

各個研究報告書

「イコサペント酸による常染色体優性遺伝多発性嚢胞腎の治療」

研究協力者 浜崎 智仁

富山大学 和漢医薬学総合研究所 臨床科学研究部門

研究要旨

常染色体優性遺伝多発性嚢胞腎の患者に対して、イコサペント酸を投与し、その効果を検討する。

A. 研究目的

常染色体優性遺伝多発性嚢胞腎（以下多発性嚢胞腎）は、腎臓をはじめとする臓器に嚢胞が多発する遺伝性疾患で、罹患率が約 1,000 人に 1 人と、遺伝性腎疾患の中で最も頻度が高い。多発性嚢胞腎の病態は一部の腎尿細管上皮細胞から嚢胞が発生し、増大する過程と、さらに嚢胞を形成しない尿細管の萎縮と、腎実質の炎症が起り腎硬化症へと進展していくことにより機能ネフロンが減少する過程の 2 つの特徴を持つ。本研究では、 ω 3 不飽和脂肪酸であるイコサペント酸（ethyl-icosapentate、商品名エパデール、持田製薬より発売）が現在高脂血症に対する医薬品として認可され、かつ臨床上の副作用が少ないことから、イコサペント酸の多発性嚢胞腎の腎不全進行に対する薬効を検討するものである。

B. 研究方法

15 歳以上 70 歳未満の終末期腎不全に至っていない多発性嚢胞腎患者を対象とした。出血性消化性潰瘍などの出血性病変を有する患者、頭蓋内動脈瘤がある患者、妊娠予定患者・または妊婦は除外した。当研究所では、回収された検体の処理（赤血球・血漿の分離）を行い、脂肪酸の解析を行った。また、同時に食事調査（思い出し法）の解析を行った。更に別の試験 (Hamazaki K et al. In Vivo 20:397-401, 2006) で測定した赤血球中の脂肪酸（健康者 n=20）との比較も行った。

C. 結果

【血中の脂肪酸について】

研究開始時の血漿中総脂質脂肪酸組成および赤血球膜中リン脂質脂肪酸組成を表 1, 2 に示した。両群間において、特に有意差は認められなかつ

た。また、6ヶ月後においてはEPA内服群では、有意にEPAが上昇しており、血漿中では4.0ポイントの上昇(3.3倍)が認められ、赤血球膜中では3.6ポイントの上昇(2.9倍)が認められた。更に、その上昇は24ヶ月目まで持続していることがわかる(図1, 2)。また患者(n=41)と健常者(n=20)とのでの比較では(表10)、多価不飽和脂肪酸においてリノール酸(18:2 n-6)は有意に患者で高く、ドコサペンタエン酸(22:5 n-3)有意に低かった。

【食事調査より】

食事調査の結果を表7-9に示す。EPA摂取量、またその他の項目において両群間で特に有意差はなかった。

D. 考察

エントリー時の血漿中総脂質脂肪酸組成および赤血球膜中リン脂質脂肪酸組成では両群間で特に有意差はなく、また、食事調査におけるEPA摂取量にも両群間で特に有意差はなく振り分けに問題ないと考えられた。EPA内服群でのEPAの有意な上昇が認められ、24ヶ月目まではほぼ保たれ、被験者のコンプライアンスが高いと考えられた。

また、患者群ではベースラインのドコサペンタエン酸(n-3)やEPA、DHAが健常対照群より低下しており、その病因との関連を今後検討する必要がある。

E. 結論

EPA群で予想通り、血漿中EPAと赤血球膜中EPAの上昇が見られた。ベースライン時での食事中EPAと赤血球膜リン脂質中EPAには相関関係は認められなかった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

H. 研究発表

未定。

I. 論文発表

1. 論文発表

未定。

2. 学会発表

未定。

表 1. 研究開始時の血漿中総脂質脂肪酸組成 (mol%)

| 脂肪酸 | 化学式 | Group | |
|------------------|--------------|--------------|---------------|
| | | 対照群 (n=20) | EPA服用群 (n=20) |
| ラウリン酸 | C 12 : 0 | 0.25 ± 0.18 | 0.36 ± 0.42 |
| ミリスチン酸 | C 14 : 0 | 1.01 ± 0.35 | 1.05 ± 0.68 |
| ミリストレイン酸 | C 14 : 1 n-5 | 感度未満 | 感度未満 |
| パルミチン酸 | C 16 : 0 | 24.10 ± 1.53 | 24.19 ± 2.29 |
| パルミトレイン酸 | C 16 : 1 n-7 | 2.06 ± 0.57 | 2.04 ± 0.57 |
| ステアリン酸 | C 18 : 0 | 6.61 ± 0.41 | 6.44 ± 0.54 |
| オレイン酸 | C 18 : 1 n-9 | 19.49 ± 3.03 | 20.36 ± 3.45 |
| リノール酸 | C 18 : 2 n-6 | 30.95 ± 3.07 | 30.65 ± 4.56 |
| γ-リノレン酸 | C 18 : 3 n-6 | 0.28 ± 0.13 | 0.26 ± 0.13 |
| α-リノレン酸 | C 18 : 3 n-3 | 0.78 ± 0.28 | 0.83 ± 0.20 |
| アラキジン酸 | C 20 : 0 | 0.19 ± 0.03 | 0.18 ± 0.04 |
| 11-エイコセン酸 | C 20 : 1 n-9 | 0.18 ± 0.04 | 0.21 ± 0.11 |
| エイコサジエン酸 | C 20 : 2 n-6 | 0.30 ± 0.05 | 0.30 ± 0.05 |
| 5,8,11-エイコサトリエン酸 | C 20 : 3 n-9 | 0.19 ± 0.03 | 0.19 ± 0.04 |
| ジホモ-γ-リノレン酸 | C 20 : 3 n-6 | 0.84 ± 0.22 | 0.78 ± 0.20 |
| アラキドン酸 | C 20 : 4 n-6 | 4.74 ± 0.89 | 4.62 ± 1.38 |
| エイコサペンタエン酸 | C 20 : 5 n-3 | 1.86 ± 1.31 | 1.83 ± 1.42 |
| ベヘン酸 | C 22 : 0 | 0.48 ± 0.07 | 0.46 ± 0.12 |
| エルシン酸 | C 22 : 1 n-9 | 感度未満 | 感度未満 |
| ドコサテトラエン酸 | C 22 : 4 n-6 | 0.15 ± 0.03 | 0.14 ± 0.05 |
| ドコサペンタエン酸 | C 22 : 5 n-3 | 0.59 ± 0.17 | 0.59 ± 0.17 |
| リグノセリン酸 | C 24 : 0 | 0.40 ± 0.06 | 0.38 ± 0.10 |
| ドコサヘキサエン酸 | C 22 : 6 n-3 | 3.63 ± 1.11 | 3.56 ± 1.24 |
| ネルボン酸 | C 24 : 1 | 0.92 ± 0.20 | 0.88 ± 0.29 |

