

## 高リン食給餌におけるマウスとラットの腎臓病態差についての検討

○関口敬大<sup>1)</sup>、盛喜久江<sup>3)</sup>、後藤実里<sup>2)</sup>、三ツ井彩花<sup>2)</sup>、各務温花<sup>2)</sup>、勝間田真一<sup>3)</sup>、

松崎広志<sup>3)</sup>、煙山紀子<sup>2)</sup>、前川竜也<sup>2)</sup>、太田毅<sup>1)</sup>、美谷島克宏<sup>2)</sup>

(<sup>1</sup>京都大学大学院 農学研究科 応用生物科学専攻 生体機構学分野、

<sup>2</sup>東京農業大学 応用生物科学部 食品安全健康学科、

<sup>3</sup>東京農業大学 応用生物科学部 栄養科学科)

【背景と目的】世界的に慢性腎臓病（以下：CKD）患者の数が急増している。CKD の進展因子の一つとしてリンの過剰摂取が知られており、高リン食負荷時の病態解明は CKD の治療法の開発の上でも重要である。本研究では CKD におけるリン感受性についてラットとマウスの種差に着目して研究を行った。

【方法】実験 1) 4 週齢時に右片腎摘出处置(UNx)を施された SD ラットを 5 週齢時に受領し、5 日間の馴化飼育後、高リン食として 1.5%トリポリリン酸カリウム ( $K_5P_3O_{10}$ ) 含有食を 3 週間与えた (n=6)。対照群は UNx 処置を施した SD ラットに通常食として 0.3% $K_5P_3O_{10}$  含有食を与え同条件で飼育した (n=6)。解剖前に採尿 (24 時間蓄尿) を行い、麻酔下で腹部大動脈より採血後、腎臓を採取した。採取された血液は遠心分離の後、血清を取得し、尿と共に生化学検査を実施した。腎臓については、病理組織学的解析を行った。実験 2) 7 週齢の C57BL/6J マウスに右片腎摘出を施し、1 週間の馴化期間を設けた後、8 週齢時より高リン食を 8 週間給餌した (n=5)。対照群は UNx 処置を施した C57BL/6J マウスに通常食を与え同条件で飼育した (n=5)。ラットと同様の条件で採材を行い、血液・尿生化学検査および病理組織学的解析を行った。

【結果と考察】ラットの試験系において、高リン食給餌群で通常食群よりも、クレアチニン・クリアランス (CCr) および血清中カルシウム濃度が有意に低下した。病理組織学的解析では、高リン食給餌群において、重度の尿細管障害および尿細管間質領域の炎症性細胞浸潤、線維化が観察された。マウスの試験系において、高リン食給餌群で通常食群よりも CCr の上昇傾向および血清中リン濃度の有意な上昇が認められた。病理組織学的解析では、高リン食群の 5 例中 4 例において、軽度～中等度の尿細管管腔の拡張、5 例中 3 例において、極軽度の間質領域の線維化が観察された。以上の結果から、高リン食負荷時の腎障害の程度はマウスでラットと比較して明らかに軽く、リンの過剰摂取による病態進行について強い耐性を持つ可能性が示された。今後、高リン食負荷による動物間の差異について検討することで、CKD の新規治療標的を見出せる可能性が示された。

## カロリー制限および時間制限給餌による ZFDM ラットにおける 2 型糖尿病の予防に関する検討

○森谷 すずか、高木 美智、中田 千陽、横井 伯英  
(京都大学大学院農学研究科・動物遺伝育種学分野)

【背景と目的】近年、カロリー制限食および時間制限食が肥満や糖尿病の予防に有効であることが報告されている。マウスやラットを用いた研究も報告されているが、病態や給餌制限方法の違いにより結果は様々である。Zucker fatty diabetes mellitus (ZFDM) ラットは、レプチン受容体遺伝子 (*Lepr*) のミスセンス変異 (*fatty, fa*) を有する肥満 2 型糖尿病モデルであり、オスの *fa/fa* ホモ型個体は 10 週齢ごろまでに糖尿病を発症するが、メスの *fa/fa* ホモ型個体は肥満を呈するものの糖尿病を発症しない。今回、雌雄の ZFDM ラットを用いてカロリー制限および時間制限給餌による肥満および糖尿病の予防の可能性について検討した。

