. J., Kawachi, H., De Heer, E., Paul, L. C. and Bruijn, J. A. 2003. Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14: 2063-2071.
45. Kramann, R., DiRocco, D. P. and Humphreys, B. D. 2013. Understanding the origin, activation and regulation of matrix-producing myofibroblasts for treatment of fibrotic disease. *J. Pathol.* 231: 273-289.
46. Lahdenkari, A., Kestilä, M., Holmberg, C., Koskimies, O. and Jalanko, H. 2004. Nephtrin gene (NPHS1) in patients with minimal change nephrotic syndrome (MCNS). *Kidney Int.* 65: 1856-1863.
47. LeBleu, V. S., Taduri, G., O'Connell, J., Teng, Y., Cooke, V. G., Woda, C., Sugimoto, H. and Kalluri, R. 2013. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat. Med.* 19: 1047-1053.
48. Lin, W., Ho, K., Su, H., Fang, T., Tzou, S., Chen, I., Lu, Y., Chang, M., Tsai, Y., Liu, E., Su, Y., Wang, Y., Cheng, T. and Huang, H. 2021. Fibrinogen-Like Protein 1 Serves as an Anti-Inflammatory Agent for Collagen-Induced Arthritis Therapy in Mice. *Front. Immunol.* 12: 767868.
49. Liu, B., Tang, T., Lv, L. and Lan, H. 2018. Renal tubule injury: a driving force toward chronic kidney disease. *Kidney Int.* 93: 568-579.

50. Mashiko, D., Fujihara, Y., Satouh, Y., Miyata, H., Isotani, A. and Ikawa, M. 2013. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci. Rep.* 3: 3355.
51. Mashiko, D., Young, S. A. M., Muto, M., Kato, H., Nozawa, K., Ogawa, M., Noda, T., Kim, Y., Satouh, Y., Fujihara, Y. and Ikawa, M. 2014. Feasibility for a large scale mouse mutagenesis by injecting CRISPR/Cas plasmid into zygotes. *Dev. Growth Differ.* 56: 122-129.
52. Matsuoka, K., Saito, M., Shibata, K., Sekine, M., Shitara, H., Taya, C., Zhang, X., Takahashi, T. A., Kohno, K., Kikkawa, Y. and Yonekawa, H. 2013. Generation of mouse models for type 1 diabetes by selective depletion of pancreatic beta cells using toxin receptor-mediated cell knockout. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 436: 400-405.
53. Meyer, T. N., Schwesinger, C., Wahlefeld, J., Dehde, S., Kerjaschki, D., Becker, J. U., Stahl, R. A. K. and Thaiss, F. 2007. A new mouse model of immune-mediated podocyte injury. *Kidney Int.* 72: 841-852.
54. Mohebbati, R., Rad, K. A., Shafei, N. M., Soukhtanloo, M., Hosseinian, S., Beheshti, F. and Khazdair, R. M. 2015. The Effects of Vitamin C on Adriamycin-Induced Hypercholesterolemia in Rat. *Current Nutrition & Food Science* 11: 309-314.
55. Murakoshi, M., Iwasawa, T., Koshida, T., Suzuki, Y., Gohda, T.

