

腎不全の進展・増悪因子の解明と腎機能保護法の開発に関する研究

所属 京都大学医学部附属病院 薬剤部

研究者 増田 智先

慢性腎不全モデルとして 5/6 腎摘出ラットを用い、腎病変の進展及び薬物腎挙動の変動について分子機構解明を行う。既に同定している腎不全関連遺伝子群の中から腎機能保全と関わるものの特定と生理機能解明を行う。

A. 研究目的

薬物の尿中排泄は、糸球体濾過に加え近位尿細管における能動的な分泌・再吸収の総和として現れる。近年、腎尿細管の血管側側底膜（薬物の腎移行を媒介）並びに管腔側刷子縁膜（尿細管分泌を媒介）には、それぞれ複数種の薬物トランスポーターが局在し、効率的な解毒機構として機能することが明らかにされてきた。

高齢者を含めた腎機能低下患者では、薬物の腎排泄能の低下から薬剤性腎障害発症のリスクが潜在的に高い。これまで、クレアチニンクリアランスなど糸球体濾過能に着目した薬物使用が行われてきたが、尿細管分泌能の指標となる分子生物学的マーカーの不足から、予期せぬ副作用のために薬物使用の中止を余儀なくされる場合もある。従って、尿細管分泌能の個体間・個体内変動予測を可能とする指標が特定されれば、糸球体濾過能の評価と併せてより安全な薬物使用法の確立に応用できることが期待される

このような背景の下、本研究では慢性腎不全モデルラットを用いて経時的な腎病変の

進展を分子レベルで明らかとし、尿細管トランスポーター群の分子的・機能的変動機構解明と腎機能保護因子の探索・特定を目的とした研究計画を立てた。

B. 研究方法

(1) 慢性腎不全動物の作成

慢性腎不全モデル動物として 5/6 腎摘出ラットを選択した。7 週齢ラットの右腎摘出後、実体顕微鏡下で左腎動脈の分岐部を結紮することによって作成した。なお、模擬処置ラットについては、麻酔下開腹後に、腎動脈を剥離した後に再度腹部を縫合した。なお、給餌、飲水に制限は設けなかった。

5/6 腎摘出处置の後、最長 24 週間飼育したラットを実験に供した。なお、慢性腎不全の確認は、血漿サンプルを用いたクレアチニン値、血中尿素窒素値、グルコース値、アルブミン値や、犠牲死前日からの 24 時間蓄尿を用いた尿中クレアチニン値、尿中アルブミン値の測定を行った。得られた結果を用いて

クレアチンクリアランスも求めた。さらに、膀胱尿を回収し、近位尿細管障害の指標として考えられている N アセチルグルコサミニダーゼ(NAG)活性の定量も行った。得られた結果をまとめ、慢性腎不全の病変進展を確認した。

(2) 尿細管分節の単離

模擬処置ラット (Sham) 及び 5/6 腎摘出ラットの左腎を麻酔下で、0.1%コラゲナーゼ含有緩衝液 10mL で灌流後、腎組織を 1mm 厚にスライスし、0.1%コラゲナーゼ及び RNase 阻害剤 vanadate ribonucleoside complex (VRC)含有緩衝液中で 37°C、30 分間インキュベーションした。コラゲナーゼ処理後の腎組織切片は、氷冷緩衝液を用いて洗浄した後に、実体顕微鏡下で尿細管分節の形態的特徴に着目し、糸球体、近位尿細管、ヘンレ太い上行脚、遠位曲尿細管、集合管などの分節に単離した。リアルタイム PCR 用のサンプルとして糸球体は 10 個、尿細管は 4mm を用いた。マイクロアレイによる遺伝子発現解析用のサンプルとしては、糸球体は 50 個、尿細管は 15mm を 1 サンプルとして単離した。

(3) 遺伝子発現解析

単離尿細管サンプルは、グアニジンチオシアネート含有変性剤を用いて、瞬時に溶解し、引き続き total RNA の抽出を行った。リアルタイム PCR 用のサンプルについては、逆転写反応した後に一定量の single stranded cDNA を鋳型として用いた。マイクロアレイ解析用のサンプルについては、QIAGEN 社 RNeasy total RNA isolation kit

を用いて total RNA を抽出後、T7 配列融合オリゴ dT プライマーを用い逆転写反応を行った。カートリッジを用いた cDNA 回収の後に、大腸菌由来 T7 RNA polymerase による mRNA 増幅反応はジゴキシゲニン標識 UTP を用いて行い、濃縮した。最終的に糸球体 50 個、近位尿細管 15mm を試料としてラベル化 RNA プローブは、7~10 µg 得ることができた。なお、DNA チップを用いた検出は、ABI 社 1700-1 を用いて行った。

