日腎会誌 2007；**49**(8)：992-998.

原　著

蛋白尿による腎1型コラーゲン産生応答を規定するゲノム領域の同定

加藤信孝*,** 岡田浩一　鈴木洋通

Quantitative trait loci analysis for type Ⅰ collagen deposition in the kidney during urinary protein load

Nobutaka KATO*,**, Hirokazu OKADA, and Hiromichi SUZUKI

*Department of Nephrology, **Division of Project Research, Research Center for Genomic Medicine, Saitama Medical University, Saitama, Japan

要　旨

目　的：腎間質線維化はすべての進行性糸球体疾患において，腎不全に至る過程で派生してくる病変であるが，その進行リスクとして家族歴があげられており，遺伝的要因の関与が示唆される。そこで，蛋白負荷蛋白尿モデルマウスを作製して，腎における1型コラーゲン沈着量が最大および最小となる純系マウス系統を用いて，その反応性を規定するゲノム領域を連鎖解析により同定する。

方　法：9種類の純系マウスを6週齢で片腎摘出し，7週齢目より6週間ウシアルブミンを投与した蛋白尿モデルを作製し，その残腎を用いて直接ELISA法で1型コラーゲン沈着量を測定し(phenotype)，その結果より高反応性と低反応性マウスを決定した。両者間で交配させたF1マウスを高反応性マウスと戻し交配(F1 backcross (F1BC))して，得られた120匹のF1BCマウスを対象としてphenotypeを決定し，また，80個のマイクロサテライトマーカーを用いてPCR genotypingを行い，quantitative trait loci(QTL)解析を行った。

結　果：沈着量が最も高値であったマウス，最も低値であったマウスはそれぞれ，129S1/svImJとC57BL/6Jであった。F1BCのQTL解析により，染色体2番上の*D2Mit224*の近傍(81.7cM)にLODスコアのピーク(2.84)を認め，phenotypeへの影響度は10.2％で，95％ confidence intervalである75.7-97.7cMにQTL(候補遺伝子)の存在が示唆された。

結　論：蛋白尿負荷による1型コラーゲン産生応答を規定するゲノム領域をQTL解析によって検討し，染色体2番上の*D2Mit224*近傍に存在することが示唆された。今後，この領域に局在する候補遺伝子の同定を試みる。

Although proteinuria is a predictor of renal outcome, it is also an accelerator of disease progression through renal parenchymal damage such as interstitial fibrosis. Therefore, to elucidate the genetic components contributing to collagen deposition by proteinuria, we employed a strategy to map genetic loci that influence the phenotype in mice that present high or low type Ⅰ collagen(COLI)deposition in the kidney during proteinuria. Such COLI deposition in 129S1/svImJ and C57BL/6J inbred mouse strains differs most significantly among 9 tested inbred strains. We conducted a quantitative trait loci(QTL) analysis of 120(129S1/svImJ×C57BL/6J)F1×129S1/svImJ backcross mice loaded with bovine serum albumin for 6 weeks to yield proteinuria and cause renal parenchymal damage. COLI deposition in the kidney during proteinuria was influenced by one suggestive QTL(logarithm of odds 2.84)that accounted for 10.2％ of the total variance, and its peak position was located at 81.7 cM near *D2Mit224* on Chr 2. Progenies with a homologous 129S1/svImJ allele showed more COLI deposition in the kidney than those

* 埼玉医科大学腎臓内科　** 同 ゲノム医学研究センタープロジェクト研究部門

(平成19年6月28日受理)

with heterozygous alleles, suggesting that the 129S1/svImJ allele is recessive. Although further studies elucidating candidate genes underlying this region are necessary, such information will provide a chance to unravel the genetics of renal fibrogenesis.

Jpn J Nephrol 2007；49：992-998.

Key words：quantitative trait loci, proteinuria, type Ⅰ collagen, inbred mouse strain

緒　言

腎間質病変，特に線維化はすべての進行性糸球体疾患（慢性糸球体疾患，糖尿病性腎症）において，腎不全に至る過程で二次的に派生してくる病変であり[1]，間質病変は腎機能予後に糸球体病変そのものより強く相関する事実が確認されている[2,3]。糸球体に限局する病変が腎間質の線維化に進展する機序としては，糸球体病変の結果生じる慢性持続性蛋白尿による尿細管上皮細胞の活性化，尿細管周囲間質への炎症細胞浸潤，浸潤細胞および既存の腎細胞間の相互作用による profibric factor（transforming growth factor, connective tissue growth factor など）産生を介した線維芽細胞活性化により，線維化病巣が形成されると推定されている[4]。しかしその一方で，慢性腎疾患の腎不全への進行リスクの一つとして家族歴があげられており，遺伝要因と環境要因の相互作用により腎不全への進行，つまり間質線維化が規定されている可能性も示唆される[5]。