- and Kato, K. 2022. Development of an In-House EphA2 ELISA for Human Serum and Measurement of Circulating Levels of EphA2 in Hypertensive Patients with Renal Dysfunction. *Diagnostics (Basel)* 12: 3023.
56. Ninichuk, V., Gross, O., Segerer, S., Hoffmann, R., Radomska, E., Buchstaller, A., Huss, R., Akis, N., Schlöndorff, D. and Anders, H. -. 2006. Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice. *Kidney Int.* 70: 121-129.
57. Ohse, T., Vaughan, M. R., Kopp, J. B., Krofft, R. D., Marshall, C. B., Chang, A. M., Hudkins, K. L., Alpers, C. E., Pippin, J. W. and Shankland, S. J. 2010. De novo expression of podocyte proteins in parietal epithelial cells during experimental glomerular disease. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 298: 702-711.
58. Ota, I., Higashiyama, S., Masui, T., Yane, K., Hosoi, H. and Matsuura, N. 2013. Heparin-binding EGF-like growth factor enhances the activity of invasion and metastasis in thyroid cancer cells. *Oncol. Rep.* 30: 1593-1600.
59. Oszolak, F. and Milos, P. M. 2011. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Genet.* 12: 87-98.
60. Panigrahi, A., Zhang, L., Benicky, J., Sanda, M., Ahn, J. and Goldman, R. 2023. A multiplexed microflow LC-MS/MS-PRM assay for serologic quantification of IgG N- and HPX O-glycoforms in liver fibrosis. *Sci. Rep.* 13: 606.

61. Papeta, N., Zheng, Z., Schon, E. A., Brosel, S., Altintas, M. M., Nasr, S. H., Reiser, J., D'Agati, V. D. and Gharavi, A. G. 2010. Prkdc participates in mitochondrial genome maintenance and prevents Adriamycin-induced nephropathy in mice. *J. Clin. Invest.* 120: 4055-4064.
62. Perrin, S. 2014. Preclinical research: Make mouse studies work. *Nature* 507: 423-425.
63. Pilling, D. and Gomer, R. H. 2014. Persistent lung inflammation and fibrosis in serum amyloid P Component (Apcs^{-/-}) knockout mice. *PLOS ONE* 9: e93730.
64. Podyacheva, E. Y., Kushnareva, E. A., Karpov, A. A. and Toropova, Y. G. 2021. Analysis of Models of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Rats and Mice. A Modern View From the Perspective of the Pathophysiologist and the Clinician. *Front. Pharmacol.* 12: 670479.
65. Refaeli, I., Hughes, M., Wong, A., Bissonnette, M., Roskelley, C., Vogl, A., Barbour, S., Freedman, B. and McNagny, K. 2020. Distinct Functional Requirements for Podocalyxin in Immature and Mature Podocytes Reveal Mechanisms of Human Kidney Disease. *Sci. Rep.* 10.
66. Reungjui, S., Roncal, C. A., Sato, W., Glushakova, O. Y., Croker, B. P., Suga, S., Ouyang, X., Tungsanga, K., Nakagawa, T., Johnson, R. J. and Mu, W. 2008. Hypokalemic nephropathy is associated with impaired angiogenesis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19: 125-134.

67. Rossmann, P., Bukovský, A., Matoušovic, K., Holub, M. and Král, J. 1986. Puromycin aminonucleoside nephropathy: ultrastructure, glomerular polyanion, and cell surface markers. *J. Pathol.* 148: 337-348.
68. Roy, M., Saroha, S., Sarma, U., Sarathy, H. and Kumar, R. 2023. Quantitative systems pharmacology model of erythropoiesis to simulate therapies targeting anemia due to chronic kidney disease. *Front. Pharmacol.* 14: 1274490.
69. Ruggenenti, P., Perna, A., Remuzzi, G. and Investigators of the Gisen Group, 2003. Retarding progression of chronic renal disease: The neglected issue of residual proteinuria. *Kidney Int.* 63: 2254-2261.
70. Ryan, G. B. and Karnovsky, M. J. 1976. Distribution of endogenous albumin in the rat glomerulus: role of hemodynamic factors in glomerular barrier function. *Kidney Int.* 9: 36-45.
71. Sasaki, H., Takahashi, Y., Ogawa, T., Hiura, K., Nakano, K., Sugiyama, M., Okamura, T. and Sasaki, N. 2020. Deletion of the Tensin2 SH2-PTB domain, but not the loss of its PTPase activity, induces podocyte injury in FVB/N mouse strain. *Exp. Anim.* 69: 135-143.
72. Saunders, B., Lyon, S., Day, M., Riley, B., Chenette, E., Subramaniam, S. and Vadivelu, I. 2008. The Molecule Pages database. *Nucleic Acids Res.* 36: 700-706.
73. Sawhney, S., Mitchell, M., Marks, A., Fluck, N. and Black, C. 2015. Long-term prognosis after acute kidney injury (AKI): what