(4) 新規トランスポータ様遺伝子のクローニング

我々は既に、Sham ラット及び 5/6 腎摘出 2 週間後のラット残存腎由来の cDNA ライブラリーを用いて、各々から 1,023 クローンをランダムに pick up し、部分塩基配列の解読とデータベース化に基づく代償性腎不全期関連遺伝子群の抽出とクローン化 (約 400 の機能未知遺伝子) を終えている。これらの遺伝子群は、腎に高頻度で発現する遺伝子 (全 mRNA の 0.1%以上) であることが想定される。約 400 の未知遺伝子の塩基配列を基に、再度 NCBI などのデータベース検索を行い、機能未知遺伝子の同定を行った。SOSUI 等の膜貫通部位予測プログラムを用いて構造が予測された遺伝子がコードするタンパク質の二次構造の推定を行った。次に、薬物トランスポータ蛋白質の特徴として多膜貫通型ということから、膜貫通部位 (TM) 8 回以上のものを検索した。抽出されたクローンについて、再度全長塩基配列を解読し、機能解析に使用した。

(5) 倫理面への配慮

動物実験については、京都大学大学院医学研究科・医学部動物実験委員会に動物実験計画書を提出し、委員会による審査・承認の上で実施した。また、ヒト臨床検体を用いた解析については、京都大学医学研究科・医学部医の倫理委員会による審査・承認の上で実施した。

C. 研究成果

慢性腎不全ラットの作成と遺伝子発現解析：

5/6 腎摘出ラットは、作成後 6 ヶ月を境に死亡率が上昇する。殆どの場合が尿毒症によることから、最長飼育期間を 6 ヶ月に設定した。先ず、最長観察期間として設定した作成 6 ヶ月後のラットを用いて、化学発光を利用した

検出系による DNA チップ解析を行った。その結果、近位尿細管において約 27,000 遺伝子の内 Sham で 12,196 種、5/6 腎摘出ラットで 10,333 種検出された。さらに、5/6 腎摘出によって 100 倍以上の発現上昇が 95 種 (Table 1)、一方、1/100 以下に低下するものとして 82 種の遺伝子が抽出された (Table 2)。この内、30%以上の遺伝子については公のデータベース上機能未知として分類されており、新規の末期腎不全遺伝子として関連づけられることが期待された。なお、内部標準遺伝子と考えられる GAPDH や β アクチンの発現レベルは 5/6 腎摘出による変化率が 1.5 倍以内であった。

Table 1. 5/6 腎摘出ラット残存腎において発現上昇が認められた遺伝子群の上位 30 リスト (Nx, 5/6 腎摘出ラット; *Unknown*, 未知遺伝子)

Rank	Signal Ratio (Nx/sham)	Gene Name	Category	Accession Number
1	1220		<i>Unknown</i>	
2	901		<i>Unknown</i>	
3	897	cardiac myosin light chain 2	Select calcium binding protein	NM30304.1
4	821		<i>Unknown</i>	
5	663	ryanodine receptor type 1	ligand-gated ion channel	AF130879.1
6	633		<i>Unknown</i>	
7	625		<i>Unknown</i>	
8	608		<i>Unknown</i>	
9	607		<i>Unknown</i>	
10	568		<i>Unknown</i>	
11	561		<i>Unknown</i>	
12	556		<i>Unknown</i>	
13	532		<i>Unknown</i>	
14	498		<i>Unknown</i>	
15	460		<i>Unknown</i>	
16	422		<i>Unknown</i>	
17	420		<i>Unknown</i>	
18	417		<i>Unknown</i>	
19	413		<i>Unknown</i>	
20	383	cholinergic receptor	Acetylcholine receptor	NM_017194.1
21	381		<i>Unknown</i>	
22	316	putative phosphate-phosphoenolpyruvate translocator		NM_153316.1
23	305		<i>Unknown</i>	
24	281	oxytocin receptor	G-protein coupled receptor	NM_012871.2
25	278		<i>Unknown</i>	
26	278		<i>Unknown</i>	
27	275		<i>Unknown</i>	
28	257	doublecortin		NM_053379.2
29	243		<i>Unknown</i>	
30	238	phospholipase A2, group 10	Phospholipase	NM_017176.1

Table 2. 5/6 腎摘出ラット残存腎において発現低下が認められた遺伝子群の上位 30 リスト
(Nx, 5/6 腎摘出ラット; *Unknown*, 未知遺伝子)

