

学位論文要旨

腎尿細管における新規腎症増悪因子の解析

Functional analysis of novel aggravating factor in renal tubules

北里大学大学院獣医学系研究科

獣医学専攻 博士課程

高橋 悠記

Yuki Takahashi

指導教授 佐々木 宣哉

慢性腎臓病 (chronic kidney disease : CKD)とは、腎臓の障害 (蛋白尿など)、もしくは糸球体濾過量が 60 mL/分/1.73m² 未満の腎機能低下が 3 カ月以上持続する状態を示す。CKD の初期は自覚症状がなく、病態は不可逆的に進行し、徐々に怠惰感、貧血、浮腫などの症状が現れる。病態が進行すると最終的に末期腎不全 (End Stage Renal Disease : ESRD) に至り、腎移植または恒久的な透析療法が必要となる。ESRD 患者数は高齢化社会を背景に年々増加しており、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、健康課題・医療費面からも解決を迫られる重要な疾患であるが、未だ根治的な治療法は確立されていない。CKD は経過初期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。腎間質線維化は CKD における腎機能不全および機能的予後と強く相関しており、ESRD に至る決定的な病態変化である。したがって、腎間質線維化の治療が実現すれば、原疾患を問わない CKD の治療法および ESRD の予防法になると考えられる。腎臓病は多因子性疾患であり、その悪性化には腎症に寄与する様々な修飾遺伝子の存在が示唆されている。本研究では CKD の進行抑制に関わる新規治療標的遺伝子を探索する目的で、腎症感受性である FVB/NJ (FVB) マウスと腎症抵抗性である C57BL/6 (B6)マウスを用いた遺伝学的解析を行い、候補遺伝子に挙げた Mitotic interactor and substrate of Plk1 (*Misp*)について遺伝子改変マウスを用いて機能的解析を行った。

第 1 章 腎症修飾遺伝子を探索するため、腎症抵抗性である B6 を遺伝背景に持つマウスと、腎症感受性である FVB を遺伝背景に持つマウスを用いて連鎖解析を行った。使用した系統は *Tns2*^{nph} 変異を有

しており、FVB 背景では原発性糸球体硬化症に起因する CKD を自然発症する。連鎖解析の結果、10 番染色体 (40.66cM) に尿中アルブミン量と強く相関する遺伝子座が検出された。同遺伝子座の候補遺伝子を絞り込むため、両系統の腎糸球体を用いて RNA シーケンス解析を行い、両系統間で発現量に差が見られた腎症感受性候補遺伝子を抽出した。遺伝子発現データベースを用い解析を行ったところ、ヒト膜性腎症患者の腎組織および糖尿病性腎症マウスの糸球体において、*Misp* 遺伝子の発現量と尿中アルブミン量に強い相関があることを見出した。しかし MISP と腎症との関連についての報告はない。そこで、第 2 章では腎組織内における MISP の発現と腎症の病態との相関性について検証を行った。

第 2 章 腎障害における MISP の発現動態を明らかにするため、アドリマイシン (ADR) 誘発性糸球体障害モデル、糸球体障害自然発症モデル (*Tns2^{nph}* 変異マウス)、抗ネフリン抗体投与糸球体障害モデル、および虚血再灌流誘発性腎障害モデルを作製した。抗 MISP 抗体を用いて免疫組織化学染色を行ったところ、各腎症モデルマウスにおいて腎皮質側の尿細管上皮細胞において MISP の発現が亢進していた。この結果から、MISP の発現は、原疾患を問わず様々な腎症で尿細管上皮細胞において亢進しており、その発現上昇は尿中アルブミン量と正の相関を示していた。

第 3 章 第 2 章の結果より、様々な腎症で MISP の発現が亢進することが明らかとなったため、本章では、MISP が腎障害の悪性化に寄与しているか否かを確かめるため、*Misp* KO マウスを作製し、本マウスに腎障害モデルを適用して腎障害を評価した。*Misp* KO マウスは FVB/NJ の受精卵を用いて CRISPR/Cas9 システムにより作製し

