

Alport症候群モデルマウスにおける糸球体特異的なCOL4A5発現の回復時期による効果の検討

All rights reserved.

AXCELEAD
Drug Discovery Partners

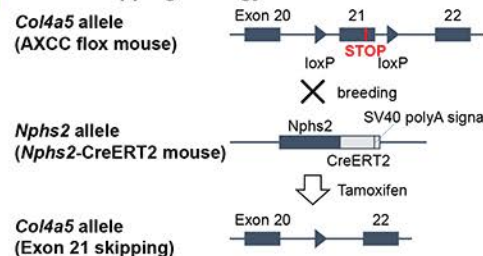
○階上 健太郎、小林 亮介、堀 遼太郎、段林 健太、横山 孝太郎、竹山 道康
(Axcelead Drug Discovery Partners株式会社・Pharmacology BU)

Abstract 【背景】これまでに患者と同様の変異(COL4A5 R471X)を有するAlport症候群(AS)モデルマウスであるAXCCマウスの病態について報告してきた¹。前回、R471X変異を有するエクソン21をloxPで挟んだAXCC floxマウスと、足細胞特異的なCreERT2発現マウスを交雑させ、タモキシフェン投与を行い、エクソンスキッピング(ES)による腎機能改善を報告した。今回、病態の進行度の異なるAS患者におけるESの治療効果をマウスにおいて検証するために、タモキシフェン投与時期を遅らせた試験を実施したので報告する。【方法】タモキシフェン投与群1(6週齢投与)、投与群2(14週齢投与)、および非投与群について経時的な尿検査を行い、22週齢時に腎組織を採材し、病理組織検査、透過型電子顕微鏡検査を実施した。【結果】尿中Albは、投与群1では、投与終了直後から継続的に低値を示し、投与群2では、投与後8週間にかけて低下傾向が確認された。免疫染色においては、投与群1、2共に糸球体特異的なCOL4A5の発現回復が認められた。

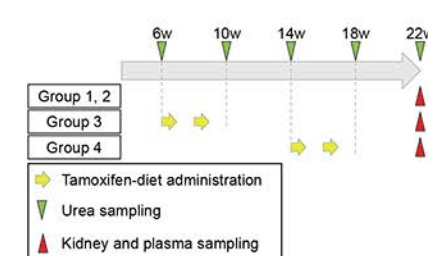
【結語】病態が進行した後のタモキシフェン投与によるESの誘導により、腎機能回復効果が期待できる結果を得た。今回の結果から、Alport症候群の治療のために、核酸医薬品によるエクソンスキッピング法やmRNA補充療法などの新規治療法が有効である可能性が示唆された。

Methods

A. Exon skipping strategy



B. Protocol of Tamoxifen administration



Group	Genotype (flox/CreERT2)	Tamoxifen	Administration period	N
1	wild/wild	-	-	6
2	flox/CreERT2	-	-	6
3	flox/CreERT2	+	6-10w	6
4	flox/CreERT2	+	14-18w	6

flox: AXCC flox, CreERT2: Nphs2-CreERT2
The tamoxifen-diet was administered at a concentration of 0.025% (g/g).

A) The AXCC flox mouse carries a nonsense mutation of exon 21 (c. 1411 C > T, p. R471X) and two loxP sequences flanking exon 21 in Col4a5 allele. The Nphs2-CreERT2 mouse carries the CreERT2 sequence linked to the Nphs2 gene via the T2A sequence. In the AXCC flox; Nphs2-CreERT2 mouse, tamoxifen administration results in glomerular-specific deletion of mutated Col4a5 exon21. B) Starting at 6 or 14 weeks of age, tamoxifen-diet was administered in 2 cycles of 1 week on and 1 week off for 4 weeks. Urea sampling was performed every 4 weeks. Kidney and plasma sampling were performed at 22 weeks of age. The phenotypes of these mice were investigated by the measurement of urinary and blood biochemical parameters, immunostaining, histopathology, and transmission electron microscopy to confirm the effects of tamoxifen administration. Tamoxifen administered flox/CreERT2; flox/CreERT2, Tam(+), non-administered flox/CreERT2; flox/CreERT2, Tam(-).