Rank	Signal Ratio (Nx/sham)	Gene Name	Category	Accession Number
1	0.0004		<i>Unknown</i>	
2	0.0008		<i>Unknown</i>	
3	0.0012		<i>Unknown</i>	
4	0.0012		<i>Unknown</i>	
5	0.0013		<i>Unknown</i>	
6	0.0013		<i>Unknown</i>	
7	0.0014	olfactory receptor gene Olf724	G-protein coupled receptor	NM_001000573.1
8	0.0015		<i>Unknown</i>	
9	0.0017	heat shock protein 70	Hsp 70 family	Z75029.1
10	0.0017		<i>Unknown</i>	
11	0.0019	capacitative calcium channel TRPC7	ion channel	AY390391.1
12	0.0020		<i>Unknown</i>	
13	0.0020		<i>Unknown</i>	
14	0.0022		<i>Unknown</i>	
15	0.0022		<i>Unknown</i>	
16	0.0023		<i>Unknown</i>	
17	0.0024		<i>Unknown</i>	
18	0.0024		<i>Unknown</i>	
19	0.0028		<i>Unknown</i>	
20	0.0028	ras homolog gene family, member V	G-protein, Small GTPase	NM_138542.1
21	0.0029		<i>Unknown</i>	
22	0.0030		<i>Unknown</i>	
23	0.0030		<i>Unknown</i>	
24	0.0030		<i>Unknown</i>	
25	0.0031		<i>Unknown</i>	
26	0.0033	aminolevulinic acid synthase 2	transferase	NM_013197.1
27	0.0033	KRAB box transcription factor		
28	0.0034		<i>Unknown</i>	
29	0.0035		<i>Unknown</i>	
30	0.0036		<i>Unknown</i>	

存されていることが判明した (Fig. 1)。

新規トランスポータのクローニング；我々が既に確立したラット腎 mRNA 発現データベースを用いて、新規遺伝子群の中から推定 8 回以上の膜貫通部位を有するタンパク質に着目したところ、機能未知の新規遺伝子を 2 種クローン化することができた。これらをクローン A 及び B と符号化した後に以降の解析に使用した。RACE 法によって全長 cDNA を単離した結果、塩基配列はラットゲノムプロジェクトによって推定され、NCBI 上に登録されているものと一致した。同時に、他の生物種における塩基配列データベースも調べた結果、機能未知であるもののクローン A は生物種を超えて広く保存されていること、クローン B も主要なほ乳類において高く保

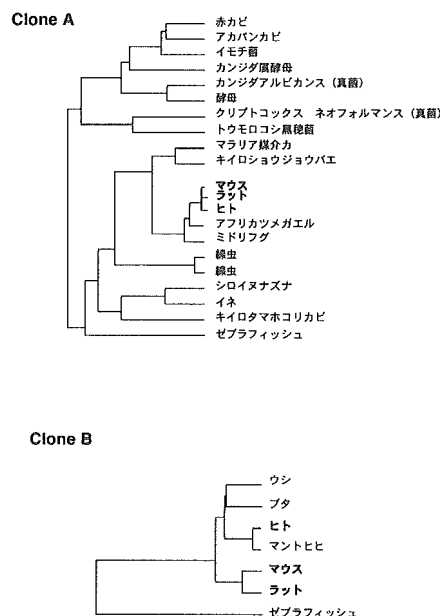


Fig. 1. EVOLUTIONAL TREES OF CLONE A AND B

各クローンの N 末端側を蛍光色素タンパク質 GFP ラベル化の後に、HEK293 細胞にトランスフェクションを行い、これらタンパク質の細胞内局在について調べた。その結果、クローン A は主に細胞内小器官の膜上に、クローン B は細胞膜上に発現することが認められた。mRNA レベルによるこれら遺伝子の組織分布について調べた結果、脳、心臓、肺、肝臓、小腸及び腎臓の組織全てに発現することが明らかとなった。さらに、ヒト型カウンターパートと考えられる遺伝子の塩基配列を参考に RT-PCR 法による mRNA レベルの検出を試みた結果、ヒト胎児腎由来 (HEK) 培養細胞 293、ヒト腸由来上皮細胞 Caco-2、SW480、LS174T、ヒト血球系培養細胞 K562、Jurkat、HL-60 及びヒト胃癌由来培養細胞 MKN の調べた全ての細胞にも発現することが認められた。次に、これら cDNA を HEK293 細胞に一過性発現させた後に、約 30 種の放射性標識化合物をプローブとして輸送実験を行った。その結果、我々が既に有している化合物は全て基質として認識されないことが示された。