近年，多因子疾患における疾患感受性遺伝子を遺伝学的手法を用いて特定する試みが注目されている。しかし，ヒトを用いた原因遺伝子の究明は遺伝因子および環境因子のコントロールが困難であるなどの理由から，特殊な集団内や同一家系内で認められるいくつかの疾患について検討されているにすぎない[6~8]。モデル動物は遺伝因子および環境因子のコントロールが比較的容易なこと，同定された責任遺伝子について遺伝子改変動物作製などの手法により，機能的な側面からも確認が容易であるなどの理由により，複雑なヒト疾患の原因遺伝子を解明し，病態成立の分子機構を明らかにするうえで非常に有用であると考えられる。腎臓領域では，モデル動物を用いた高血圧や2型糖尿病，特定の腎疾患に関連した感受性遺伝子探究はすでにいくつか報告されているが[9]，すべての進行性腎疾患に普遍的に関与すると考えられる蛋白尿による腎間質線維化に対する感受性遺伝子を十分に検討した報告はない。

腎線維化の特徴の一つとして間質への1型コラーゲン沈着があげられる[10]。われわれは，腎線維化に対するこのような遺伝的感受性の違いをより詳細に検討するため，蛋白尿による1型コラーゲン沈着を呈するマウス疾患モデルを，複数の純系マウスを用いて検討した。そして，最大および最小の反応性を示した系統を用いて quantitative trait loci（QTL）mapping を試み，蛋白尿による腎1型コラーゲン産生応答を規定するゲノム領域の同定を試みた。

対象と方法

1．Protein over-load モデルの作製[11]

国内で入手可能な純系マウス9種（129S1/svImJ，A/J，BALB/cByJ，C3H/HeJ，C57BL/6J，CBA/J，DBA/2J，FVB/N，SJL）（個体数 n＝8～10匹）を用いた。それぞれのマウスを，6週齢で片腎を摘出してコントロール検体とし，1週間後の7週齢目よりウシアルブミン（Bovine serum albumin（BSA），SIGMA，catalog number A9430）を 10 mg/g body weight/day で6週間，連日腹腔内投与した後，残存腎を採取した。予備実験の結果より，BSA の投与期間は抗 BSA 抗体が出現しないように6週間とした。実験期間中は通常のマウス用飼料を投与し，また自由飲水とした。すべての動物実験は埼玉医科大学動物実験指針に準拠して行われた。

2．直接 enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）法による表現型の評価（phenotyping）[12]

摘出腎を組織重量約50 mg に細切し，直ちに2 mL 0.5 M 酢酸溶液に入れ homogenizer（POLYTRON PT 2100），超音波破砕装置（Powersonic MODEL 50）で破砕後，遠心分離（4,000 rpm，4°C，10分）し，その上清を回収した。検量線用標準液およびサンプルを ELISA 用96穴プレート（Nunc-Immuno Plates，catalog number 442404）にそれぞれ 200 μL 滴下し，37°C 1時間で吸着させた。0.15 M NaC1，0.05％ Tween 20 を含む蒸留水で洗浄後，ブロッキングバッファー（10％スキムミルク，0.1％ Tween 20，0.05％ NaH3 を含むリン酸緩衝液（PBS））で室温1時間処理し，ウサギ抗-ラット1型コラーゲン抗体（1：3,000）（Chemicon，catalog number AB755）と室温30分間反応させた。洗浄後，ALP 結合ヤギ抗ウサギ IgG 抗体（Bio-Rad，catalog number 170-6518）と室温30分反応させた。Disodium p-nitrophenyl phosphate（Sigma-Al-

