

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17696

研究課題名(和文) TGF- $\beta$  による糸球体上皮細胞障害とWT1の発現低下機序について

研究課題名(英文) Mechanism of TGF-beta-induced podocyte injury and decreased expression of WT1

研究代表者

浜谷 博子 (Hamatani, Hiroko)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40760658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：WT1遺伝子は糸球体上皮細胞の機能維持に重要な転写因子である。糸球体上皮細胞障害に関するTGF- $\beta$  がWT1+KTS/-KTSのアイソフォームの比率を変化させるかリアルタイムPCR、NGSによるRNA-Seq、DNAシーケンサーによるフラグメント解析により検討したが有意な変化を認めなかった。なお、TGF- $\beta$  を5日間投与後に2日間TGF- $\beta$  なしで培養すると細胞形態は回復するが、その際に+KTSを含むアイソフォームが重要な可能性がRNA-Seqの結果から示唆された。また、WT1の発現を制御する遺伝子のTGF- $\beta$  による発現変化や、WT1の発現を変化させうる因子を探索した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は糖尿病性腎症やFSGSに関するTGF- $\beta$  により糸球体上皮細胞のWT1の発現が低下することを報告したがその機序は明らかではない。TGF- $\beta$  による糸球体上皮細胞障害の機序にWT1+KTS、WT1-KTSのアイソフォームの比率が関与しているか検討したが有意な変化を認めなかった。なお、TGF- $\beta$  投与後の細胞形態の回復に+KTSアイソフォームが重要な可能性がRNA-Seqの結果から示唆された。また、WT1の発現を制御する遺伝子のTGF- $\beta$  による発現変化や、WT1の発現を変化させうる因子の探索をすすめた。今後これらの発現を制御することによりWT1の発現を維持させ治療につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Wilms' tumour 1 (WT1) gene is essential for normal podocyte function. We examined whether TGF- $\beta$ , which is involved in podocyte damage, alters the ratio of WT1+KTS/-KTS isoforms by (1) real-time PCR, (2) RNA-Seq, and (3) fragment analysis using DNA sequencers, but no significant changes were observed. The RNA-Seq results suggested that isoforms including +KTS could be important in the recovery of cell morphology after 5 days of TGF- $\beta$  administration followed by 2 days of incubation without TGF- $\beta$ . We also searched for the expression of genes that regulate WT1 expression by administration of TGF- $\beta$ , and the factors that could alter the expression of WT1.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：WT1 アイソフォーム +KTS/-KTS 糸球体上皮細胞 ポドサイト

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Wilms' tumor 1 (WT1) 遺伝子は腎臓の発生においては後腎間葉細胞に発現し、糸球体上皮細胞への分化に重要な転写因子であり、成熟腎では糸球体上皮細胞(ポドサイト)に限局して発現する。糸球体上皮細胞は糸球体濾過障壁を形成し、血漿蛋白の尿中への漏出を防ぐバリア機能の保持に重要であり、その障害により蛋白尿が出現し高度障害ではネフローゼ症候群に至る。巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)や糖尿病性腎臓病においては TGF- $\beta$  による糸球体上皮細胞障害が報告されており(Kidney Int 2003;64(5):1715-21)、この機序を解明することにより治療法の確立が望まれる。

我々は糸球体上皮細胞において TGF- $\beta$  により WT1 の発現が低下すること、その機序として Smad シグナリングを介していることを報告した(Nephrol Dial Transplant. 2011;26(9):2746-52)。TGF- $\beta$  による遺伝子発現の制御にはシグナリングを介した早期の反応に加えてエピジェネティクスが関与している報告もあるため(Nat Med. 2010;16(5):544-50)、TGF- $\beta$  による WT1 の発現低下にエピジェネティクスが関与しているか検討した(Nephrology. 2019;24(5):575-84)。

WT1 遺伝子は 36 種類以上のアイソフォームがあるが、exon9 の 3 つのアミノ酸(KTS)の有無により機能が異なり、+KTS アイソフォームはスプライシングに関与し、-KTS アイソフォームは転写因子として働くことが報告されている(Kidney Int. 2015;88(4):684-90)。Frasier 症候群は WT1 遺伝子のイントロン 9 の変異により+KTS アイソフォームの比率が低下し、FSGS が生じることから、+KTS/-KTS アイソフォームの比率を適切に保つことが糸球体上皮細胞の機能維持に重要であると示唆される。また、exon5 の有無(+Ex5/-Ex5)についても白血病の領域で研究が進んでいる。腎疾患においては Frasier 症候群以外ではアイソフォームの比率を調べた報告はないため、TGF- $\beta$  により WT1 が低下し、糸球体上皮細胞障害が生じた際に WT1 の+KTS/-KTS アイソフォームの比率が変化しているか調べることにより、疾患活動性の指標になりえるか検討した。