- is the role of baseline kidney function and recovery? A systematic review. *BMJ Open* 5: e006497-006497.
74. Seyhan, A. A. 2019. Lost in translation: the valley of death across preclinical and clinical divide – identification of problems and overcoming obstacles. *Transl. Med. Commun.* 4: 18.
75. Shibata, S., Nagase, M. and Fujita, T. 2006. Fluvastatin ameliorates podocyte injury in proteinuric rats via modulation of excessive Rho signaling. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17: 754-764.
76. Shimauchi, T., Numaga-Tomita, T., Ito, T., Nishimura, A., Matsukane, R., Oda, S., Hoka, S., Ide, T., Koitabashi, N., Uchida, K., Sumimoto, H., Mori, Y. and Nishida, M. 2017. TRPC3-Nox2 complex mediates doxorubicin-induced myocardial atrophy. *JCI Insight* 2.
77. Skylas, D. J. and Wrigley, C. 2004. PROTEOMICS. pp. 480-488. In: *Encyclopedia of Grain Science* (Wrigley, C. eds.), Elsevier, Oxford.
78. Sternberg, S. S. 1970. Cross-striated fibrils and other ultrastructural alterations in glomeruli of rats with daunomycin nephrosis. *Lab. Invest.* 23: 39-51.
79. Susantitaphong, P., Cruz, D. N., Cerda, J., Abulfaraj, M., Alqahtani, F., Koulouridis, I., Jaber, B. L. and Acute kidney injury advisory group of the american society of nephrology 2013. World incidence of AKI: a meta-analysis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 8: 1482-1493.
80. Sweetser, D. A., Heuckeroth, R. O. and Gordon, J. I. 1987. The

- metabolic significance of mammalian fatty-acid-binding proteins: abundant proteins in search of a function. *Annu. Rev. Nutr.* 7: 337-359.
81. Takahashi, Y., Watanabe, M., Hiura, K., Isobe, A., Sasaki, H. and Sasaki, N. 2021. Positive correlation between renal tubular flattening and renal tubular injury/interstitial fibrosis in murine kidney disease models. *J. Vet. Med. Sci.* 83: 397-402.
82. Tampe, D., Schridde, L., Korsten, P., Ströbel, P., Zeisberg, M., Hakroush, S. and Tampe, B. 2021. Different patterns of kidney fibrosis are indicative of injury to distinct renal compartments. *Cells* 10: 2014.
83. Thomas, M. C., Brownlee, M., Susztak, K., Sharma, K., Jandeleit-Dahm, K. A. M., Zoungas, S., Rossing, P., Groop, P. and Cooper, M. E. 2020. Diabetic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers* 1.
84. Uchida, T., Pappenheimer, A. M. J. and Harper, A. A. 1973. Diphtheria toxin and related proteins. 3. Reconstitution of hybrid "diphtheria toxin" from nontoxic mutant proteins. *J. Biol. Chem.* 248: 3851-3854.
85. Veerkamp, J. H., Peeters, R. A. and Maatman, R. G. 1991. Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1081: 1-24.
86. Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F. and Jaenisch, R. 2013. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated