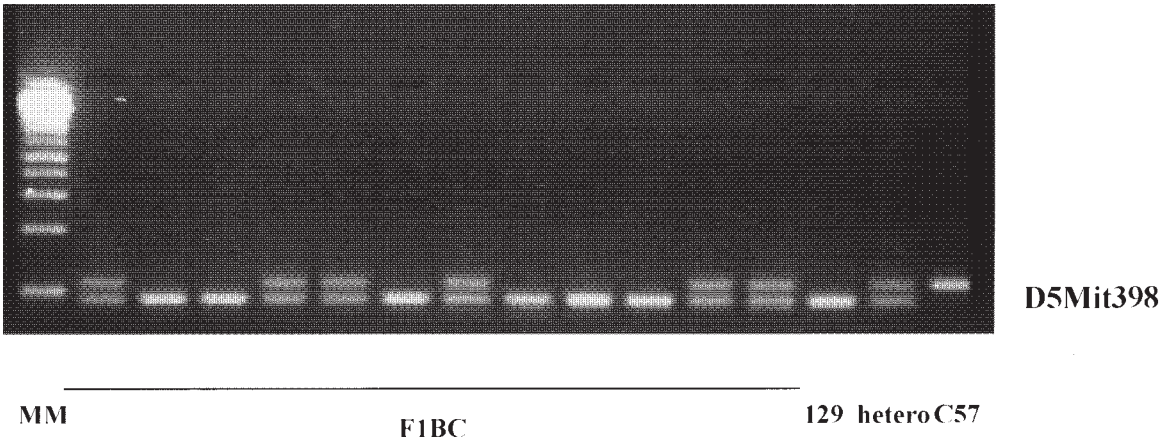

Fig. 1. PCR-based genotyping of *D5Mit398* of the F1 backcross progenies
A PCR product of a single band indicates a homozygous 129S1/svImJ allele, and another of dual bands indicates heterozygous 129S1/svImJ and C57BL/6J alleles.

drich, catalog number N-2770)を用いた発色を，ELISA plate reader にて計測した。検量線の直線性を確認できた計測時にのみ，phenotype の計算に用いた。同一個体において，BSA 負荷前後の 1 型コラーゲン量(ng/mg 腎重量)の差をコラーゲン沈着量として算出し，phenotype とした。

3．免疫蛍光抗体法

6 週齢で摘出した片腎と 6 週間連日 BSA を投与した後の残腎を，Tissue-Tek O. C. T. compound(Sakura Finetechnical Co., Ltd., Tokyo, Japan)に凍結包埋し，Cryostat で 4 μm 厚の切片を作製した。1 次抗体としてウサギ抗 1 型コラーゲン抗体を用い，室温 1 時間反応させた。PBS で洗浄後，2 次抗体として FITC 結合ヤギ抗ウサギ IgG 抗体(American Qualex, CA, USA)を用いて反応させ，蛍光顕微鏡下で観察した。

4．QTL 解析に用いるマウスの決定と FIBC の必要数の検討

1 型コラーゲン沈着量の差が最大および最小となった系統をそれぞれ高反応性および低反応性マウスとした。高反応性および低反応性マウスを交配させた F1 と高反応性および低反応性マウスの 3 群(n＝20，各群)で phenotype を再度評価した。Darvasi の報告[13]より，QTL 解析には F1 を高反応性マウスに戻し交配した(F1 backcross(F1BC))120 匹の F1BC マウスに蛋白尿負荷モデルを作製して検討した。

5．マイクロサテライトマーカーを用いた遺伝子型(genotyping)の決定

129S1/svImJ と C57BL/6J で多型を有する Mit マイクロサテライトマーカーを 20cM 間隔で 80 個選択した。(マイクロサテライトマーカーの情報は，Whitehead Institute/MIT Center for Genetic Research website(http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/mouse/index # genetic)を参照)F1BC の尾サンプルよりゲノム DNA を抽出し，各 Mit マーカーに特異的なプライマー(MapPairs Mouse Marker, Unlabeled, Invitrogen, catalog number 20500RG)を用いて，polymerase chain reaction(PCR)法で増幅し遺伝子型を決定した(genotyping)。使用した条件は，熱変性 95°C 1 分，アニーリング 57°C 1 分，伸長 72°C 1 分のサイクルを 35 回にて PCR 反応を行い，PCR 産物を 4 %アガロースゲル(Nusieve GTG agarose, CAMBREX, catalog number AG5817)にて電気泳動し，エチジウムブロマイドで染色した後，トランスイルミネーターでバンドを確認した。検出されたバンドは，その F1BC マウスが 129S1/svImJ 型のホモマウス(lane 3, 4, 7, 9, 10, 11)か，ヘテロマウス(lane 2, 5, 6, 8, 12, 13)かのどちらかを示す(Fig. 1)。