【方法】実験には、ZFDM ラットが有するリポカリン 2 遺伝子のナンセンス変異を野生型に置換したゲノム編集 ZFDM ラットを用いた。このラットはオリジナルの ZFDM ラットと同様にオスの *fa/fa* ホモ型個体のみが糖尿病を発症する。5 週齢のオスおよびメスの *fa/fa* ホモ型個体を対象として、通常飼料を自由摂食させる自由摂食群 (Ad libitum feeding, AL)、*fa/+*ヘテロ型個体と同量の飼料を与えるカロリー制限給餌群 (Calorie restriction, CR)、および消灯 1 時間後から点灯 1 時間前まで 8 時間 (22 時から翌 6 時) の間のみ自由摂食させる時間制限給餌群 (Time restriction, TR) を設定し、16 週齢まで飼育した。摂餌量と体重は毎日の給餌前に測定し、随時血糖値は毎週 1 回測定した。メスについては、16 週齢時に経口糖負荷試験およびインスリン負荷試験を実施し、それぞれ耐糖能およびインスリン抵抗性を評価した。随時血糖値が 2 週連続で 300 mg/dL 以上となった場合に糖尿病発症と判断した。

【結果と考察】CR 群の体重は、雌雄ともに AL 群と比較して有意に低値であった。一方、TR 群の摂餌量および体重は、雌雄ともに AL 群と同等であった。オス AL 群は 9 週齢までに全例が糖尿病を発症したのに対して、オス CR 群には糖尿病の発症がみられなかった。一方、オス TR 群は全例が糖尿病を発症したが、AL 群と比較して 2~3 週間ほど発症が遅延した。メスはいずれの群にも糖尿病の発症は認められなかったが、CR 群および TR 群は AL 群と比較して随時血糖値が有意に低値であった。経口糖負荷試験およびインスリン負荷試験において、メス CR 群は AL 群と比較して耐糖能およびインスリン抵抗性の改善がみられた。メス TR 群は AL 群と比較して耐糖能の改善は認められたが、インスリン抵抗性の改善には至らなかった。以上の結果から、通常飼料条件下において、カロリー制限給餌は ZFDM ラットの肥満、耐糖能およびインスリン抵抗性を改善し、糖尿病発症を抑制する効果を有すること、時間制限給餌は摂取カロリーや体重減少を伴わずに耐糖能を改善し、糖尿病発症を遅延させる効果を有することが示唆された。

## 四倍体胚補完法により肺欠損モデルマウスの表現型は一部の個体で補完される

○上杉ひかる<sup>1</sup>、村田 大和<sup>1</sup>、由利 俊祐<sup>1,2</sup>、磯谷 綾子<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 奈良先端科学技術大学院大学、<sup>2</sup> 国立長寿医療センター)

【背景と目的】四倍体胚補完法は、2 細胞期胚のそれぞれの割球を融合させることにより作製した 4 倍体胚に ES 細胞を注入し、ES 細胞由来の産仔を得る技術である。一般的に 4 倍体細胞は胎盤等の胚体外組織に分化し、胎仔本体へは寄与しないとされる。このため、当研究室では、肺欠損を呈する *Fgfr2b* ノックアウト (KO) マウス ES 細胞とラット ES 細胞を四倍体胚に注入して異種間キメラ体内でラットに由来する肺形成を試みた。その結果、肺組織は形成されたものの、呼吸機能を持たないという課題が残った。この原因として、本来寄与しないはずの 4 倍体細胞が胎仔組織に混入し、機能不全に関わった可能性が考えられた。実際、四倍体胚補完法により 4 倍体胚由来細胞が胎仔へ寄与する事例がいくつか報告されている。そこで本研究では、GFP 標識した 4 倍体細胞を用いて追跡を行い、*Fgfr2b*-KO および同じく肺欠損の表現型をもつ *Nkx2.1*-KO マウス ES 細胞を用いて四倍体胚補完法における、4 倍体細胞の寄与の実態を解明することを目的とした。

【方法】ES 細胞の樹立：*Fgfr2b* ヘテロ欠損マウスの交配により得た受精卵、および野生型受精卵へのエレクトロポレーションにより *Nkx2.1* のエクソン 2 を欠損させた受精卵から、それぞれの KO ES 細胞を樹立した。四倍体胚補完法：全身で GFP を発現するトランスジーンを持つ雄マウスと野生型の雌マウスを交配させることによって得られた、GFP で標識された 2 細胞期胚を電気融合させて 4 倍体胚を作製し、これに上記 KO ES 細胞を注入して偽妊娠マウスへ移植した。新生仔の解析：胎生 19.5 日目に帝王切開を行い、蘇生処置および生後 4 時間までの観察を行った。GFP 蛍光を指標に 4 倍体胚由来細胞の寄与を確認するとともに、呼吸開始の有無を評価した。組織学的解析：得られた肺組織から凍結切片を作製し、肺胞上皮 I 型細胞 (AT1) マーカーとして *Hopx*、肺胞上皮 II 型細胞 (AT2) マーカーとして *Sftpc* を用いた蛍光免疫組織学的染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察した。

