



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	乙第1892号
学位記番号	論第1658号
氏名	宇佐美 雅之
授与年月日	平成30年7月31日
学位論文の題名	Genetic differences in C57BL/6 mouse substrains affect kidney crystal deposition (C57BL/6 マウス亜系統における遺伝学的差異による腎結晶形成への影響) Urolithiasis (Accepted: 10 January 2018) [Epub ahead of print]
論文審査担当者	主査： 高橋 智 副査： 大手 信之、安井 孝周

論文内容の要旨

【背景・目的】 本邦における尿路結石症の罹患率は増加傾向が認められ、尿路結石の形成機序の解明と予防・治療法の開発は医学的・社会的な課題となっている。また、尿路結石症は遺伝因子および環境因子によって影響を受ける複雑な疾患であることが、過去の報告から示されている。一般的に遺伝因子の研究には近交系マウスが多く用いられるため、これまでに私たちは C57BL/6 を用いて腎におけるシュウ酸カルシウム (CaOx) 結晶沈着モデルを確立した。この研究過程において、C57BL/6 の亜系統である C57BL6/J (以下 B6J) と C57BL/6N (以下 B6N) の間には、腎結晶沈着数に違いがあることを私たちは見いだした。これまで B6J と B6N は遺伝学的に類似しているとされていたものの、全ゲノム解析により 6 遺伝子 (*Snap29*, *Fgf14*, *Aplp2*, *Lims1*, *Naaladl2*, および *nicotinamide nucleotide transhydrogenase* (*Nnt*)) に遺伝学的差異があることが報告されている。本研究では、新規の尿路結石症関連遺伝子を同定するため、C57BL/6 マウス亜系統間の遺伝学的背景が腎結晶沈着形成に及ぼす影響を検討した。

【方法】 研究① : 8 週齢雄 B6J および B6N (各群で $n = 15$) に 80mg/kg のグリオキシル酸を 12 日間連日腹腔内投与し、0、6、12 日目に腎組織を採取した。偏光顕微鏡にて観察し、画像解析ソフトを用いて CaOx 結晶沈着数を比較した。研究② : 研究①にて採取した腎組織から cDNA を作製し、6 遺伝子 (*Snap29*, *Fgf14*, *Aplp2*, *Lims1*, *Naaladl2*, および *Nnt*) の遺伝子発現量を、定量 PCR 法により比較した。研究③ : 研究②により mRNA 発現量に有意な差を認めた遺伝子について、腎におけるタンパク質の発現量を、Western blotting および免疫染色により評価した。

【結果】 腎結晶沈着数 : 両群とも、6 日目には腎皮髄境界部の近位尿細管腔内に、多数の CaOx 結晶沈着が認められた。また、B6J の腎結晶沈着数は、6 日目および 12 日目において B6N と比べ有意に増加していた (6 日目 : 5.28 倍、 $p = 4.1 \times 10^{-2}$ および 12 日目 : 16.2 倍、 $p = 5.1 \times 10^{-3}$)。 亜系統間に遺伝学的差異を有する遺伝子の発現 : 亜系統間において遺伝学的差異を認めた 6 遺伝子 (*Snap29*, *Fgf14*, *Aplp2*, *Lims1*, *Naaladl2*, および *Nnt*) の中で、*Nnt* のみ mRNA 発現量に有意な差を認めた。0、6、12 日目における B6J の *Nnt* 発現量は、B6N と比べ有意に低下していた (0 日目 : 0.24 倍、 $p = 2.2 \times 10^{-5}$; 6 日目 : 0.29 倍、 $p = 5.4 \times 10^{-4}$; 12 日目 : 0.40 倍、 $p = 1.8 \times 10^{-2}$)。 *Nnt* タンパク質発現 : B6J では、*Nnt* タンパク質の発現が欠如していた。また、免疫染色により、B6N における *Nnt* タンパク質は、腎の遠位尿細管上皮細胞において特に発現していることが明らかとなった。

【考察】 マウス亜系統は、一般的には表現型も遺伝学的にも非常に類似しているが、糖尿病や慢性心不全の研究では、発症における差が報告されており、わずかな遺伝子上の塩基配列差が疾患発症に影響を及ぼすことが示唆されている。本研究では、B6J の腎結晶沈着数が有意に増加しており、亜系統間のわずかな差が腎結晶沈着形成に影響を及ぼした可能性が示された。そのわずかな差として、亜系統間における遺伝子上の塩基配列が異なる 6 遺伝子 (SNP ; 5 遺伝子、Deletion ; 1 遺伝子) が影響したのではないかと考え、これらの遺伝子発現量を比較したところ、*Nnt* のみ B6J では発現が有意に低下していた。また、B6J においては *Nnt* タンパク質発現が欠如していることが判明した。これらから、B6J における腎結晶沈着数の増加に、*Nnt* の発現低下が関与している可能性が示唆された。ヒトにおける *Nnt* 相同遺伝子である *NNT* の転写産物は、ミトコンドリア内膜に発現する膜タンパク質 *NNT* であり、ミトコンドリア内の NADPH 濃度を増加させ、細胞内の活性酸素種 (ROS) を減少させることが報告されている。実験的および臨床的研究により、ROS 産生および酸化ストレスが腎結石形成に影響することが示されている。*Nnt* タンパク質の欠如は ROS 増加をもたらし、腎結晶沈着の増加に寄与し得ると考えられた。