WT1 遺伝子は転写因子として糸球体上皮細胞のさまざまな遺伝子発現を制御しているが、WT1 の発現を制御する因子についての報告は限られている。WT1-interacting protein (WTIP)、WT1 のアンチセンス transcripts(non-coding RNA)の WT1-AS は WT1 の転写を抑制することが報告されている(J Biol Chem. 2004;279(14):14398-408) (J Exp Clin Cancer Res. 2015;34(1):119)。WT1 の発現を抑制することが報告されている遺伝子が TGF- $\beta$  投与の際に変化するか調べることにより、これらの発現を制御することが治療の標的となりえるか検討した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は TGF- $\beta$  による WT1 遺伝子の発現低下のメカニズム、糸球体上皮細胞障害の機序を解明することである。WT1 の発現を維持することにより糸球体障害を抑制し治療につながる可能性が期待される。

本研究は培養糸球体上皮細胞に TGF- $\beta$  の投与を行うことにより、WT1 の機能や細胞形態を変化させることが知られている WT1+KTS/-KTS のアイソフォームの比率が変化するか、糸球体上皮細胞障害に関与するのか検討する。

また、WT1 の発現を制御することが報告されている因子の TGF- $\beta$  を投与した際の発現変化の解析や、WT1 の発現を変化させうる因子の探索を行う。

### 3. 研究の方法

培養糸球体上皮細胞を用いてコントロール、TGF- $\beta$  を 5 日間添加したもの、TGF- $\beta$  を 5 日間添加後 2 日間 TGF- $\beta$  なしで培養したものから mRNA を採取した。WT1 遺伝子の+KTS、-KTS のアイソフォームの比率が変化するか リアルタイム PCR、次世代シーケンサーによる RNA-Seq、DNA シーケンサーを用いたフラグメント解析により検討した。

#### リアルタイム PCR

WT1+KTS、WT1-KTS アイソフォームそれぞれにかかるプライマーを用いてリアルタイム PCR を行った。検量線用のコントロールは exon4 から 10 の領域を PCR で増幅し、シーケンサーにて配列を確認後に TA クローニングを行い制限酵素処理したものをを用いた。

#### 次世代シーケンサーを用いた WT1 のアイソフォームの解析

次世代シーケンサーで RNA-Seq を行い、データを TopHat でマッピングし、Cufflinks で発現量を定量することによりアイソフォームごとの比率を解析した。

#### DNA シーケンサーを用いたフラグメント解析

4 つのアイソフォーム(-Ex5/-KTS、-Ex5/+KTS、+Ex5/-KTS、+Ex5/+KTS)の比率を確認するため、5'末端を蛍光の Fam で標識したプライマーで exon4 から 10 の領域を PCR で増幅し、DNA シーケンサーを使用しフラグメント解析を行った。

WT1 の発現を制御する因子(WTIP や、WT1 のアンチセンス transcripts の WT1-AS)の発現変化を解析した。また、WT1 と同様に TGF- $\beta$  を投与した際に発現が低下し、その後 TGF- $\beta$  なしで培養すると発現が回復する転写因子を見つけ、WT1 遺伝子と同様に糸球体上皮細胞の機能維持に重要である可能性があるか解析を進めた。

#### 4. 研究成果

WT1+KTS、WT1-KTS のアイソフォームの比率が培養系球体上皮細胞に TGF-β を添加した際に変化するか解析した。

##### リアルタイム PCR

WT1 の発現は TGF-β により低下し、その後 TGF-β なしで 2 日間培養すると回復した(図 1)。WT1+KTS と WT1-KTS も同様の発現パターンであった。WT1+KTS、WT1-KTS アイソフォームのそれぞれにかかるプライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、検量線により定量し、WT1+KTS、WT1-KTS のアイソフォームの比率を計算した(図 2)。TGF-β を 5 日間投与、TGF-β 投与後 TGF-β なしで 2 日間培養してもアイソフォームの比率に有意な変化を認めなかった。