表 2. 研究開始時の赤血球膜中リン脂質脂肪酸組成 (Area%)

| 脂肪酸 | 化学式 | Group | |
|------------------|--------------|--------------|---------------|
| | | 対照群 (n=20) | EPA服用群 (n=20) |
| ラウリン酸 | C 12 : 0 | 0.02 ± 0.04 | 0.06 ± 0.06 |
| ミリスチン酸 | C 14 : 0 | 0.30 ± 0.07 | 0.33 ± 0.09 |
| ミリストレイン酸 | C 14 : 1 n-5 | 感度未満 | 感度未満 |
| パルミチン酸 | C 16 : 0 | 24.66 ± 1.39 | 24.69 ± 1.18 |
| パルミトレイン酸 | C 16 : 1 n-7 | 0.32 ± 0.18 | 0.38 ± 0.20 |
| ステアリン酸 | C 18 : 0 | 14.62 ± 1.36 | 14.35 ± 1.84 |
| オレイン酸 | C 18 : 1 n-9 | 14.33 ± 0.63 | 14.25 ± 0.63 |
| リノール酸 | C 18 : 2 n-6 | 10.51 ± 0.91 | 10.46 ± 1.00 |
| γ-リノレン酸 | C 18 : 3 n-6 | 0.01 ± 0.02 | 0.01 ± 0.02 |
| α-リノレン酸 | C 18 : 3 n-3 | 0.19 ± 0.12 | 0.23 ± 0.27 |
| アラキジン酸 | C 20 : 0 | 0.40 ± 0.09 | 0.38 ± 0.15 |
| 11-エイコセン酸 | C 20 : 1 n-9 | 0.19 ± 0.04 | 0.20 ± 0.06 |
| エイコサジエン酸 | C 20 : 2 n-6 | 0.28 ± 0.09 | 0.34 ± 0.15 |
| 5,8,11-エイコサトリエン酸 | C 20 : 3 n-9 | 感度未満 | 感度未満 |
| ジホモ-γ-リノレン酸 | C 20 : 3 n-6 | 1.17 ± 0.30 | 1.22 ± 0.24 |
| アラキドン酸 | C 20 : 4 n-6 | 10.36 ± 1.22 | 10.19 ± 1.52 |
| エイコサペンタエン酸 | C 20 : 5 n-3 | 1.87 ± 0.81 | 1.85 ± 0.92 |
| ベヘン酸 | C 22 : 0 | 1.35 ± 0.19 | 1.28 ± 0.29 |
| エルシン酸 | C 22 : 1 n-9 | 0.05 ± 0.06 | 0.09 ± 0.12 |
| ドコサテトラエン酸 | C 22 : 4 n-6 | 1.31 ± 0.31 | 2.25 ± 3.92 |
| ドコサペンタエン酸 | C 22 : 5 n-3 | 1.88 ± 0.31 | 1.91 ± 0.29 |
| リグノセリン酸 | C 24 : 0 | 3.41 ± 0.36 | 3.24 ± 0.60 |
| ドコサヘキサエン酸 | C 22 : 6 n-3 | 7.20 ± 1.17 | 6.86 ± 1.20 |
| ネルボン酸 | C 24 : 1 | 4.02 ± 0.38 | 3.89 ± 0.54 |

表3. 6ヶ月後の血漿中総脂質脂肪酸組成 (mol%)

| 脂肪酸 | 化学式 | Group | |
|------------------|--------------|--------------|---------------|
| | | 対照群 (n=20) | EPA服用群 (n=20) |
| ラウリン酸 | C 12 : 0 | 0.21 ± 0.14 | 0.23 ± 0.18 |
| ミリスチン酸 | C 14 : 0 | 0.96 ± 0.29 | 0.86 ± 0.53 |
| ミリストレイン酸 | C 14 : 1 n-5 | 感度未満 | 0.11 ± |
| パルミチン酸 | C 16 : 0 | 23.74 ± 1.29 | 24.66 ± 2.96 |
| パルミトレイン酸 | C 16 : 1 n-7 | 1.93 ± 0.49 | 1.82 ± 0.58 |
| ステアリン酸 | C 18 : 0 | 6.64 ± 0.43 | 6.74 ± 0.77 |
| オレイン酸 | C 18 : 1 n-9 | 20.10 ± 2.76 | 19.14 ± 2.51 |
| リノール酸 | C 18 : 2 n-6 | 30.67 ± 2.94 | 27.93 ± 3.87 |
| γ-リノレン酸 | C 18 : 3 n-6 | 0.29 ± 0.12 | 0.21 ± 0.12 |
| α-リノレン酸 | C 18 : 3 n-3 | 0.74 ± 0.25 | 0.72 ± 0.22 |
| アラキジン酸 | C 20 : 0 | 0.20 ± 0.03 | 0.19 ± 0.04 |
| 11-エイコセン酸 | C 20 : 1 n-9 | 0.18 ± 0.04 | 0.17 ± 0.04 |
| エイコサジエン酸 | C 20 : 2 n-6 | 0.29 ± 0.04 | 0.26 ± 0.04 |
| 5,8,11-エイコサトリエン酸 | C 20 : 3 n-9 | 0.19 ± 0.04 | 0.16 ± 0.04 |
| ジホモ-γ-リノレン酸 | C 20 : 3 n-6 | 0.86 ± 0.21 | 0.56 ± 0.16 |
| アラキドン酸 | C 20 : 4 n-6 | 4.74 ± 0.73 | 4.19 ± 0.97 |
| エイコサペンタエン酸 | C 20 : 5 n-3 | 1.99 ± 1.67 | 5.84 ± 2.11 |
| ベヘン酸 | C 22 : 0 | 0.50 ± 0.08 | 0.50 ± 0.14 |
| エルシン酸 | C 22 : 1 n-9 | 0.07 ± | 感度未満 |
| ドコサテトラエン酸 | C 22 : 4 n-6 | 0.13 ± 0.03 | 0.11 ± 0.03 |
| ドコサペンタエン酸 | C 22 : 5 n-3 | 0.56 ± 0.15 | 1.26 ± 0.40 |
| リグノセリン酸 | C 24 : 0 | 0.42 ± 0.08 | 0.42 ± 0.12 |
| ドコサヘキサエン酸 | C 22 : 6 n-3 | 3.82 ± 1.51 | 3.26 ± 0.98 |
| ネルボン酸 | C 24 : 1 | 0.97 ± 0.22 | 0.97 ± 0.28 |

表4. 6ヶ月後の赤血球膜中リン脂質脂肪酸組成 (Area%)

| 脂肪酸 | 化学式 | Group | |
|------------------|--------------|--------------|---------------|
| | | 対照群 (n=20) | EPA服用群 (n=20) |
| ラウリン酸 | C 12 : 0 | 0.04 ± 0.04 | 0.04 ± 0.04 |
| ミリスチン酸 | C 14 : 0 | 0.28 ± 0.08 | 0.28 ± 0.05 |
| ミリストレイン酸 | C 14 : 1 n-5 | 0.03 ± 0.06 | 0.03 ± 0.05 |
| パルミチン酸 | C 16 : 0 | 24.19 ± 1.10 | 24.35 ± 1.21 |
| パルミトレイン酸 | C 16 : 1 n-7 | 0.32 ± 0.16 | 0.29 ± 0.12 |
| ステアリン酸 | C 18 : 0 | 14.99 ± 1.63 | 15.41 ± 1.24 |
| オレイン酸 | C 18 : 1 n-9 | 14.39 ± 0.80 | 14.11 ± 0.66 |
| リノール酸 | C 18 : 2 n-6 | 9.94 ± 1.23 | 8.45 ± 0.81 |
| γ-リノレン酸 | C 18 : 3 n-6 | 0.03 ± 0.05 | 0.01 ± 0.02 |
| α-リノレン酸 | C 18 : 3 n-3 | 0.20 ± 0.17 | 0.22 ± 0.18 |
| アラキジン酸 | C 20 : 0 | 0.35 ± 0.04 | 0.36 ± 0.06 |
| 11-エイコセン酸 | C 20 : 1 n-9 | 0.23 ± 0.04 | 0.22 ± 0.05 |
| エイコサジエン酸 | C 20 : 2 n-6 | 0.32 ± 0.14 | 0.25 ± 0.14 |
| 5,8,11-エイコサトリエン酸 | C 20 : 3 n-9 | 感度未満 | 感度未満 |
| ジホモ-γ-リノレン酸 | C 20 : 3 n-6 | 1.10 ± 0.21 | 0.84 ± 0.20 |
| アラキドン酸 | C 20 : 4 n-6 | 11.13 ± 1.29 | 9.13 ± 1.38 |
| エイコサペンタエン酸 | C 20 : 5 n-3 | 1.87 ± 0.87 | 5.50 ± 1.67 |
| ベヘン酸 | C 22 : 0 | 1.22 ± 0.28 | 1.15 ± 0.19 |
| エルシン酸 | C 22 : 1 n-9 | 0.05 ± 0.05 | 0.07 ± 0.06 |
| ドコサテトラエン酸 | C 22 : 4 n-6 | 1.40 ± 0.35 | 0.93 ± 0.29 |
| ドコサペンタエン酸 | C 22 : 5 n-3 | 2.01 ± 0.29 | 4.30 ± 0.89 |
| リグノセリン酸 | C 24 : 0 | 3.07 ± 0.85 | 2.89 ± 0.78 |
| ドコサヘキサエン酸 | C 22 : 6 n-3 | 7.61 ± 1.35 | 6.28 ± 1.40 |
| ネルボン酸 | C 24 : 1 | 3.57 ± 0.66 | 3.29 ± 0.75 |