6．QTL 解析

F1BC の phenotype と genotype の linkage map の作製には，MAPMAKER/Exp 3.0 と MAPMAKER/QTL 3.0b (http://www.broad.mit.edu/tools/software.html)を用いた[14]。LOD スコアの有意検定は，Lander と Kruglyak らによるガイドラインに従い，LOD スコアが 3.3 以上を significant linkage，また 1.9 以上を suggestive linkage[15]とした。

7．統計処理

本文中で用いた値は平均値±標準偏差で表した。各群の

Table　Urinary protein load to inbred mouse strain

	Strain	No.	Increases in Type I collagen deposition (ng/mg kidney wt)
1	129S1/svImJ	9	0.987±0.358
2	CBA/J	10	0.821±0.331
3	SLJ	8	0.695±0.299
4	DBA/2J	8	0.622±0.273
5	A/J	9	0.431±0.188
6	C3H/HeJ	10	0.397±0.154
7	BALB/cByJ	9	0.325±0.108
8	FVB/N	9	0.161±0.061
9	C57BL/6J	8	0.087±0.029

Values are means±SD.

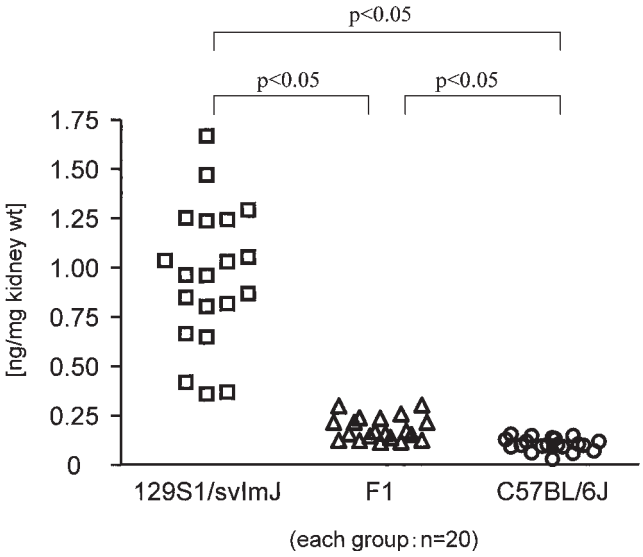

Fig. 2.　Increases in COLI deposition in the kidney among (129S1/svImJ×C57BL/6J) F1 offsprings and parental strains during proteinuria

The increase in COLI deposition was repeatedly highest in 129S1/svImJ mice (0.944±0.394 ng/mg) and lowest in C57BL/6J mice (0.099±0.032 ng/mg). (129S1/svImJ×C57BL/6J) F1 offsprings showed a phenotype midway between these parental strains (0.187±0.061 ng/mg). Values are means±SD.

検定には analysis of variance (ANOVA) を用い，危険率5％未満を統計学的に有意とみなした。統計計算には Prism (GraphPad Software Inc, USA) と StatView (SAS Institute, USA) を使用した。

結　果

1．純系マウス系統間における蛋白尿による腎1型コラーゲン産生応答の差異

9系統の純系マウスの1型コラーゲン沈着量を定量した結果 (Table)，そのなかで沈着量が最大の系統は 129S1/svImJ で 0.987±0.358 (ng/mg 腎重量) であり，最小の系統は C57BL/6J で 0.087±0.029 (ng/mg 腎重量) であった。また，これら2種の純系マウスを交配した F1 マウスの沈着量は 0.187±0.061 (ng/mg 腎重量) であり，親系統の間に位置した (Fig. 2, 3)。F1BC マウス (n＝120) の1型コラーゲン沈着量の分布は，129S1/svImJ と C57BL/6J に二分されず多様な値に分散し (Fig. 4)，多遺伝子の関与が示唆された。

2．QTL 解析

F1BC マウスにおいて，LOD スコアのピーク (2.84) は染色体2番上の 81.7cM に位置し，*D2Mit224* (56.8cM) の近傍であった (Fig. 5)。この suggestive QTL は phenotype