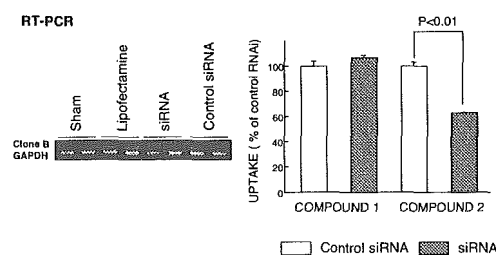


Fig. 2. EFFECT OF mRNA KNOCK-DOWN BY siRNA ON FUNCTION OF CLONE B

さらに、siRNA を用いたノックダウンを試みたところ、クローン B の mRNA レベルは

検出限界程度にまで抑制されたが、コントロール siRNA による抑制は認められなかった。そこで本発現抑制系を用いて、輸送活性の低下を指標とした基質のスクリーニングを行ったところ、一部の生体必須化合物が基質として同定された (Fig. 2)。

単離尿細管を用いた遺伝子発現実験系の構築: ラット腎より近位尿細管を単離し、種々薬物または生体物質の共存下でトランスポータの発現調節を直接的に調べる実験系の構築を試みた。本年度では、近位尿細管の単離条件及び単離後の処理条件の検討を行い、再現性の高い結果を得るための条件検討を終えた。特に、ラット (r) OCT2 の発現制御化合物として知られるテストステロンをモデル化合物として用い、rOCT2 mRNA 発現変動を陽性コントロールとして検討を重ねた。その結果、近位尿細管の単離 2 時間におけるデータ収集が可能なが示された。

D. まとめと考察

慢性腎不全ラットを用いた遺伝子発現解析: 5/6 腎摘出处置後 24 週間 (約 6 ヶ月) 経過した後のラット残存腎より糸球体又は近位尿細管を単離し、DNA チップ解析を行ったところ、末期腎不全の状態における発現亢進を示す遺伝子が 95 種、一方発現退化を示す遺伝子が 82 種見出された。これまで、whole kidney を用いた遺伝子発現解析が広く行われてきたが、末期腎不全では腎間質へのマクロファージ、リンパ球の浸潤や繊維芽細胞の増殖などが病理画像からも明らかであり、腎実質細胞における遺伝子発現を正確に

捉えることは困難である。さらに、腎臓の機能単位であるネフロンは、糸球体に引き続き、近位尿細管 (S1、S2、S3)、細いヘンレ下行脚、ヘンレ細い上行脚、太い上行脚 (傍髄質、皮質)、遠位曲尿細管、緻密斑、集合管 (皮質、傍髄質、髄質内層) など 12 分節に分類される。それぞれの分節は特徴的な生理機能を有していることから、whole kidney を用いた遺伝子発現解析からは、個々の細胞における病変に対するレスポンスを正確に捉えることはできない。本研究では、これらを改良するために、高感度なマイクロアレイ解析を実施した。すなわち、慢性腎不全モデルラット腎より糸球体並びに近位尿細管を実体顕微鏡下で単離することによって、均一な細胞 (尿細管分節) 集団を調製し、抽出された RNA を鋳型としたプローブアンチセンス RNA の合成を行った。その結果、Table 1 及び 2 で認められるように、これまで慢性腎不全の末期において高発現することが示されている炎症性サイトカインに関連する遺伝子は検出されなかった。これらの結果は、これまで報じられてきた末期腎不全時における炎症性サイトカイン遺伝子の発現亢進は、腎実質細胞ではなく、むしろ浸潤細胞における発現亢進を反映していたことが推察された。一方、Table 1 の 30 位にランクされているフォスホリパーゼ A2 は、炎症反応であるアラキドン酸カスケードの引き金になることから、近位尿細管上皮細胞においても炎症反応が進むことも示唆された。今後、5/6 腎摘出处置後経時的な遺伝子発

現解析を進めることによって、近位尿細管細胞における遺伝子発現プロファイルが精密に得られることが予想され、得られるデータを用いた新たな腎機能保護法並びに薬物腎挙動の予測法確立に役立つことが期待される。

新規トランスポータ様遺伝子のクローニング: 我々が既に構築したラット腎遺伝子発現データベースを用いることによって、新規トランスポータ様遺伝子を 2 種クローニングすることができた。本遺伝子は、cDNA ライブラリーにおいて、0.1%以上の発現頻度を示すデータベースより単離されたことから、腎において高発現が期待できる遺伝子である。一方、他の発現臓器を調べた結果、ほぼ全ての細胞に存在することが判明した。さらに、何れの遺伝子も生物種を超えて高く保存されていることから、細胞の生命維持または増殖に密接に関わることが推察される。さらに、クローン B については、一部の生体必須化合物を認識することが強く示唆された。これまで、本化合物を輸送するトランスポータは未知であることから、極めて重要な発見に繋がることが期待される。現在特異抗体の作成を継続しており、本遺伝子がコードするタンパク質の生理学的役割の解明のみならず、クローン B を標的とした創薬戦略へと繋がることが期待される。