表5. 24ヶ月後の血漿中総脂質脂肪酸組成 (mol%)

| 脂肪酸 | 化学式 | Group | |
|------------------|------------|--------------|---------------|
| | | 対照群 (n=20) | EPA服用群 (n=21) |
| ラウリン酸 | C 12:0 | 0.26 ± 0.14 | 0.15 ± 0.07 |
| ミリスチン酸 | C 14:0 | 1.05 ± 0.40 | 0.98 ± 0.58 |
| ミリストレイン酸 | C 14:1 n-5 | 0.13 ± 0.06 | 0.18 ± 0.08 |
| パルミチン酸 | C 16:0 | 23.42 ± 1.50 | 23.63 ± 1.78 |
| パルミトレイン酸 | C 16:1 n-7 | 2.13 ± 0.48 | 2.18 ± 0.76 |
| ステアリン酸 | C 18:0 | 6.62 ± 0.53 | 6.59 ± 0.70 |
| オレイン酸 | C 18:1 n-9 | 19.92 ± 2.88 | 19.41 ± 3.09 |
| リノール酸 | C 18:2 n-6 | 29.83 ± 3.26 | 27.67 ± 3.94 |
| γ-リノレン酸 | C 18:3 n-6 | 0.56 ± 0.13 | 0.48 ± 0.12 |
| α-リノレン酸 | C 18:3 n-3 | 0.88 ± 0.33 | 0.87 ± 0.24 |
| アラキジン酸 | C 20:0 | 0.21 ± 0.03 | 0.20 ± 0.04 |
| 11-エイコセン酸 | C 20:1 n-9 | 0.19 ± 0.05 | 0.17 ± 0.04 |
| エイコサジエン酸 | C 20:2 n-6 | 0.31 ± 0.06 | 0.28 ± 0.05 |
| 5,8,11-エイコサトリエン酸 | C 20:3 n-9 | 0.25 ± 0.04 | 0.24 ± 0.04 |
| ジホモ-γ-リノレン酸 | C 20:3 n-6 | 0.86 ± 0.19 | 0.65 ± 0.21 |
| アラキドン酸 | C 20:4 n-6 | 4.86 ± 0.95 | 4.42 ± 1.23 |
| エイコサペンタエン酸 | C 20:5 n-3 | 2.26 ± 1.60 | 5.47 ± 2.44 |
| ベヘン酸 | C 22:0 | 0.48 ± 0.09 | 0.50 ± 0.13 |
| エルシン酸 | C 22:1 n-9 | 感度未満 | 0.03 ± 0.00 |
| ドコサテトラエン酸 | C 22:4 n-6 | 0.18 ± 0.04 | 0.16 ± 0.08 |
| ドコサペンタエン酸 | C 22:5 n-3 | 0.64 ± 0.22 | 1.15 ± 0.39 |
| リグノセリン酸 | C 24:0 | 0.45 ± 0.08 | 0.47 ± 0.12 |
| ドコサヘキサエン酸 | C 22:6 n-3 | 3.70 ± 1.28 | 3.38 ± 1.02 |
| ネルボン酸 | C 24:1 | 1.02 ± 0.29 | 1.04 ± 0.33 |

表6. 24ヶ月後の赤血球膜中リン脂質脂肪酸組成 (Area%)

| 脂肪酸 | 化学式 | Group | |
|------------------|------------|--------------|---------------|
| | | 対照群 (n=20) | EPA服用群 (n=21) |
| ラウリン酸 | C 12:0 | 0.00 ± 0.00 | 0.01 ± 0.02 |
| ミリスチン酸 | C 14:0 | 0.27 ± 0.06 | 0.29 ± 0.08 |
| ミリストレイン酸 | C 14:1 n-5 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.01 |
| パルミチン酸 | C 16:0 | 26.16 ± 1.38 | 26.36 ± 1.15 |
| パルミトレイン酸 | C 16:1 n-7 | 0.24 ± 0.16 | 0.34 ± 0.26 |
| ステアリン酸 | C 18:0 | 12.75 ± 0.80 | 12.46 ± 1.01 |
| オレイン酸 | C 18:1 n-9 | 14.33 ± 0.72 | 14.58 ± 1.02 |
| リノール酸 | C 18:2 n-6 | 10.21 ± 1.15 | 9.05 ± 0.84 |
| γ-リノレン酸 | C 18:3 n-6 | 0.05 ± 0.11 | 0.17 ± 0.24 |
| α-リノレン酸 | C 18:3 n-3 | 0.17 ± 0.03 | 0.18 ± 0.04 |
| アラキジン酸 | C 20:0 | 0.35 ± 0.04 | 0.36 ± 0.04 |
| 11-エイコセン酸 | C 20:1 n-9 | 0.20 ± 0.04 | 0.19 ± 0.05 |
| エイコサジエン酸 | C 20:2 n-6 | 0.22 ± 0.03 | 0.24 ± 0.12 |
| 5,8,11-エイコサトリエン酸 | C 20:3 n-9 | 感度未満 | 感度未満 |
| ジホモ-γ-リノレン酸 | C 20:3 n-6 | 0.91 ± 0.18 | 0.76 ± 0.15 |
| アラキドン酸 | C 20:4 n-6 | 9.92 ± 1.43 | 7.97 ± 1.86 |
| エイコサペンタエン酸 | C 20:5 n-3 | 1.80 ± 0.99 | 4.40 ± 1.79 |
| ベヘン酸 | C 22:0 | 1.51 ± 0.20 | 1.52 ± 0.17 |
| エルシン酸 | C 22:1 n-9 | 0.02 ± 0.03 | 0.01 ± 0.02 |
| ドコサテトラエン酸 | C 22:4 n-6 | 1.36 ± 0.38 | 0.94 ± 0.43 |
| ドコサペンタエン酸 | C 22:5 n-3 | 1.93 ± 0.39 | 3.72 ± 1.00 |
| リグノセリン酸 | C 24:0 | 4.41 ± 0.48 | 4.46 ± 0.53 |
| ドコサヘキサエン酸 | C 22:6 n-3 | 6.76 ± 1.19 | 5.64 ± 1.45 |
| ネルボン酸 | C 24:1 | 4.55 ± 0.57 | 4.49 ± 0.58 |

図 1. 血漿総脂質中の EPA (mol%) の変化

分散分析表 : 血漿中のEPAの変動

| | 自由度 | 平方和 | 平均平方 | F値 | p値 | ラムダ | 検出力 |
|---------------------------|-----|---------|---------|--------|--------|--------|-------|
| 群 | 1 | 152.036 | 152.036 | 27.971 | <.0001 | 27.971 | 1.000 |
| 対象 (群) | 37 | 201.113 | 5.435 | | | | |
| カテゴリー 血漿中のEPAの変動 | 2 | 110.243 | 55.121 | 30.559 | <.0001 | 61.119 | 1.000 |
| カテゴリー 血漿中のEPAの変動 * 群 | 2 | 85.982 | 42.991 | 23.834 | <.0001 | 47.669 | 1.000 |
| カテゴリー 血漿中のEPAの変動 * 対象 (群) | 74 | 133.477 | 1.804 | | | | |