a | b | c

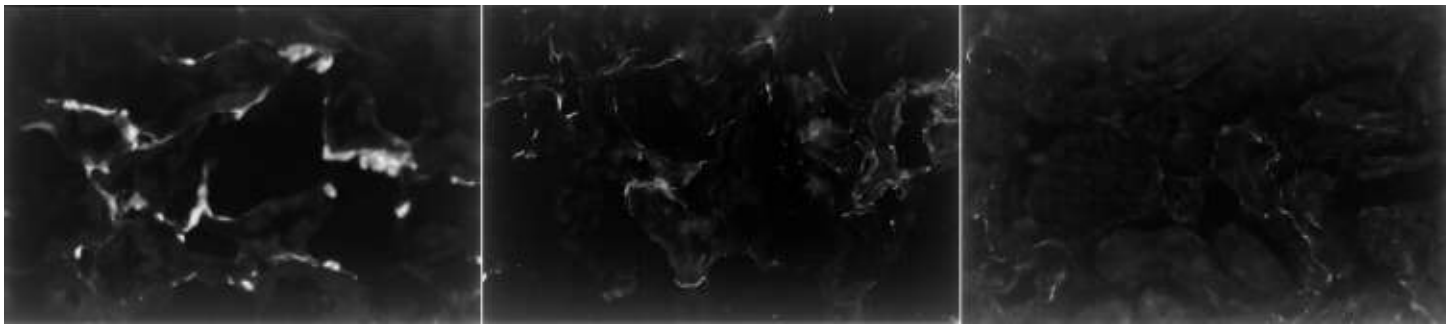

Fig. 3.　Immunofluorescence of COLI in the kidney

a：129S1/svImJ mice after 6 weeks of BSA injection. Significant COLI deposition was observed in the kidney of BSA-injected 129S1/svImJ mice.

b：C57BL/6J mice after BSA injection. COLI deposition was hardly seen in the kidney of C57BL/6J mice even after BSA injection.

c：Control 129S1/svImJ mice. (FITC, ×200)

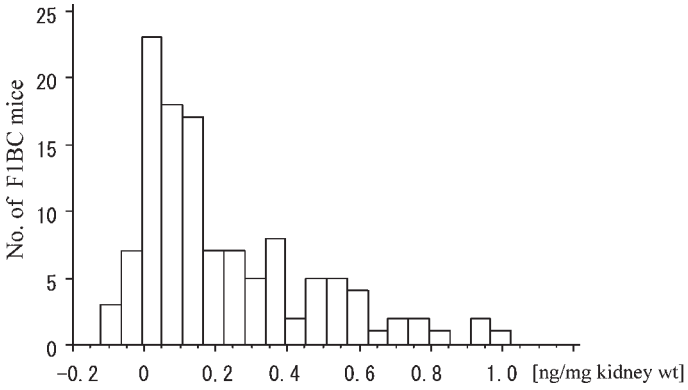

Fig. 4. Frequency distribution of increases in COLI deposition in the kidney in 120 F1 backcross progenies
One hundred and twenty backcross progenies showed various degrees of COLI deposition in their kidneys, and did not segregate into the 129S1/svImJ and C57BL/6J types, suggesting that this phenotype was influenced by multiple genetic loci.

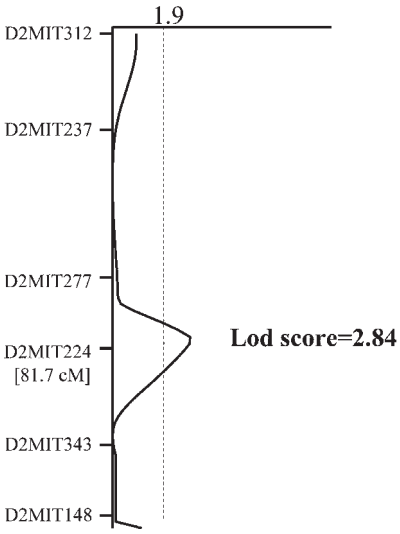

Fig. 5. QTL mapping in 120 F1 backcross progenies on Chr 2
The peak LOD score reached 2.84 at 55.4 cM near *D2Mit224*. The vertical line indicates the threshold for a possible linkage of the LOD score(1.9).

の 10.2 %を規定しており，95 % confidence interval の 75.7–97.7cM の領域にその存在が示唆された。129S1/svImJ 型の *D2Mit224* ホモマウスでは，ヘテロマウスに比較して 1 型コラーゲン沈着量が有意に多く(0.308±0.266 vs. 0.125 ±0.182，$p<0.05$)(Fig. 6)，Fig. 2 の結果と併せ，その遺伝的影響は recessive と推定される。その他の染色体には有意な LOD スコアのピークは存在しなかったため，染色体 2 番上の *D2Mit224* の近傍に，蛋白尿による腎 1 型コラーゲン産生応答を規定する QTL が存在することが推定された。