単離尿細管を用いた遺伝子発現実験系の構築: 近位尿細管の有用なモデル細胞は、プタ LLC-PK1 やイヌ MDCK など存在するが、ゲノム情報の充実したヒト、マウス、ラット

由来の有用なものはほとんど無い。さらに、種々腎トランスポータ発現調節に関する検討が in vivo で行われているが、day 単位の検討であり直接的に証明するものではない。そこで、ラット腎より近位尿細管を単離し、種々薬物または生体物質の共存下でトランスポータの発現調節を直接的に調べる実験系の構築を試みた。本年度では、腎特異的有機カチオントランスポータ rOCT2 をモデル遺伝子として用い、近位尿細管の単離条件及び単離後の処理条件の検討を終えた。

以上、平成 16 年度では慢性腎不全モデルラットを作成し、近位尿細管又は糸球体特異的な遺伝子発現プロファイル作成のための実験系の確立と、新規トランスポータ様遺伝子のクローニングを行うことができた。今後、腎病変の進展に関わる重要遺伝子の抽出と腎保護への関わり等を明らかにしていく予定である。

E. 成果発表

1. 論文発表

- 1) Shimizu, Y., Masuda, S., Nishihara, K., Ji, L., Okuda, M., and Inui, K., Increased protein level of PEPT1 intestinal H⁺/peptide cotransporter up-regulates absorption of glycylsarcosine and ceftibuten in 5/6 nephrectomized rats. *Am J Physiol Gastrointestinal Liver Physiol* **in press** (2005)
- 2) Omae, T., Goto, M., Shimomura, M., Masuda, S., Okuda, M., and Inui, K., Transient up-regulation of P-glycoprotein reduces tacrolimus absorption after ischemia-reperfusion injury in rat ileum. *Biochem Pharmacol* **69** (4) 560-567 (2005)
- 3) Fukudo, M., Yano, I., Masuda, S., Okuda, M., and Inui, K., Distinct inhibitory effects of tacrolimus and cyclosporin A on calcineurin phosphatase activity. *J Pharmacol Exp Ther* **312** (2) 816-825 (2005)
- 4) Sakurai, Y., H., M., Ueo, H., Masuda, S., Saito, H., Okuda, M., Mori, N., Maysuura, M., Doi, T., Fukatsu, A., Ogawa, O., and Inui, K., Expression levels of renal organic anion transporters (OATs) and their correlation with anionic drug excretion in patients with renal disease. *Pharm Res* **21** (1) 61-67 (2004)
- 5) Horiba, N., Masuda, S., Takeuchi, A., Saito, H., Okuda, M., and Inui, K., Gene expression variance based on random sequencing in rat remnant kidney. *Kidney Int* **66** (1) 29-45 (2004)
- 6) Uwai, Y., Masuda, S., Goto, M., Motohashi, H., Saito, H., Okuda, M., Nakamura, E., Ito, N., Ogawa, O., and Inui, K., Common single nucleotide polymorphisms of *MDR1* gene have no influence on its mRNA expression level of normal kidney cortex and renal cell carcinoma in Japanese nephrectomized

patients. *J Hum Genet* **49** (1) 40-45
(2004)

7) Nakamura, N., Masuda, S., Takahashi, K., Saito, H., Okuda, M., and Inui, K., Decreased Expression of Glucose and Peptide Transporters in Rat Remnant Kidney. *Drug Metab Pharmacokin* **19** (1) 41-47 (2004)

8) Mikkaichi, T., Suzuki, T., Onogawa, T., Tanemoto, M., Mizutamari, H., Okada, M., Chaki, T., Masuda, S., Tokui, T., Eto, N., Abe, M., Satoh, F., Unno, M., Hishinuma, T., Inui, K., Ito, S., Goto, J., and Abe, T., Isolation and characterization of a digoxin transporter and its rat homologue expressed in the kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* **101** (10) 3569-3574 (2004)

H. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1) 特許取得 | なし |
| 2) 実用新案登録 | なし |
| 3) その他 | なし |

2. 学会発表

1) 国際学会

- (1) S Masuda, N Horiba, C Onishi, M Uesugi, M Okuda, K Inui: Decreased expression of NaGLT1 protein and glucose/fructose reabsorption in rat remnant kidney, ASN (米国腎臓学会) Renak Week 2004, October 27- November 1, Cent Luis, USA

2) 国内学会

なし