基本統計量 : 血漿中のEPAの変動

効果 : カテゴリー 血漿中のEPAの変動 * 群

| | 例数 | 平均値 | 標準偏差 | 標準誤差 |
|------------------|----|-------|-------|------|
| EPA, 血漿EPA 0ヶ月目 | 19 | 1.741 | 1.408 | .323 |
| EPA, 血漿EPA 6ヶ月目 | 19 | 5.740 | 2.127 | .488 |
| EPA, 血漿EPA 24ヶ月目 | 19 | 5.467 | 2.153 | .494 |
| 対照, 血漿EPA 0ヶ月目 | 20 | 1.864 | 1.309 | .293 |
| 対照, 血漿EPA 6ヶ月目 | 20 | 1.979 | 1.672 | .374 |
| 対照, 血漿EPA 24ヶ月目 | 20 | 2.263 | 1.596 | .357 |

交互作用折れ線グラフ : 血漿中のEPAの変動

効果 : カテゴリー 血漿中のEPAの変動 * 群

エラーバー : ± 1 標準偏差

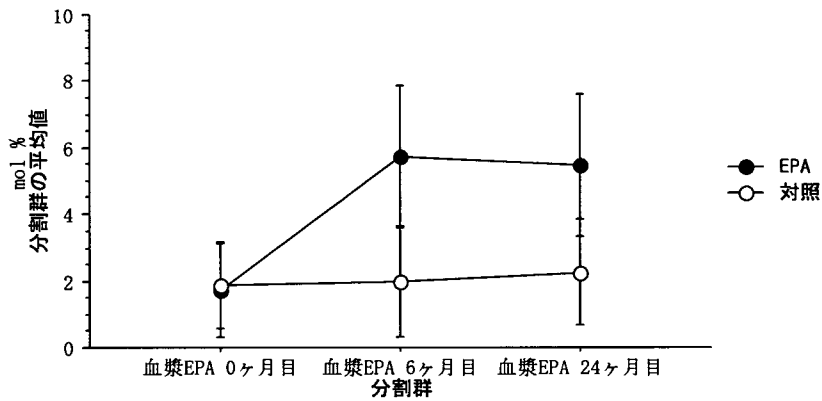


図2. 赤血球膜リン脂質中のEPA (Area%) の変化

分散分析表 : 赤血球膜中のEPAの変動

| | 自由度 | 平方和 | 平均平方 | F値 | p値 | ラムダ | 検出力 |
|----------------------------|-----|---------|---------|--------|--------|--------|-------|
| 群 | 1 | 124.076 | 124.076 | 43.841 | <.0001 | 43.841 | 1.000 |
| 対象(群) | 37 | 104.715 | 2.830 | | | | |
| カテゴリー 赤血球膜中のEPAの変動 | 2 | 66.756 | 33.378 | 39.602 | <.0001 | 79.205 | 1.000 |
| カテゴリー 赤血球膜中のEPAの変動 * 群 | 2 | 68.287 | 34.143 | 40.510 | <.0001 | 81.020 | 1.000 |
| カテゴリー 赤血球膜中のEPAの変動 * 対象(群) | 74 | 62.370 | .843 | | | | |

基本統計量 : 赤血球膜中のEPAの変動

効果 : カテゴリー 赤血球膜中のEPAの変動 * 群

| | 例数 | 平均値 | 標準偏差 | 標準誤差 |
|--------------------|----|-------|-------|------|
| EPA, RBC-EPA 0ヶ月目 | 19 | 1.838 | .942 | .216 |
| EPA, RBC-EPA 6ヶ月目 | 19 | 5.448 | 1.697 | .389 |
| EPA, RBC-EPA 24ヶ月目 | 19 | 4.430 | 1.732 | .397 |
| 対照, RBC-EPA 0ヶ月目 | 20 | 1.869 | .806 | .180 |
| 対照, RBC-EPA 6ヶ月目 | 20 | 1.866 | .870 | .195 |
| 対照, RBC-EPA 24ヶ月目 | 20 | 1.801 | .987 | .221 |

交互作用折れ線グラフ : 赤血球膜中のEPAの変動

効果 : カテゴリー 赤血球膜中のEPAの変動 * 群

エラーバー : ± 1 標準偏差

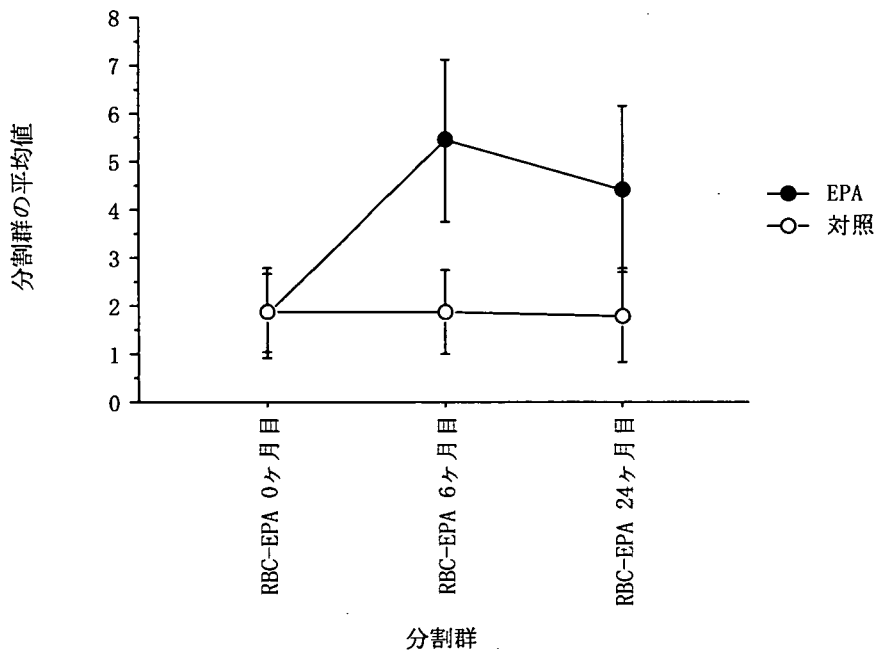


表7 第1回目食事調査から (1日摂取量)

| | | Group | |
|------------|--------|----------------|-----------------|
| | | 対照群(n=20) | EPA服用群(n=20) |
| カロリー | (kcal) | 1712 ± 539 | 2128 ± 1420 |
| 蛋白 | (g) | 64.36 ± 26.44 | 75.36 ± 43.57 |
| 炭水化物 | (g) | 209.39 ± 62.53 | 247.80 ± 101.82 |
| 脂肪 | (g) | 42.24 ± 21.93 | 50.59 ± 28.70 |
| α-リノレン酸 | (g) | 1.08 ± 0.56 | 1.25 ± 0.71 |
| アラキドン酸 | (g) | 0.14 ± 0.08 | 0.16 ± 0.11 |
| EPA | (g) | 0.39 ± 0.26 | 0.50 ± 0.63 |
| DHA | (g) | 0.65 ± 0.41 | 0.82 ± 0.96 |
| n-3系脂肪酸 合計 | (g) | 2.35 ± 1.18 | 2.85 ± 2.47 |
| n-6系脂肪酸 合計 | (g) | 6.86 ± 3.63 | 8.15 ± 4.47 |