- genome engineering. *Cell* 153: 910-918.
87. Wang, Z., Gerstein, M. and Snyder, M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10: 57-63.
88. Watanabe, M., Hiura, K., Sasaki, H., Okamura, T. and Sasaki, N. 2023. Genetic background strongly influences the transition to chronic kidney disease of adriamycin nephropathy in mice. *Exp. Anim.* 72: 47-54.
89. Watanabe, M., Kakutani, M., Ando, R., Hiura, K., Sasaki, H., Okamura, T. and Sasaki, N. 2023. Susceptibility to adriamycin-induced hepatotoxicity in mice depends on PRKDC polymorphism. *J. Vet. Med. Sci.* 85: 702-704.
90. Webster, A. C., Nagler, E. V., Morton, R. L. and Masson, P. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the global burden of disease study 2016. *Lancet* 389: 1238-1252.
91. Widmeier, E., Airik, M., Hugo, H., Schapiro, D., Wedel, J., Ghosh, C. C., Nakayama, M., Schneider, R., Awad, A. M., Nag, A., Cho, J., Schueler, M., Clarke, C. F., Airik, R. and Hildebrandt, F. 2019. Treatment with 2,4-Dihydroxybenzoic acid prevents FSGS progression and renal fibrosis in podocyte-specific *Coq6* knockout mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* 30(3): 393-405.
92. Widmeier, E., Yu, S., Nag, A., Chung, Y. W., Nakayama, M., Fernández-del-Río, L., Hugo, H., Schapiro, D., Buerger, F., Choi, W., Helmstädter, M., Kim, J., Ryu, J., Lee, M. G., Clarke,

- C. F., Hildebrandt, F. and Gee, H. Y. 2020. ADCK4 deficiency destabilizes the coenzyme Q Complex, which is rescued by 2,4-dihydroxybenzoic acid treatment. *J. Am. Soc. Nephrol.* 31(6): 1191-1211.
93. Wu, Q., Li, W., Zhao, J., Sun, W., Yang, Q., Chen, C., Xia, P., Zhu, J., Zhou, Y., Huang, G., Yong, C., Zheng, M., Zhou, E. and Gao, K. 2021. Apigenin ameliorates doxorubicin-induced renal injury via inhibition of oxidative stress and inflammation. *Biomed. Pharmacother.* 137: 111308.
94. Yamazaki, S., Iwamoto, R., Saeki, K., Asakura, M., Takashima, S., Yamazaki, A., Kimura, R., Mizushima, H., Moribe, H., Higashiyama, S., Endoh, M., Kaneda, Y., Takagi, S., Itami, S., Takeda, N., Yamada, G. and Mekada, E. 2003. Mice with defects in HB-EGF ectodomain shedding show severe developmental abnormalities. *J. Cell Biol.* 163: 469-475.
95. Yang, J. W., Dettmar, A. K., Kronbichler, A., Gee, H. Y., Saleem, M., Kim, S. H. and Shin, J. I. 2018. Recent advances of animal model of focal segmental glomerulosclerosis. *Clin Exp Nephrol* 22: 752-763.
96. Yang, L., Besschetnova, T. Y., Brooks, C. R., Shah, J. V. and Bonventre, J. V. 2010. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nat. Med.* 16: 535-543.
97. Zhang, Z., Humphreys, B. D. and Bonventre, J. V. 2007. Shedding of the urinary biomarker kidney injury molecule-1 (KIM-1) is regulated by MAP kinases and juxtamembrane region. *J. Am. Soc.*

- Nephrol. 18: 2704-2714.
98. Zheng, Z., Pavlidis, P., Chua, S., D'Agati, V. D. and Gharavi, A. G. 2006. An Ancestral Haplotype Defines Susceptibility to Doxorubicin Nephropathy in the Laboratory Mouse. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17: 1796-1800.
99. Zheng, Z., Schmidt-Ott, K. M., Chua, S., Foster, K. A., Frankel, R. Z., Pavlidis, P., Barasch, J., D'Agati, V. D. and Gharavi, A. G. 2005. A Mendelian locus on chromosome 16 determines susceptibility to doxorubicin nephropathy in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 2502-2507.
100. 大澤 毅. 2023.実験医学増刊 Vol.41 No.15 マルチオミクス データ駆動時代の疾患研究 がん、老化、生活習慣病 最新のオミクス統合で挑む標的探索と病態解明 pp14-15