た。なお、*Misp* KO マウスは行動、繁殖等の表現型の異常は見られなかった。まず、重篤な糸球体硬化症自然発症モデルである *Tns2^{nph}* 変異マウスに *Misp* KO マウスを交配し *Misp* KO:*Tns2^{nph}* 複合体変異マウス (Double) を作製し、*Tns2^{nph}* 変異マウスとの腎障害の重篤度を比較した。8 週齢時の尿中アルブミン量を比較したところ、Double 群の尿中アルブミン量は *Tns2^{nph}* 群と比較し有意に低下していた。さらに生存率を比較したところ *Tns2^{nph}* 群は 16 週齢まで達した個体はいなかったが、Double 群の生存率は *Tns2^{nph}* 群と比較し有意に上昇し、平均寿命は *Tns2^{nph}* 群の約 3 倍に延長した。腎組織を採取し PAS 染色およびシリウスレッド染色を用いて組織学的解析を行ったところ、Double 群は尿細管上皮細胞障害の指標である菲薄化および腎間質線維化が *Tns2^{nph}* 群と比較して有意に抑制されていた。この結果から、MISP の発現を抑制することにより、CKD の進行を遅らせることができることが示唆された。次に軽度な糸球体障害を誘発する抗ネフリン抗体投与を行い、MISP の発現抑制による効果を評価した。抗ネフリン抗体投与により、野生型マウス (WT) 群および KO 群ともに投与後 12 週まで軽度のアルブミン尿が確認されたが、排出量に差は見られなかった。また、組織学的解析を行ったところ、糸球体障害および線維化に顕著な差は見られなかった。一方で、KO 群では尿細管のダメージの指標である菲薄化が有意に抑制されていた。このことから、本モデルにおいても MISP の非存在下では尿細管障害が抑制されることが明らかとなった。次に虚血再灌流誘発性腎障害モデルを用いて、MISP の発現抑制による効果を評価した。腎臓に虚血再灌流障害を誘導 14 日後、線維化領域を比較したところ、腎皮質部における線維化領域は KO 群では WT 群と比較して有意な減

少が見られた。このことから MISIP の発現を抑制することにより、腎間質線維化の進行を遅らせることができることが判明した。以上より MISIP は腎症における尿細管障害の悪性化に寄与し、MISIP の発現を抑制することにより、腎線維化を抑制し、ひいては CKD の進行を遅らせることが可能であることが示された。

第 4 章 ヒトの腎障害における MISIP の発現動態を検証するため、原疾患の異なる CKD、すなわち、IgA 腎症、巣状分節性糸球体硬化症 (Focal Segmental Glomerulosclerosis : FSGS)、および尿細管間質性腎炎 (Tubulointerstitialnephritis : TIN)の患者の腎組織を用いて免疫組織化学染色を行った。健常者群と比較し、IgA 腎症患者群、FSGS 患者群、TIN 患者群では腎間質線維化領域の増加しており、さらに尿細管上皮細胞において MISIP の発現が亢進していた。以上より、ヒトの腎症においても、様々な腎症で腎尿細管細胞における MISIP の発現亢進していることが示された。

本研究により同定された新規腎症関連分子 MISIP はヒトおよびマウスの尿細管上皮細胞において、原疾患を問わず様々な腎障害で発現が上昇することが明らかとなった。また、MISIP を遺伝的に欠損させると、腎障害において尿細管の障害および腎間質線維化が有意に低下し、腎障害の進行が抑制された。以上より MISIP は腎症のバイオマーカーであると共に、腎症の悪性化に寄与していることが明らかとなった。今後、MISIP が関与するシグナル経路を解明することにより、CKD の共通病態である腎間質線維化の機序の解明、予防・新規治療薬の開発、新規バイオマーカーの開発に役立つことが期待される。