平均±標準偏差

表8 第2回目食事調査から (1日摂取量)

| | | Group | |
|------------|--------|----------------|----------------|
| | | 対照群(n=19) | EPA服用群(n=18) |
| カロリー | (kcal) | 1814 ± 525 | 1715 ± 779 |
| 蛋白 | (g) | 66.01 ± 26.05 | 68.67 ± 29.95 |
| 炭水化物 | (g) | 228.28 ± 88.35 | 206.57 ± 86.17 |
| 脂肪 | (g) | 48.59 ± 19.84 | 45.53 ± 23.33 |
| α-リノレン酸 | (g) | 1.26 ± 0.57 | 1.17 ± 0.73 |
| アラキドン酸 | (g) | 0.14 ± 0.08 | 0.15 ± 0.09 |
| EPA | (g) | 0.36 ± 0.26 | 0.47 ± 0.32 |
| DHA | (g) | 0.60 ± 0.41 | 0.77 ± 0.50 |
| n-3系脂肪酸 合計 | (g) | 2.42 ± 1.17 | 2.68 ± 1.25 |
| n-6系脂肪酸 合計 | (g) | 8.00 ± 3.47 | 7.51 ± 4.43 |

平均±標準偏差

表9 第3回目食事調査から (1日摂取量)

| | | Group | |
|---------|--------|----------------|-----------------|
| | | 対照群(n=18) | EPA服用群(n=21) |
| カロリー | (kcal) | 1756 ± 469 | 1836 ± 892 |
| 蛋白 | (g) | 61.80 ± 23.69 | 65.75 ± 25.69 |
| 炭水化物 | (g) | 218.04 ± 73.20 | 245.62 ± 130.63 |
| 脂肪 | (g) | 42.81 ± 16.30 | 44.37 ± 20.68 |
| α-リノレン酸 | (g) | 1.10 ± 0.49 | 1.13 ± 0.63 |
| アラキドン酸 | (g) | 0.12 ± 0.06 | 0.13 ± 0.07 |
| EPA | (g) | 0.39 ± 0.28 | 0.38 ± 0.27 |
| DHA | (g) | 0.63 ± 0.43 | 0.63 ± 0.43 |
| n-3 合計 | (g) | 2.33 ± 1.21 | 2.36 ± 1.05 |
| n-6 合計 | (g) | 6.88 ± 2.89 | 7.14 ± 3.81 |

平均±標準偏差

表 10 ベースラインにおける赤血球膜中リン脂質脂肪酸組成

| 脂肪酸 | 化学式 | Group | | t-test P value |
|------------------|--------------|--------------|--------------|-------------------|
| | | 対照群 (n=20) | 患者 (n=41) | |
| ラウリン酸 | C 12 : 0 | 0.03 ± 0.06 | 0.04 ± 0.05 | 0.28 |
| ミリスチン酸 | C 14 : 0 | 0.37 ± 0.10 | 0.32 ± 0.08 | 0.08 |
| ミリストレイン酸 | C 14 : 1 n-5 | 0.04 ± 0.13 | 0.00 ± 0.01 | 0.06 |
| パルミチン酸 | C 16 : 0 | 26.91 ± 3.36 | 24.66 ± 1.26 | 0.0004 |
| パルミトレイン酸 | C 16 : 1 n-7 | 0.40 ± 0.18 | 0.36 ± 0.20 | 0.46 |
| ステアリン酸 | C 18 : 0 | 14.59 ± 1.16 | 14.49 ± 1.58 | 0.79 |
| オレイン酸 | C 18 : 1 n-9 | 13.21 ± 1.05 | 14.30 ± 0.62 | 0.000 |
| リノール酸 | C 18 : 2 n-6 | 9.00 ± 1.66 | 10.56 ± 1.04 | 0.000 |
| γ-リノレン酸 | C 18 : 3 n-6 | 0.11 ± 0.09 | 0.01 ± 0.02 | 0.000 |
| α-リノレン酸 | C 18 : 3 n-3 | 0.16 ± 0.11 | 0.21 ± 0.20 | 0.29 |
| アラキジン酸 | C 20 : 0 | 0.37 ± 0.14 | 0.39 ± 0.12 | 0.59 |
| 11-エイコセン酸 | C 20 : 1 n-9 | 0.23 ± 0.04 | 0.20 ± 0.05 | 0.07 |
| エイコサジエン酸 | C 20 : 2 n-6 | 0.24 ± 0.13 | 0.31 ± 0.13 | 0.03 |
| 5,8,11-エイコサトリエン酸 | C 20 : 3 n-9 | 感度未満 | 感度未満 | |
| ジホモ-γ-リノレン酸 | C 20 : 3 n-6 | 1.06 ± 0.24 | 1.20 ± 0.27 | 0.05 |
| アラキドン酸 | C 20 : 4 n-6 | 10.20 ± 1.10 | 10.24 ± 1.37 | 0.92 |
| エイコサペンタエン酸 | C 20 : 5 n-3 | 2.30 ± 0.87 | 1.87 ± 0.85 | 0.07 |
| ベヘン酸 | C 22 : 0 | 1.23 ± 0.34 | 1.31 ± 0.25 | 0.30 |
| エルシン酸 | C 22 : 1 n-9 | 0.11 ± 0.12 | 0.06 ± 0.08 | 0.05 |
| ドコサテトラエン酸 | C 22 : 4 n-6 | 1.28 ± 0.32 | 1.76 ± 2.75 | 0.45 |
| ドコサペンタエン酸 | C 22 : 5 n-3 | 2.21 ± 0.47 | 1.89 ± 0.29 | 0.002 |
| リグノセリン酸 | C 24 : 0 | 3.08 ± 0.93 | 3.31 ± 0.50 | 0.20 |
| ドコサヘキサエン酸 | C 22 : 6 n-3 | 7.48 ± 1.45 | 7.02 ± 1.17 | 0.19 |
| ネルボン酸 | C 24 : 1 | 3.84 ± 1.11 | 3.93 ± 0.49 | 0.67 |

対照群は Hamazaki K et al. The effect of eicosapentaenoic acid on prostate-specific antigen. In Vivo. 20:397-401. 2006 より引用

遺伝子操作動物による進行性腎障害
疾病モデル開発に関する研究班
分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
遺伝子操作動物による進行性腎障害疾病モデル開発に関する研究分科会
分担研究報告書

「遺伝子操作動物による進行性腎障害疾病モデル開発に関する研究」

分担研究者 林松彦 慶應義塾大学医学部内科学・助教授
研究協力者 佐々木成 東京医科歯科大学医学部腎臓内科・教授
下田耕二 慶應義塾大学医学部実験動物センター・専任講師

研究要旨

Cre-loxPシステムを用いて腎疾患に重要と考えられる遺伝子を腎臓の特定の細胞に過剰発現したマウスを作製し、腎疾患の研究のためのモデルマウスを開発することを目的とした。近位尿細管S3セグメント特異的なCreマウスとして、AQP7-Creマウスを作製したが、十分な組織特異性が得られなかった。Creリコンビナーゼ存在下で特定の遺伝子を過剰に発現する、LoxP-hMR、LoxP-LIF、LoxP-IkBΔNの3系統のトランスジェニックマウス（LoxP-マウス）を作製し、分与を受けたTie2-Creマウス、 α -MHC-Creマウス、Nphs1-CreマウスとこれらLoxPマウスを様々に組み合わせることにより、腎臓の特定の細胞に特定の遺伝子を過剰発現するモデルマウスの作製が可能となった。さらに、nephrinのプロモーター下に先天性ネフローゼ症候群の原因遺伝子であるTRPC6の遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを作成し、このTRPC6の疾患における役割を検討しうるマウスを作成した。また、近位尿細管S3部に特異的なプロモーターであるGsl5を利用した、同部位特異的細胞障害マウスの提供を受け検討した結果、急性腎不全、機能再生における近位尿細管S3部の役割を検討するために有用なマウスであることが確認され、今後のこれらの研究の発展が期待されている。

A. 研究目的

モデル動物作製において、遺伝子操作動物であるトランスジェニックマウス、ノックアウトマウスは有効な手法であるが、トランスジェニックマウスやノックアウトマウスでは遺伝子改変がすべての体細胞でおこるため、目的臓器や細胞以外の遺伝子改変の