図 1 WT1、WT1+KTS、WT1-KTS の発現の変化

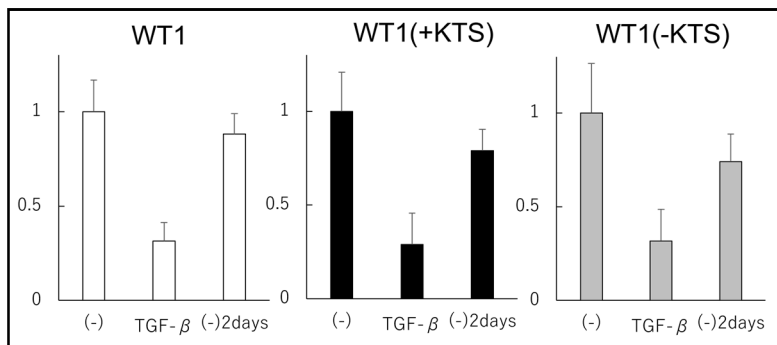
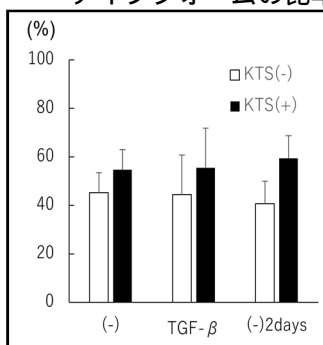


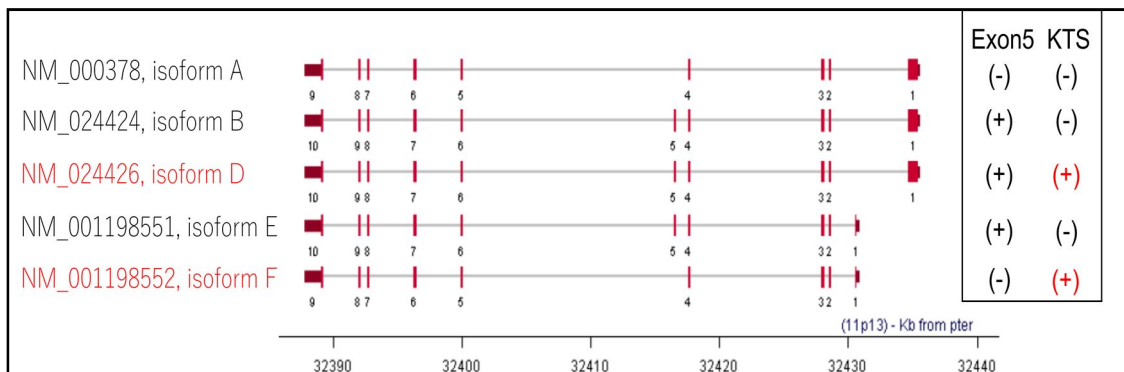
図 2 +KTS、-KTS のアイソフォームの比率



##### 次世代シーケンサーを用いた WT1 のアイソフォームの解析

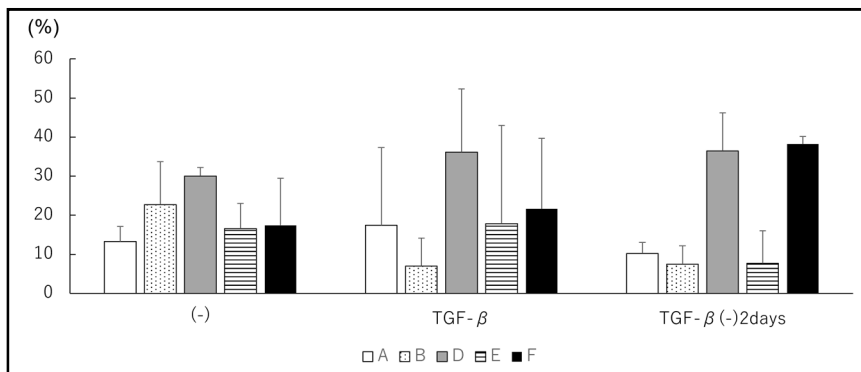
次世代シーケンサーで RNA-Seq を行い、データを TopHat でマッピングし、Cufflinks で発現量を定量したところ、WT1 のアイソフォームとして以下の 5 つが検出された。NM\_000378 (isoform A)、NM\_024424 (isoform B)、NM\_024426 (isoform D)、NM\_001198551 (isoform E)、NM\_001198552 (isoform F)。それぞれの転写開始点、Exson5 の有無、KTS の有無は図 3 のとおりである。

図 3 WT1 のアイソフォームの特徴 (UCSC ゲノムブラウザから一部改変)



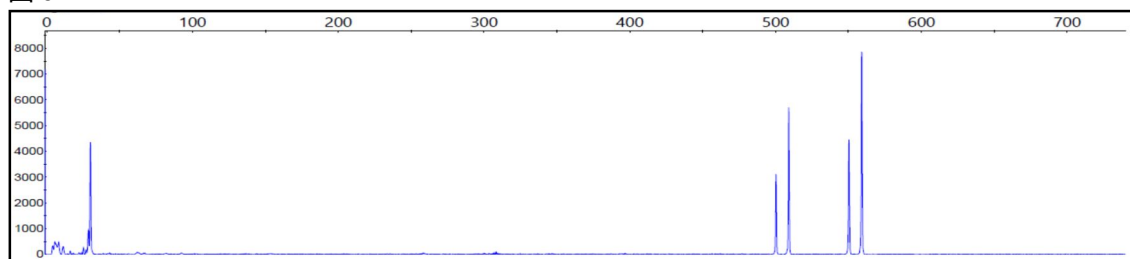
TGF-β を投与してもアイソフォームの比率に有意な変化を認めなかったが、その後 TGF-β なしで 2 日間培養して細胞形態が回復した際に +KTS を持つアイソフォームである NM\_001198552 (isoform F) の比率の上昇傾向を認めた(図 4)。

