

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

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

獣医学系研究科 渡邊 正輝

慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease : 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。CKD は、2020 年における全世界の死因として第 8 位にランクされている。2030 年には 10 万人当たり 14 人が CKD により死亡すると推測されており、これは国際的にも高い関心を集めている問題である。CKD は、WHO のガイドラインでは、腎機能の低下を示す指標である糸球体濾過量 (GFR)が 60 mL/分/1.73m<sup>2</sup> 未満であるか、あるいは腎臓の傷害マーカー (蛋白尿等)が存在し、いずれも 3 ヶ月以上続く状態を示す。GFR が 15mL/分/1.73m<sup>2</sup> 未満となり、末期腎不全 (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、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足突起 (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。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。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。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、投与されたマウスは、ヒトの巣状分節性糸球体硬化症 (Focal Segmental Glomerulosclerosis : FSGS) に近い病理像を示し、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 は BALB/c 系統のみ感受性であり、多くの研究のスタンダードである C57BL/6J (B6J)系統では適用できなかった。

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 間の多型の内、CRISPR/Cas 法により R2140C 変異を導入した B6-*Prkdc*<sup>R2140C</sup> マウスを作出し、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*<sup>R2140C</sup> 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二重変異マウスを用いれば、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。一方、ADR 腎症モデルでは初期の段階で尿細管障害マーカー NGAL が既に増加しており、ADR が腎糸球体だけでなく、同時に、尿細管の障害をももたらすことが明らかとなった。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。1章で述べた ADR 腎症モデルの欠点を克服するため、本法により、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た。CRISPR/Cas 法により、ポドサイト特異的な *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。Pod-TRECK マウスの腹腔内に DT を投与すると、ヒト CKD と同様に、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*<sup>R2140C</sup>、及び Pod-TRECK を、より詳細に特徴づけるため、トランスクリプトームやプロテオーム解析を行った。その結果、ADR 腎症モデルでは、投与後、初期の段階で、尿細管由来の 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 (VEGF, HIF1 $\alpha$ , GLUT3) の発現の上昇も認められた。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。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示唆された。一方、Pod-TRECK はポドサイト障害を特異的に誘発するため、ヒトのポドサイト障害を起因とする CKD の病態メカニズムをより精確に再現するモデルとしての価値が高いこ

とが示唆された。また、両モデルで共通して発現が変動する遺伝子群は、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。