影響を受けたり、遺伝子の過剰発現または欠損によって胎生致死となり目的の動物を得られないという欠点があった。このような欠点を克服する目的で、組織特異的に遺伝子発現をコントロールする仕組みとして、Cre-loxPシステムが近年脚光を浴びている。Cre-LoxP システムについて簡単に説

明する。まず、特定の細胞集団に特異的に発現する遺伝子のプロモーターを利用することで、特定の細胞に Cre リコンビナーゼを発現する Cre マウスを作製する。Cre リコンビナーゼは2つの並んだ LoxP 配列を認識して切り出す。次に、相同組み換えによって特定の遺伝子の両端に LoxP 配列を2つ挿入したマウス、または、特定の遺伝子上流に2つの LoxP 配列に挟まれた Stop コドンを入れたトランスジーンを導入されたトランスジェニックマウス (LoxP マウス) を作製する。Cre マウスと LoxP マウスを交配すると、Cre リコンビナーゼを発現している細胞でのみ遺伝子の欠失または過剰発現を起こすことが可能である。

Cre-LoxP システムを用いて、腎臓の特定の細胞に特定の遺伝子を過剰発現させたマウスを作製することにより、腎疾患の発症、進行を検討し、創薬対象としての可能性を検証するとともに、各因子の役割を確定する。さらに、疾患の進行を促進させることにより、新規治療薬の有用性を短時間で明らかとすることを可能とするようなモデル動物作製を目的とする。

具体的には近位尿細管 S3 セグメント特異的な Cre マウスを作製するとともに、これまで我々が腎疾患で重要であることを見いだしてきた LIF、MR、I κ B タンパク (またはそのドミナントネガティブ体) の LoxP マウスを作製し、両者を様々な組み合わせで交配することでモデルマウスを作製する。

B. 研究方法

1. AQP7-Cre マウスの作製

近位尿細管 S3 セグメント特異的な Cre マウスを作製するために、近位尿細管 S3 セグメント特異的な遺伝子発現を認める Aquaporin-7(AQP7)に注目し、AQP7-Cre マウスの作製を行った。AQP7 は近位尿細管の中でも、虚血の影響を受けやすく、尿細管の再生現象がもっとも観察される S3 セグメントに特異的に発現している。マウスゲノム DNA 鋳型として、AQP7 遺伝子のプロモーター5.7kbp を PCR で増幅し、塩基配列を確認した。AQP7 プロモーターの下流に rabbit beta-globin のイントロン、核移行シグナルのついた Cre リコンビナーゼ cDNA、SV40 由来の polyA シグナルをつなげたものをトランスジーンのコストラクトとした。KpnI で切断してベクター配列を取り除いた後、C57BL/6 x C3H/He の受精卵の前核にマイクロインジェクションすることにより、トランスジェニックマウスを作製した。トランスジーンの確認は tail DNA を PCR することで確認した。

AQP7-Cre マウスにおいて、Cre が S3 セグメント特異的な発現パターンを示しているかを検討するために、LoxP-EGFP マウスと交配し、Cre の発現を EGFP で可視化した。

2. LoxP-I κ B Δ N マウスの作製

LoxP-I κ B Δ N マウスは Cre 存在下に I κ B のドミナントネガティブ体を過剰発現するトランスジェニックマウス

である。NFκB は、一般には p65、p50、IκB の三種のタンパク質が形成する三量体をさすが、この三量体はサイトカインあるいは free radical などの刺激が加わると、まず IκB がリン酸化され、遊離する。この IκB が引き続きユビキチン化を受け、代謝酵素により分解される。一方、p65、p50 は遊離して核内に移行し、転写領域にある NFκB コンセンサス配列に結合して転写促進を行う。IκBΔN は IκB の N 末端 54 アミノ酸を欠いた変異体であり、リン酸化を受けないために、p65、p50 は遊離できない。したがって、IκBΔN を過剰発現すると、NFκB 活性化を完全に抑制できることを我々は示している (Takase ら、Kidney Int. 2003;63:501-13)。また、アデノウイルスによる IκBΔN の遺伝子導入が尿細管間質病変を抑制することを示している。

東京大学医科学研究所齊藤泉教授より分与された pCALNL5 ベクターを用いることで、CAG プロモーター-LoxP-neo-LoxP-IκBΔN cDNA というコンストラクトを作製した。本コンストラクトでは、Cre リコンビナーゼ非存在下では、CAG プロモーターにより neo が発現するが IκBΔN は発現しない。Cre リコンビナーゼ存在下では、LoxP にはさまれた neo が切り出され、CAG プロモーターにより IκBΔN が発現する。本コンストラクトを Sall-HindIII で切断し、ベクター配列を取り除いた後、C57BL/6 x C3H/He の受精卵の前核にマイクロインジェクシ

ョンすることにより、トランスジェニックマウスを作製した。トランスジェニックの確認は tail DNA を PCR することで確認した。

Cre 存在下で IκBΔN が過剰発現することを検討するために、心筋特異的な Cre マウス (α-MHC-Cre マウス)、足細胞特異的な Cre マウス (Nphs1-Cre マウス) と交配し、double transgenic マウスの心筋細胞と腎組織を用いて RT-PCR、Western Blot をおこなった。

さらに、α-MHC-Cre マウスとの double transgenic マウスにおいて、アルドステロンをミニポンプを用いて 21 日間持続注入し、生食を飲水させて、その心筋障害の程度を対照マウスと比較した。また、Nphs1-Cre マウスとの double transgenic マウスにおいては、nephrotoxic serum nephritis (NTS 腎炎マウス) を生じさせ、対照マウスと比較した。

3. LoxP-LIF マウスの作製

LoxP-LIF マウスは Cre 存在下に LIF (Leukemia Inhibitory Factor) を過剰発現するトランスジェニックマウスである。我々は、虚血再灌流モデルにおいて、近位尿細管 S3 セグメントに LIF が発現し、尿細管の再生を促進していることを報告した (Yoshino ら、J Am Soc Nephrol. 2003;14:3090-101)。

マウス胎児腎臓の RNA より PCR によって得た LIF cDNA を pCALNL5 ベクターに挿入することで、CAG プロモーター-LoxP-neo-LoxP-LIF cDNA というコンストラクトを作製した。本コ

ンストラクトでは、Cre リコンビナーゼ非存在下では、CAG プロモーターにより neo が発現するが、LIF は発現しない。Cre リコンビナーゼ存在下では、LoxP には含まれた neo が切り出され、CAG プロモーターにより LIF が発現する。本コンストラクトを Sall-HindIII で切断し、ベクター配列を取り除いた後、C57BL/6 x C3H/He の受精卵の前核にマイクロインジェクションすることにより、トランスジェニックマウスを作製した。トランスジェニックの確認は tail DNA を PCR することで確認した。

Cre 存在下で LIF が過剰発現することを検討するために、 α -MHC-Cre マウスと交配し、double transgenic マウスの心筋細胞を用いて RT-PCR、Western Blot をおこなった。

4. LoxP-hMR マウスの作製

LoxP-hMR マウスは Cre 存在下にヒト Mineralocorticoid Receptor (MR) を過剰発現するトランスジェニックマウスである。ヒト MR cDNA (Salk 研究所 Evans 博士より分与) を pCALNL5 ベクターに挿入することで、CAG プロモーター-LoxP-neo-LoxP-hMR cDNA というコンストラクトを作製した。本コンストラクトでは、Cre リコンビナーゼ非存在下では、CAG プロモーターにより neo が発現するが、MR は発現しない。Cre リコンビナーゼ存在下では、LoxP には含まれた neo が切り出され、CAG プロモーターにより human MR が発現する。本コンス