Results

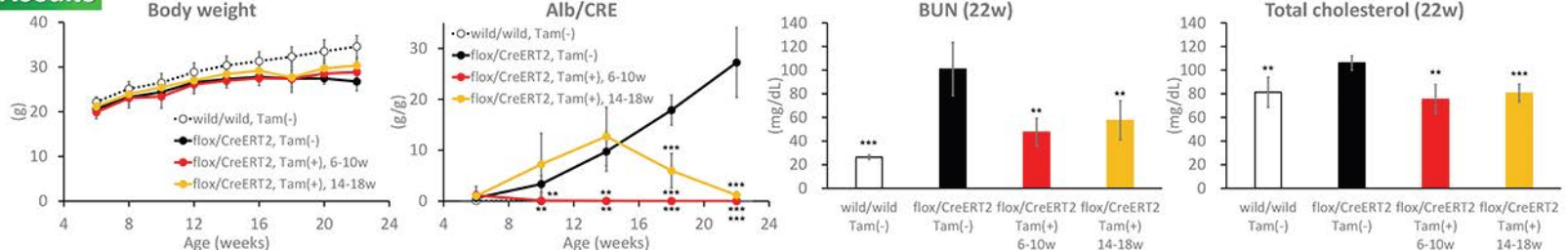


Fig 1: Body weight, urinary Alb/CRE and blood parameters. The flox/CreERT2 groups tended to be slightly underweight compared to the wild/wild group. In the flox/CreERT2, Tam(-) group, urinary Alb/CRE levels increased from 6 to 22 weeks of age. In the Tam(+), 6-10w group, Alb/CRE levels decreased to almost the same levels as in the wild/wild group from 10 to 22 weeks of age after tamoxifen administration. In the Tam(+), 14-18w group, Alb/CRE levels gradually decreased from 14 to 22 weeks after tamoxifen administration, approaching the wild/wild group. In two flox/CreERT2, Tam(+) groups, BUN and total cholesterol in blood were lower than in the flox/CreERT2, Tam(-) group. **: p<0.01, ***: p<0.001 in flox/CreERT2, Tam(-) group vs. other groups by Aspin-Welch t-test. Alb: albumin, CRE: creatinine, BUN: blood urea nitrogen. Data were shown as mean ± SD.

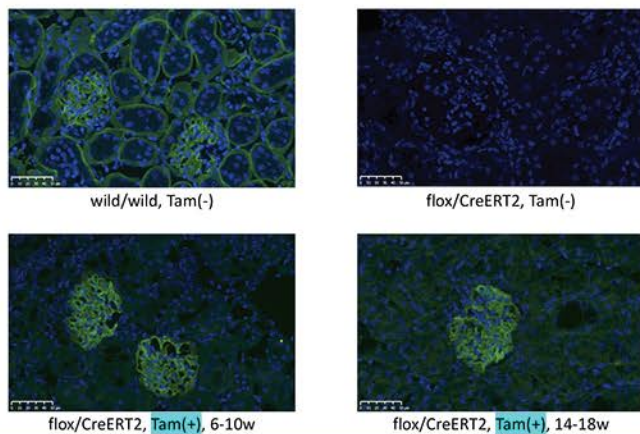


Fig 2: COL4A5 immunostaining at 22 weeks of age (Green: COL4A5, Blue: nuclei). The wild/wild group showed COL4A5 expression in glomerular and tubular basement membrane. In the flox/CreERT2, Tam(-) group, COL4A5 was completely negative. The flox/CreERT2, Tam(+) groups showed glomerular-specific expression of COL4A5. The sections were stained with FITC-conjugated anti-COL4A5 antibody (H53; Shigei Medical Research Institute, Okayama, Japan).

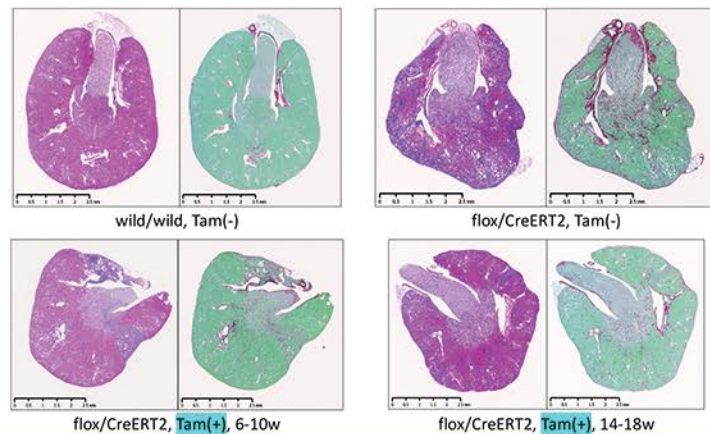


Fig 3: Histopathological changes in kidney(Left: HE, Right: Sirius red). In the flox/CreERT2, Tam(-) group, rough surface, basophilic appearance (HE) and red positive area (Sirius red) indicated regenerative, sclerotic or fibrotic lesions in the glomeruli and tubulointerstitial area. In the Tam(+), 6-10w or 14-18w groups, these lesion area became smaller and showed localized distribution.