【結果と考察】解析の結果、*Fgfr2b*-KO および *Nkx2.1*-KO ES 細胞を用いたいずれの条件においても、一部の個体で GFP 陽性の 4 倍体胚由来細胞の寄与が認められた。さらに、GFP 陽性細胞を持つ双方の個体の一部で肺が形成されていた。しかし、出生後の蘇生で呼吸を開始したのは、*Fgfr2b*-KO ES 細胞を用いた条件のみであった。この呼吸の有無の違いについては、これまでに報告されている同種間での胚盤胞補完法の結果と同様であった。また、蛍光免疫組織学的染色の結果より、*Nkx2.1*-KO 条件では AT1・AT2 細胞の殆どが GFP 陽性であった一方、*Fgfr2b*-KO ES 細胞を用いた条件では、AT1 細胞のほとんどは GFP 陽性細胞であったが、AT2 細胞の一部に GFP 陰性細胞の寄与が観察された。過去に、4 倍体由来細胞が発生過程で 2 倍体細胞に還元される場合があると報告されている。この知見を踏まえると、今回認められた GFP 陰性 AT2 細胞は、4 倍体由来細胞が 2 倍体化する過程で、GFP トランスジーン挿入アレルを喪失した細胞である可能性が考えられた。このことから、4 倍体胚由来細胞が発生過程で 2 倍体細胞になり、肺胞上皮へ分化していると予想された。本研究により、四倍体胚補完法において 4 倍体由来細胞は胎仔組織へ寄与し、欠損表現型を機能的・構造的に一部補完することが明らかとなった。

## MTMR6 is essential for the maintenance of male fertility

○Tuyen Thi Thanh Nguyen, Kazumasa Takemoto, Keizo Tokuhira  
(Department of Genome Editing, Kansai Medical University)

**【Background and Objective】** The myotubularin family of proteins is prevalent in numerous eukaryotic organisms and is implicated in processes such as endocytosis, cell proliferation, differentiation, autophagy, and motility. Several genes within this family, including *Mtmr2*, *Mtmr5*, and *Mtmr14*, are essential for testicular function. *Mtmr6*, another member of the myotubularin family, has been identified as a specific inhibitor of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel KCa 3.1 in somatic cells. Furthermore, *Mtmr6* has been demonstrated to regulate phagocytosis and phagosome maturation, which are vital for cell survival. In mice, *Mtmr6* is highly expressed in the testis; however, its role in male fertility remains to be elucidated. This study aims to establish and characterize *Mtmr6*-deficient mice to clarify its role in male fertility.

**【Methods】** *Mtmr6*-deficient mice were generated utilizing the CRISPR/Cas9 system. The phenotype of these *Mtmr6*-deficient mice was assessed through both *in vivo* and *in vitro* fertility assays, histological examination of the testes, morphological analysis of spermatozoa, TUNEL assay for apoptosis, and RNA-seq profiling of testicular tissues.

**【Results and Discussion】** *Mtmr6*-deficient males exhibited late-onset infertility beginning after 11 weeks of age, characterized by reduced testicular size, abnormal spermatogenesis, and an increased number of TUNEL-positive cells. Additionally, sperm from *Mtmr6*-deficient mice demonstrated a reduced count, as well as abnormal motility and morphology. RNA-seq analysis of testicular tissues identified a significantly greater number of differentially expressed genes (DEGs) at 14-week compared to 8-week, with numerous reproduction-related genes being downregulated. Notably, *Agpat1*, a gene involved in the glycerophospholipid metabolic pathway essential for membrane biogenesis and reproductive function, was significantly downregulated in the 14-week testes of *Mtmr6*-deficient mice compared to both control and 8-week deficient mice, suggesting that impaired lipid metabolism may contribute to the observed infertility phenotype. These findings underscore the critical role of MTMR6 in maintaining male fertility. The *Mtmr6*-deficient mouse model may provide a valuable experimental platform for investigating the molecular mechanisms underlying late-onset male infertility.