トラクトを Sall-HindIII で切断し、ベクター配列を取り除いた後、C57BL/6 x C3H/He の受精卵の前核にマイクロインジェクションすることにより、トランスジェニックマウスを作製した。トランスジェニックの確認は tail DNA を PCR することで確認した。

Cre 存在下で MR が過剰発現することを検討するために、 α -MHC-Cre マウスと交配し、double transgenic マウスの心筋細胞を用いて RT-PCR、Western Blot をおこなった。

5. TRPC6 過剰発現マウスの作製

TRPC6 は、先天性ネフローゼ症候群の原因遺伝子であることが報告されているイオンチャネルの 1 種である。このチャネルは足細胞に腎内では多く発現しており、このチャネルの機能亢進変異が足細胞機能異常を生じて蛋白尿を生じると考えられている。そこで、腎障害モデルマウスを作製するために、nephrin promotor 下にこの TRPC6 を発現するベクターを構築し、transgenic mouse を作製した。さらに、この TRPC6 による足細胞障害には、NFAT という転写調節因子が中心的役割を果たす可能性が示唆されていることから、この NFAT の dominant negative な作用を有する dnNFAT を同様に nephrin promotor 下に発現する transgenic mouse を作製した。

6. Gs15 を用いた近位尿細管細胞特異的細胞障害マウスの作製 モデル動物提供・共同研究者

関根美知子 1)、多屋長治 1)、松岡邦枝 1)、鈴木明身 2)、米川博通 1)

1) 東京都臨床医学総合研究所疾患モデル開発センター、2) 理化学研究所フロンティア研究システム

東京都臨床医学総合研究所疾患モデル開発センターの関根美智子らは近位尿細管 S3 セグメントに特異的なプロモーターとして Gs15 (Glycosphingolipid controlling gene-5) を見出した。Gs15 は、近交系マウス腎臓における中性糖脂質 GL-Y 発現の多型解析から発見された遺伝子座であり、その後の解析から GL-Y のみならず O-結合型糖タンパク質糖鎖の生合成に関わるコア 2 N-アセチルグルコサミン転移酵素 (コア 2 Gnt) 遺伝子の腎臓近位尿細管直部特異的転写調節に必須であるシスの DNA 領域である。関根らの作製した Gs15 遺伝子の下流に EGFP をつないだ Gs15-EGFP トランスジェニックマウスを解析したところ、近位尿細管 S3 セグメントに特異的な EGFP の発現を観察し、Gs15 は近位尿細管 S3 セグメント特異的な発現に必要な領域であることが明らかとなった。

さらに、この Gs15 を標的細胞ノックアウト法 (TRECK 法) に応用し、腎臓近位尿細管直部特異的傷害マウスの作製を試みた。TRECK 法とは、ジフテリア毒素 (DT) に非感受性であるマウスに組織特異的プロモーターと結合したジフテリア毒素受容体 (DTR) を遺伝子導入し、DT を投与することにより組織特異的に傷害を起こ

させる方法である。すなわち、Gs15 配列の下流に DTR として働くヒト HB-EGF (heparin-binding EGF like growth factor) 遺伝子を結合したコンストラクトを用いてトランスジェニックマウスを作製した。

(研究の倫理面への配慮)

細胞・動物実験に関しては、倫理面の問題は生じないが、動物愛護上の問題はあり、Helsinki 宣言を遵守し、慶應義塾大学動物実験指針に則って研究を行った。

C. 結果

1. AQP7-Cre マウスの作製

AQP7-Cre マウスは、15 ラインのファウンダーが生まれた、そのうち 7 ラインに RT-PCR で Cre リコンビナーゼの発現が確認できたが、蛋白レベルでは発現が確認できなかった。そこで、Cre レポーターマウスである LoxP-EGFP と交配することによって、EGFP の発現で Cre 発現部位を可視化した。解析が終了した 5 系統ともほぼ同じような発現パターンであり、目的としていた S3 セグメントにおける発現は認められず、近位尿細管 S1, S2 セグメントに patchy な発現を認めた。また、腎臓以外の臓器での発現は、脂肪、精巣に多かったが、かなり広範な臓器に発現を認めた。以上の結果から本トランスジェニックに用いた AQP7 プロモーターは組織特異性を十分に発揮していないと考えられた。

2. LoxP-I κ B Δ N マウスの作製

糸球体内皮細胞および尿細管周囲間質血管内皮細胞に Cre リコンビナーゼを発現する Tie2-Cre マウスをテキサス大学の柳沢教授、ジョージア医科大学の Koni 準教授より分与を受け、系統維持を行った。また、糸球体上皮細胞特異的な Cre 発現マウスとして、東海大学松阪泰二助教授より Nphs1-Cre マウス（ネフリンプロモーター下に Cre リコンビナーゼを発現するマウス）の分与を受け系統維持を行った。

LoxP-I κ B Δ N マウスは Cre 存在下に I κ B のドミナントネガティブ体を過剰発現するマウス、であり、 α MHC-Cre マウスとの交配でスクリーニングをおこない、蛋白レベルでの発現を認めた 2 系統が確保できた。さらに、特に発現量の高い系統を維持し、Tie2-Cre マウス、 α MHC-Cre マウス、Nphs1-Cre マウスとの交配を行った。Tie2-Cre マウスでは double transgenic マウスは 1 匹も出産せず、生まれて来たマウスは野生型：single transgenic マウス=1:2 であり、double transgenic マウスが胎生致死であることを強く示唆する結果となった。一方、 α MHC-Cre マウス、Nphs1-Cre マウスとの double transgenic マウスは、メンデルの法則にしたがって出生し、検討が可能であった。

先ず、 α -MHC-Cre マウスとの double transgenic マウスで、アルドステロンの心筋障害における NF κ B の役割を検討した。アルドステロンを注入していない対照の double transgenic マウスにおいて、既に心筋の肥大と心

機能の軽度低下が野生型、あるいは single transgenic マウスに比べて認められたが、アルドステロンによる心機能変化は野生型、single transgenic マウスと差異を認めずなかった。特異的 NF κ B 阻害薬の投与でも、アルドステロンによる心筋障害は明らかな変化を認めなかった。

Nphs1-Cre マウスとの double transgenic マウスでは、腎の表現型に差を認めず、尿中アルブミン排泄量も野生型、single transgenic マウスとの間に差異を認めなかった。この double transgenic マウスと、野生型のマウスに NTS 腎炎を生じさせたところ、病理組織的にも、尿蛋白排泄量においても、明らかな double transgenic マウスでの改善を認めた。この結果から、NTS 腎炎の発症には足細胞の NF κ B 活性化が中心的役割を果たすことが証明された。

3. LoxP-LIF マウスの作製

LoxP-LIF マウスについては、 α MHC-Cre マウスとの交配でスクリーニングをおこない、mRNA および蛋白レベルで高発現を認めた 3 系統が確保できた。その中で、LIF が正常の数千倍発現する Line10 を中心に解析を進めている。また、 α MHC-Cre マウスとの交配で、心筋特異的に LIF を発現させると心臓においてある Phenotype が出現しており、投稿準備中である。

4. LoxP-hMR マウスの作製

LoxP-hMR マウスは Cre 存在下にヒ

トミネラルコルチコイド受容体を過剰発現するマウスである。 α MHC-Cre マウスとの交配でスクリーニングをおこない、mRNA レベルで発現を認めた2系統が確保できた。しかし、蛋白レベルでの発現は極めて小さく、心臓の表現型も認められなかった。

5. TRPC6 過剰発現マウスの作製

ネフリンプロモーターの支配下に TRPC6 を足細胞特異的に発現するマウスを作製した。5系統のマウスを得て、継代し、尿蛋白の推移を検討している。12週齢の時点で、野生型に比べて、尿蛋白の増加傾向が見られ、先天性ネフローゼ症候群の原因遺伝子である TRPC6 過剰発現マウスが、腎障害モデル動物として使用可能であることが示唆されている。一方、dnNFAT 強制発現マウスも4系統得られ、腎障害進行における dnNFAT の役割を検討するための実験動物を得ることができた。