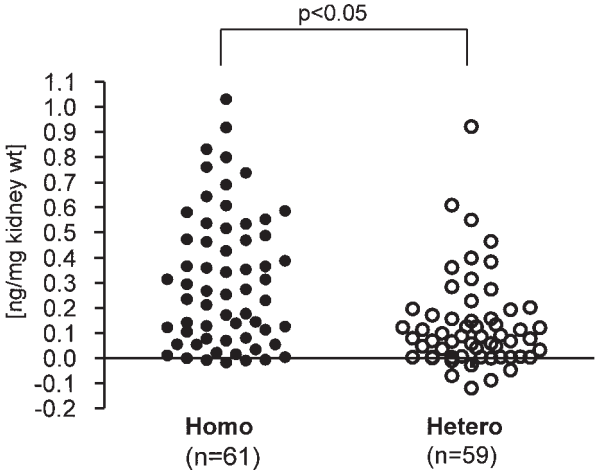

Fig. 6. Effects of *D2Mit224* allele on COLI deposition in the kidney during proteinuria
The increases in COLI deposition were higher in the 129S1/svImJ allele homozygotes(0.308±0.266ng/mg) than the 129S1/svImJ/C57BL/6J allele heterozygotes (0.125±0.182 ng/mg). Values are mean±SD.

考　察

アルブミンは尿中蛋白の主要成分としてだけではなく，腎疾患，特に糸球体疾患の重要なマーカーとして認識されている[16]。近年はさらに腎実質病変(間質線維化)の進展機序に関連した分子としての検討が進められている。近位尿細管上皮細胞において，アルブミン吸収の過程で活性酸素を介して MAP kinase，PI3 kinase，Stat，NF-κB などの情報伝達系分子が活性化され，腎線維化関連遺伝子発現が誘導されることが明らかとされている[17]。この作用はアルブミン分子のみではなく，蛋白尿中に含まれるイムノグロブリン，補体，トランスフェリン，さまざまなサイトカインやアルブミンに結合した脂肪酸によって惹起されると推定されている[18]。マイクロアレイを用いた網羅的解析により，蛋白尿を呈するマウスの腎組織における多彩な遺伝子発現が確認されているが[19]，蛋白尿による腎実質病変進行を介した腎不全進展機序に関しての主要経路は不明と言わざるを得ず，forward genetic アプローチによる腎線維化メカニズムの解明には限界がある。一方，緒言でも触れたように，腎不全の進展リスクには家族歴があり，腎不全の組織学的所見である腎線維化のメカニズムにも遺伝的要因の関与が示唆される。そこでわれわれは，蛋白尿による腎 1 型コラーゲン産生応答に系統間で有意差を示す純系マウス

2系統を用いたQTL解析により，reverse geneticアプローチを試みた。その結果，染色体2番の*D2Mit224*近傍の81.7cMの位置にLODスコア2.84のピークを検出し，suggestive linkageを示すQTLが95％の確立でこの領域(75.7-97.7cM)に存在する可能性が示唆された。129S1/svImJとC57BL/6JのF1のphenotypeはC57BL/6J寄りの低応答性であり，F1BCマウスでは129S1/svImJ型の*D2Mit224*ホモマウスがヘテロマウスに比べて優位に高応答性であったことから，このQTLの遺伝的影響はrecessiveと考えられ，129S1/svImJマウスの有する高応答性の10.2％を説明し得るという結果であった。ここで10.2％とは，F1BCマウスにおいてさまざまな要因によって制御される分散を分母とし，*D2Mit224*が129S1/svImJ型のホモマウスであるときに減少する分散の割合を意味する。すなわち，*D2Mit224*が寄与する程度は全分散の中の10.2％ということになる。

多発性嚢胞腎や家族性ネフローゼ症候群などの単一遺伝子疾患を除くと，ヒト腎疾患関連遺伝子の同定は容易ではない。それは多遺伝子が関連するうえに環境因子の影響を強く受けるためと考えられ，現状ではcase-control研究や連鎖解析～連鎖不均衡mappingなどの方法が用いられていくつかの関連遺伝子が報告されているにすぎない[20]。一方，緒言で述べたような遺伝研究における優位性を有するマウス，ラットの疾患モデルを用いた腎疾患関連遺伝子の同定は，多数の報告が認められる。代表的な例をあげると，Choらは先天性ネフローゼ症候群を呈するICGNマウスと健常マウスのF1BCマウスを用いたQTL解析の結果，染色体15番のテロメリック領域にLODスコアのピークを見出し，一挙に*tensin2*遺伝子の欠失変異がICGNマウスのネフローゼ症候群の責任遺伝子であることまでを突き止めた[21]。またJacobらは，Fawn-Hooded高血圧ラットを用いて，その蛋白尿と糸球体硬化を規定する5つのQTL(*Rf-1*～*Rf-5*)を報告している[22,23]。その内，*Rf-1*のヒトにおけるホモロジー領域がアフリカ系アメリカ人および米国ユタ州の腎不全好発家系の末期腎不全進展における遺伝的要因部位と一致していることが明らかとなった[24]。また*Rf-2*のヒトホモロジー領域(19q13)には巣状糸球体硬化症責任遺伝子が含まれており[25]，マウスホモロジー領域にはループス腎炎マウスの腎炎関連QTLが含まれていることも明らかとなった[26]。ラットにおける腎疾患関連QTLとマウスおよびヒトのそれが共通する事実から，比較ゲノミクスによる動物種を超えた疾患関連遺伝子同定の可能性が示唆される。