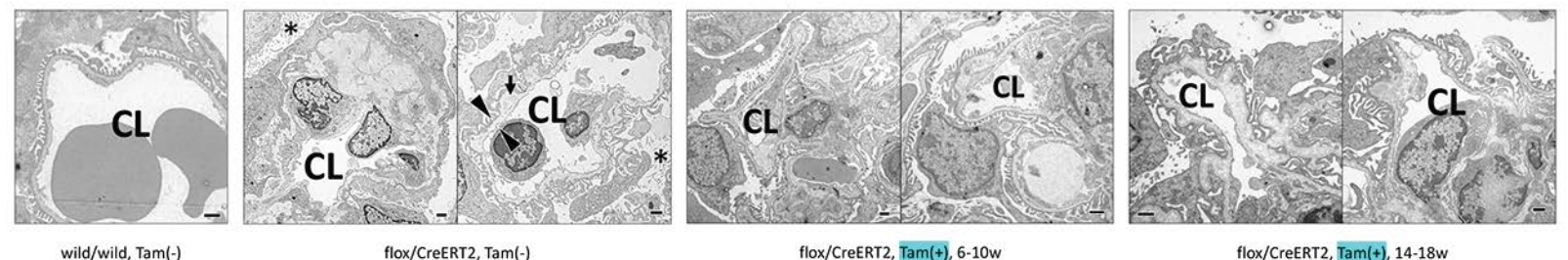


Fig 4: Transmission electron microscopy. Irregular thickening or thinning, splitting (arrowheads), electron dense granules (arrow) or lucent area in the GBM were frequently noted in the Tam(-) group. These lesions accompanied by foot process effacement and increased microvilli (asterisk) of the podocytes. Meanwhile, the lesions is localized and mildly observed in the Tam(+), 6-10w or 14-18w group. Bar = 1μm, CL: glomerular capillary lumen.

Conclusion

病態の進行度の異なるAS患者におけるエクソンスキッピング法の治療効果をマウスにおいて検証するために、2通りのタモキシフェン投与時期での試験を実施した。flox/CreERT2, Tam(+), 14-18wの群において、尿中アルブミンの増加後のタモキシフェン投与であっても、野生型と同程度まで尿中アルブミンを低下させることが確認できた。また、血中BUN、Total cholesterolの改善が認められ、病態が進行した後の治療介入であっても、腎機能回復効果が期待できる結果を得た。これらの結果は、タモキシフェン投与群における、糸球体でのCOL4A5発現回復や、病理組織評価及びTEM結果からも裏付けられた。AXCCマウスでは14w以降に全硬化糸球体数が増加してくることが分かっており、全硬化糸球体割合が一定値以上となる前に、COL4A5発現を回復させることで糸球体硬化及び二次的な尿細管間質病変の進行が抑制され、腎機能改善効果が期待できると考えられた。現在、Alport症候群の治療は、アンジオテンシンII受容体拮抗薬(ARB)などの対症療法となっている。根本的治療のために、核酸医薬品によるエクソンスキッピング法やmRNA補充療法などの開発が進められており、今回の報告は、これらの新規治療法を後押しするものと考えられる。

【参考文献】1. Hashikami K., Asahina M., Nozu K., Iijima K., Nagata M., Takeyama M. Establishment of X-linked Alport syndrome model mice with a Col4a5 R471X mutation. Biochem Biophys Res. 2019;17:81-86. doi: 10.1016/j.bbrep.2018.12.003. 2. Song JY, Saga N, Kawanishi K, Hashikami K, Takeyama M, Nagata M. Bidirectional, non-necrotizing glomerular crescents are the critical pathology in X-linked Alport syndrome mouse model harboring nonsense mutation of human COL4A5. Sci Rep. 2020 Nov 3;10(1):18891. doi: 10.1038/s41598-020-76068-4. PMID: 33144651