6. Gs15 を用いた近位尿細管細胞特異的細胞障害マウスの作製

関根らとともに、Gs15-HB-EGF トランスジェニックマウスの解析を行った。得られたトランスジェニックマウス (B6-Gs15-TRECK Tg) は正常に発生、発育するが、RT-PCR により腎臓特異的に DTR を発現していることが確認された。DT 投与により、尿中に血清アルブミンが排泄され、血中尿素窒素値 (BUN) も上昇した。また、組織学的観察からは近位尿細管 S3 セグメントに著しい傷害が認められた。これらの傷

害は投与量に依存し、DT 投与量が低いと、傷害は投与後3-4日をピークとしてその後は回復するが、高投与量では、投与後6-7日で多くが死亡した。以上より B6-Gs15-TRECK Tg は近位尿細管細胞の腎障害、再生における役割を検討するために優れたモデル動物であることが示された。

D. 考察

今回作製した AQP7-Cre マウスは少なくとも、当初の目的の S3 セグメント特異的な Cre マウスとしての使用は制限されると考える。

3系統の LoxP マウスについては、Nphs1-Cre マウス、Tie2-Cre マウスとの交配によって、それぞれ、足細胞、血管内皮細胞に特異的な過剰発現マウスを作成した。この中で、LoxP-I κ B Δ N マウスは、臓器障害における NF κ B の役割を検討する上で、極めて有用な実験動物であることが証明された。LoxP-LIF マウスも臓器特異的な LIF 発現が可能であり、今後の腎障害、再生における LIF の役割を検討する上で、有用な遺伝子操作動物の提供が可能となった。また、TRPC6 過剰発現マウスも腎障害モデル動物としての有用性が期待され、今後諸研究期間に分与を行っていく予定である。

E. 結論

Cre-LoxP システムを用いたトランスジェニックマウスとして、AQP7-Cre、LoxP-I κ B Δ N、LoxP-LIF、LoxP-hMR と

いうトランスジェニックマウスを製作した。APQ7-Cre マウスは目的の発現パターンを示さなかったが、LoxPの3系統の中で、LoxP-I κ B Δ N マウス、LoxP-LIF マウスは遺伝子操作実験動物としての有用性が証明され、今後の研究の発展に寄与するものと確信している。また、B6-Gs15-TRECK Tg マウスは任意の時期に定量的に、非免疫学的機序によって、近位尿細管 S3 セグメント尿細管細胞を特異的に障害を与えることが出来るマウスといえ、尿細管障害、尿細管再生の研究に有用なモデル動物である。さらに、TRPC6 過剰発現マウスを通じて、ネフローゼ症候群の病態解明が進むことが期待される。

F. 健康危険情報

本研究はヒトを対象とした検討を行っていないので、該当する情報はない。

G. 知的所有権の出現登録状況

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

Takase O, Marumo T, Hishikawa K, Fujita T, Quigg RJ, Hayashi M. "NF- κ B-dependent genes induced by proteinuria and identified using DNA microarrays." *Clinical & Experimental Nephrology*. 2008 (in press)
Takase O, Minto AW, Puri TS, Cunningham PN, Jacob A, Hayashi M, Quigg RJ. "Inhibition of

NF- κ B-dependent Bcl-xL expression by clusterin promotes albumin-induced tubular cell apoptosis." *Kidney International* 73(5):567-77, 2008.

Yoshino J, Monkawa T, Tsuji M, Inukai M, Itoh H, Hayashi M. Snail1 is involved in the renal epithelial-mesenchymal transition. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362(1):63-8, 2007.

Tsuji M, Monkawa T, Yoshino J, Asai M, Fukuda S, Kawachi H, Shimizu F, Hayashi M, Saruta T. Microarray analysis of a reversible model and an irreversible model of anti-Thy-1 nephritis. *Kidney International* 69(6): 996-1004, 2006.

Ichihara A, Kaneshiro Y, Takemitsu T, Sakoda M, Suzuki F, Nakagawa T, Nishiyama A, Inagami T, Hayashi M. Nonproteolytic Activation of Prorenin Contributes to Development of Cardiac Fibrosis in Genetic Hypertension. *Hypertension* 47 (5): 894-900, 2006.

Ichihara A, Kaneshiro Y, Takemitsu T, Sakoda M, Hayashi M. Ambulatory blood pressure variability and brachial-ankle pulse wave velocity in untreated hypertensive patients. *Journal of Human Hypertension* 20(7): 529-536, 2006.

Ichihara A, Suzuki F, Nakagawa T, Kaneshiro Y, Takemitsu T, Sakoda M, Nabi AH, Nishiyama A, Sugaya T, Hayashi M, Inagami T. Prorenin

receptor blockade inhibits development of glomerulosclerosis in diabetic angiotensin II type 1a receptor-deficient mice. *Journal of the American Society of Nephrology* 17(7): 1950-1961, 2006.

Kaneshiro Y, Ichihara A, Takemitsu T, Sakoda M, Suzuki F, Nakagawa T, Hayashi M, Inagami T. Increased expression of cyclooxygenase-2 in the renal cortex of human prorenin receptor gene-transgenic rats. *Kidney International* 70(4): 641-646, 2006.

Marumo T, Uchimura H, Hayashi M, Hishikawa K, Fujita T. Aldosterone impairs bone marrow-derived progenitor cell formation. *Hypertension* 48(3): 490-496, 2006.

Araki T, Hayashi M, Saruta T. Anion-exchange blocker enhances cytoplasmic vacuole formation and cell death in serum-deprived mouse kidney epithelial cells in mice. *Cell Biology International* 30(1): 93-100, 2006.

Takase O, Marumo T, Imai N, Hirahashi J, Takayanagi A, Hishikawa K, Hayashi M, Shimizu N, Fujita T, Saruta T.

NF- κ B-dependent increase in intrarenal angiotensin II induced by proteinuria.

Kidney International 68(2): 464-473, 2005. Hishikawa K, Marumo T, Miura S, Nakanishi A, Matsuzaki Y, Shibata K, Ichiyonagi T, Kohike H, Komori T, Takahashi I, Takase O, Imai N, Yoshikawa M, Inowa T, Hayashi M,

Nakaki T, Nakauchi H, Okano H, Fujita T. Musculin/MyoR is expressed in kidney side population cells and can regulate their function. *The Journal of Cell Biology* 169(6): 921-928, 2005.

2. 学会発表

福田誠一、門川俊明、林 松彦、伊藤裕、「アルドステロンによる腎障害には血圧や尿細管作用にはよらないメカニズムが存在する」第30回日本高血圧学会総会、宜野湾市、2007年10月高瀬 敦、菱川慶一、丸茂丈史、吉川真弘、林 松彦、Quigg Richard、藤田敏郎、「LPS誘発尿細管障害におけるイコサペントエン酸 (EPA) のNF- κ Bを中心とした腎保護作用の解明」第50回日本腎臓学会学術総会、浜松、2007年5月門川俊明、関根美知子、多屋長治、松岡邦枝、吉野 純、犬飼 舞、伊藤 裕、林 松彦、鈴木明身、米川 博道、「ジフテリア毒素受容体を介した近位尿細管S3セグメント特異的除去マウスの作製」第50回日本腎臓学会学術総会、浜松、2007年5月

林 松彦、「臓器再生治療・最近の知見」第49回日本腎臓学会総会、2006年6月、東京

武光 智子、市原淳弘、金城 雪、迫田万里代、河内 裕、清水不二雄、林松彦、「高血圧において増加した非蛋白融解的活性化プロレニンの腎糸球体内局在」第49回日本腎臓学会総会、東京、2006年6月

迫田万里代、市原淳弘、金城 雪、武光智子、林 松彦、中里 優一、中川