Ensembl Genome Browser(http://www.ensembl.org)を用いたマウスゲノムデータベース解析により，われわれが明らかとしたゲノム領域に含まれる全遺伝子が参照でき，その内でも腎線維化に関連し得る興味深い遺伝子としては，fibrillin 1，COP homolog subunit 2，adrenergic receptor alpha 2b，prominin 2，c-mer proto-oncogene tyrosine kinase，isocitrate dehydrogenase 3 beta，protein tyrosine phosphatase receptor type Aなどがあげられる。QTLおよびその候補遺伝子の同定には，近年より厳しい基準が推奨されている[27]。すなわち，1）コード領域もしくは調節領域における多型の存在，2）形質に関与しうる遺伝子機能，3）*in vitro*における発現分子の機能，4）トランスジェニックの形質変化，5）ノックインの形質変化，6）ノックアウトの形質変化，7）変異導入体の形質変化，8）異なる動物種におけるホモロジーの存在，が基準とされており，これらの基準のすべてもしくはいくつかが対象となっているQTLの妥当性を強く示唆することが必要とされている。責任遺伝子が同定された場合，その情報はマウスのみならずヒトにおける腎線維化の分子メカニズムや腎不全進行に関する遺伝的要因の解明に重要なものと期待される。われわれは現在，これらの基準を満たす候補遺伝子同定を目指し，頭記の遺伝子を中心に他のデータベース検索と*in vitro*の検討により候補遺伝子の絞り込みを行っている。

結　論

腎不全の進行リスクには家族歴があげられることから，腎不全の組織学的所見である腎線維化にも遺伝的要因の存在が推定される。そこで，protein over-loadモデルを作製し，複数の純系マウス系統を用いて蛋白尿による腎1型コラーゲン産生応答を検討した。そして最大および最小の応答を示した2系統の純系マウス(129S1/svImJ，C57BL/6J)を用いたQTL解析を行った結果，その応答を規定するQTLが，染色体2番上の*D2Mit224*近傍に存在する可能性が示唆された。