図 4 アイソフォームごとの発現の変化



DNA シークエンサーを用いたフラグメント解析  
 フラグメント解析により 4 つのアイソフォーム (-Ex5/-KTS、-Ex5/+KTS、+Ex5/-KTS、+Ex5/+KTS) が図 5 のように検出されることを確認した。

図 5



コントロール、TGF- $\beta$  を 5 日間投与、TGF- $\beta$  投与後に TGF- $\beta$  なしで 1 日、2 日培養したも  
 のから mRNA を採取し、4 つのアイソフォーム (-Ex5/-KTS、-Ex5/+KTS、+Ex5/-KTS、  
 +Ex5/+KTS) に比率を検討したが有意な変化を認めなかった(図 6)。また、WT1+KTS、WT1-KTS  
 の比率についても TGF- $\beta$  を投与しても有意な比率の変化を認めなかった。

図 6 -Ex5/-KTS、-Ex5/+KTS、+Ex5/-KTS、+Ex5/+KTS  
 アイソフォームの比率

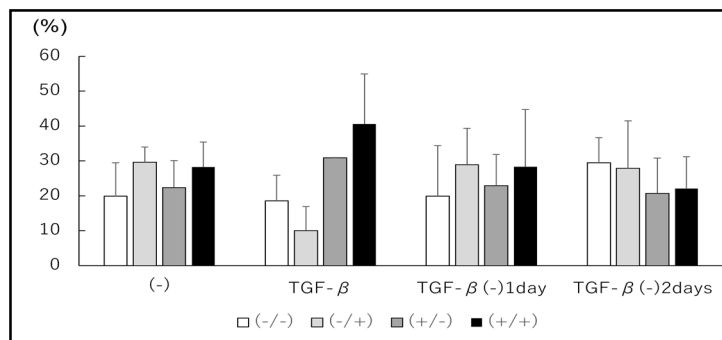
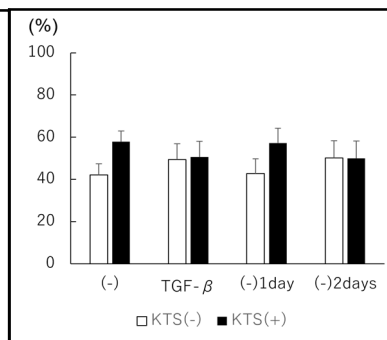


図 7 +KTS、-KTS の  
 アイソフォームの比率



リアルタイム PCR、次世代シーケンサー、DNA シークエンサーを用いたフラグメン  
 ト解析の結果から少なくともヒト系球体上皮細胞の培養細胞を用いた TGF- $\beta$  による WT1 の低  
 下の際に有意なアイソフォームの比率の変化は認めなかった。なお、TGF- $\beta$  を 5 日間投与後に  
 2 日間 TGF- $\beta$  なしで培養すると細胞は元の形態に近い状態に戻るが、次世代シーケンサーに  
 による RNA-Seq のデータから細胞骨格の修復に+KTS を含むアイソフォームが重要な可能性は示  
 唆された。

また、WT1 の発現を制御することが報告されている因子の TGF- $\beta$  を投与した際の発現変化  
 を検討した。WT1-interacting protein (WTIP)、WT1 のアンチセンス transcripts(non-coding  
 RNA)の WT1-AS は WT1 の転写を抑制することが報告されているが、TGF- $\beta$  投与の際に WTIP  
 は変化せず、WT1-AS は WT1 と同様に低下を示した。

また、WT1 と同様に TGF- $\beta$  を投与した際に発現が低下し、その後 TGF- $\beta$  なしで培養すると  
 発現が回復する転写因子である ATOH8 を見つけ解析を進めた。糖尿病性腎症モデルの db/db マ  
 ウスとそのコントロールマウスの系球体をダイナビーズにより採取し、RNA を抽出して発現を  
 比較したところその遺伝子の発現低下を認めた。マウスとラットの免疫蛍光染色にて系球体上  
 皮細胞のマーカーと共発現することを確認した。WT1 と同様に系球体上皮細胞の機能維持に重  
 要な遺伝子であれば WT1 の発現を上昇させる可能性も考えられ、今後検討する方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------