【結論】 本研究結果から、マウス亜系統の違いが腎結晶沈着に影響を及ぼし、*Nnt* タンパク質の欠如が B6J における腎結晶沈着形成増加に関与し得ることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

【背景・目的】本邦における尿路結石の罹患率は増加傾向が認められ、尿路結石の形成機序の解明と予防・治療法の開発は医学的・社会的な課題となっている。また、尿路結石は遺伝因子および環境因子によって影響を受ける複雑な疾患であることが、過去の報告から示されている。一般的に遺伝因子の研究には近交系マウスが多く用いられるため、これまでに私たちは C57BL / 6 を用いて腎におけるシュウ酸カルシウム (CaOx) 結晶沈着モデルを確立した。この研究過程において、C57BL/6 の亜系統である C57BL6/J (以下 B6J) と C57BL / 6N (以下 B6N) の間には、腎結晶沈着数に違いがあることを私たちは見いだした。これまで B6J と B6N は遺伝学的に類似しているとされていたものの、全ゲノム解析により 6 遺伝子 (*Snap29*, *Fgf14*, *Aplp2*, *Lims1*, *Naaladl2*, および *nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt)*) に遺伝学的差異があることが報告されている。本研究では、新規の尿路結石関連遺伝子を同定するため、C57BL/6 マウス亜系統間の遺伝学的背景が腎結晶沈着形成に及ぼす影響を検討した。

【方法】研究①：8 週齢雄 B6J および B6N (各群で n = 15) に 80mg / kg のグリオキシル酸を 12 日間連日腹腔内投与し、0、6、12 日目に腎組織を採取した。偏光顕微鏡にて観察し、画像解析ソフトを用いて CaOx 結晶沈着数を比較した。研究②：研究①にて採取した腎組織から cDNA を作製し、6 遺伝子 (*Snap29*, *Fgf14*, *Aplp2*, *Lims1*, *Naaladl2*, および *Nnt*) の遺伝子発現量を、定量 PCR 法により比較した。研究③：研究②により mRNA 発現量に有意な差を認めた遺伝子について、腎におけるタンパク質の発現量を、Western blotting および免疫染色により評価した。

【結果】腎結晶沈着数：両群とも、6 日目には腎皮髄境界部の近位尿細管腔内に、多数の CaOx 結晶沈着が認められた。また、B6J の腎結晶沈着数は、6 日目および 12 日目において B6N と比べ有意に増加していた (6 日目：5.28 倍、 $p = 4.1 \times 10^{-2}$ および 12 日目：16.2 倍、 $p = 5.1 \times 10^{-3}$)。亜系統間に遺伝学的差異を有する遺伝子の発現：亜系統間において遺伝学的差異を認めた 6 遺伝子 (*Snap29*, *Fgf14*, *Aplp2*, *Lims1*, *Naaladl2*, および *Nnt*) の中で、*Nnt* のみ mRNA 発現量に有意な差を認めた。0、6、12 日目における B6J の *Nnt* 発現量は、B6N と比べ有意に低下していた。*Nnt* タンパク質発現：B6J では、*Nnt* タンパク質の発現が欠如していた。また、免疫染色により、B6N における *Nnt* タンパク質は、腎の遠位尿細管上皮細胞に特に発現していることが明らかとなった。

【考察】本研究では、B6J の腎結晶沈着数が有意に増加しており、亜系統間のわずかな差が腎結晶沈着形成に影響を及ぼした可能性が示された。そのわずかな差として、亜系統間における遺伝子上の塩基配列が異なる 6 遺伝子の遺伝子発現量を比較したところ、*Nnt* のみ B6J では発現が有意に低下していた。また、B6J においては *Nnt* タンパク質発現が欠如していることが判明した。これらから、B6J における腎結晶沈着数の増加に、*Nnt* の発現低下が関与している可能性が示唆された。ヒトにおける *Nnt* 相同遺伝子である *NNT* の転写産物は、ミトコンドリア内膜に発現する膜タンパク質 NNT であり、ミトコンドリア内の NADPH 濃度を増加させ、細胞内の活性酸素種 (ROS) を減少させることが報告されている。実験的および臨床的研究により、ROS 産生および酸化ストレスが腎結石形成に影響することが示されている。*Nnt* タンパク質の欠如は ROS 増加をもたらし、腎結晶沈着の増加に寄与し得ると考えられた。

【審査内容】主査の高橋から、尿生化学結果における AP(CaOx)の意義、ROS 活性の評価、尿細管での *Nnt* 発現部位など 7 項目、第一副査の大手教授からは、遺伝因子の意義、シュウ酸代謝、引用文献の検討方法など 7 項目、第二副査の安井教授からは、尿路結石の予防法、多因子疾患における GWAS の意義など 4 項目の質問があった。これらの質問に対して申請者から概ね適切な回答が得られ、本論文の内容について十分に理解するとともに、専攻分野 (腎・泌尿器科学) に関する知識を習得しているものと判断された。本研究は、亜系統マウスにおける *Nnt* 遺伝子欠失が、腎結晶形成に影響を与えることを明らかにした。よって、これらの新しい知見を報告している本論文の筆頭著者は博士 (医学) の学位を授与するに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 高橋 智 副査 大手 信之、安井 孝周