謝　辞

本研究にあたり，ご指導，ご協力をいただきました慶應大学医学部内科学非常勤講師(現 埼玉医科大学腎臓内科講師)の大野洋一先生に深く感謝致します。

文 献

1. Okada H, Strutz F, Danoff TM, Neilson EG. Possible pathogenesis of renal fibrosis. Kidney Int (Suppl) 1996；54：S37-38.
2. Risdon RA, Sloper JC, De Wardener HE. Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis. Lancet 1968；2：363-366.
3. Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. N Engl J Med 1998；339：1448-1456.
4. Hirschberg R, Wang S. Proteinuria and growth factors in the development of tubulointerstitial injury and scarring in the kidney. Curr Opin Nephrol Hypertens 2005；14(1)：43-52.
5. Scott GS, Barry IF, Shahiriar M. Genetic factors in end-stage renal disease. Kidney Int 2005；67：S46-S49.
6. Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Howell DN, Slotterbeck BD, Smith AH, Graham FL, Bembe K, Quarles LD, Pericak-Vance MA, Vance JM. Linkage of a gene causing familial focal segmental glomerulosclerosis to chromosome 11 and further evidence of genetic heterogeneity. Genomics 1999；58：113-120.
7. Imperatore G, Hanson RL, Pettitt DJ, Kobes S, Bennett PH, Knowler WC. Sib-pair linkage analysis for susceptibility genes for microvascular complications among Pima Indians with type 2 diabetes. Pima Diabetes Genes Group. Diabetes 1998；47：821-830.
8. Gharavi AG, Yan Y, Scolari F, Schena FP, Frasca GM, Ghiggeri GM, Cooper K, Amoroso A, Viola BF, Battini G, Caridi G, Canova C, Farhi A, Subramanian V, Nelson-Williams C, Woodford S, Julian BA, Wyatt RJ, Lifton RP. IgA nephropathy, the most common cause of glomerulonephritis, is linked to 6q22-23. Nat Genet 2000；26：354-357.
9. Ohno Y, Tanase H, Nabika T, Otsuka K, Sasaki T, Suzawa T, Morii T, Yamori Y, Saruta T. Selective genotyping with epistasis can be utilized for a major quantitative trait locus mapping in hypertension. Genetics 2000；155：785-792.
10. Iwano M, Neilsen EG. Mechanism of tubulointerstitial fibrosis. Curr Opin Nephrol Hypertens 2004；13：279-284.
11. Eddy AA. Proteinuria and interstitial injury. Nephrol Dial Transplant 2004；19：277-281.
12. Okada H, Watanabe Y, Inoue T, Kobayashi T, Kanno Y, Shiota G, Nakamura T, Sugaya A, Suzuki H. Transgene-derived hepatocyte growth factor attenuates reactive renal fibrosis in aristolochic acid nephrotoxicity. Nephrol Dial Transplant 2003；18：2515-2523.
13. Darvasi A. Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. Nat Genet 1998；18：19-24.
14. Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L. MAPMAKER：an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1987；1：174-181.
15. Lander ES, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits：guidelines for interpreting and reporting linkage results. Nat Genet 1995；11：241-247.
16. Abbate M, Zoja C, Remuzzi G. How does proteinuria cause progressive renal damage？ J Am Soc Nephrol 2006；17：2974-2984.
17. Imai E, Nakajima H, Kaimori JY. Albumin turns on a vicious spiral of oxidative stress in renal proximal tubules. Kidney Int 2004；66：2085-2087.
18. Nakajima H, Takenaka M, Kaimori J, Nagasawa Y, Kosugi A, Kawamoto S, Imai E, Hori M, Okubo K. Gene expression profile of renal proximal tubules regulated by proteinuria. Kidney Int 2002；61：1577-1587.
19. Nagasawa Y, Takenaka M, Kaimori J, Matsuoka Y, Akagi Y, Tsujie M, Imai E, Hori M. Rapid and diverse change of gene expression in the kidneys of protein-overload proteinuria mice detected by microarray analysis. Nephrol Dial Transplant 2001；16：923-931.
20. Korstanje R, DiPetrillo K. Unraveling the genetics of chronic kidney disease using animal models. Am J Physiol Renal Physiol 2004；287：F347-F352.
21. Cho AR, Uchio-Yamada K, Torigai T, Miyamoto T, Miyoshi I, Matsuda J, Kurosawa T, Kon Y, Sasaki N, Agui T. Deficiency of the tensin 2 gene in the ICGN mouse：an animal model for congenital nephrotic syndrome. Mamm Genome 2006；17：407-416.
22. Brown DM, Provoost AP, Daly MJ, Lander ES, Jacob HJ. Renal disease susceptibility and hypertension are under independent genetic control in the fawnhooded rat. Nat Genet 1996：12：44-51.
23. Shiozawa M, Provoost AP, van Dokkum RPE, Majewski RR, Jacob HJ. Evidence of gene-gene interactions in the genetic susceptibility to renal impairment after unilateral nephrectomy. J Am Soc Neprol 2000；11：2068-2078.
24. Hunt SC, Hasstedt SJ, Coon H, Camp NJ, Cawthon RM, Wu LL, Hopkins PN. Linkage of creatinine clearance to chromosome 10 in Utah pedigrees replicates a locus for end-stage renal disease in human and renal failure in the fawn-hooded rat. Kidney Int 2002；62：1143-1148.
25. Mathis BJ, Kim SH, Calabrese K, Haas M, Seidman JG, Seidman CE, Pollak MR. A locus for inherited focal segmental glomerulosclerosis maps to chromosome 19q13. Kidney Int 1998；53：282-286.
26. Morel L, Mohan C, Yu Y, Schiffenbauer J, Rudofsky UH, Tian N, Longmate JA, Wakeland EK. Multiplex inheritance of component phenotypes in a murine model of lupus. Mamm Genome 1999；10：176-181.
27. Members of the complex trait consortium. The nature and identification of quantitative trait loci：a community's view. Nat Rev Genet 2003；4：911-916.