

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22621

研究課題名(和文) シングルセルRNA-sequenceを用いた腎疾患発症・進展メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of renal disease onset and progression mechanism using single cell RNA-sequence

研究代表者

猪阪 善隆 (ISAKA, YOSHITAKA)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00379166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：シングルセルRNA-seq解析(scRNAseq)は、腎臓のように多種多様な細胞で構成される臓器の解析において非常に有用な知見をもたらす。我々は、sequence read archiveに登録されている複数のscRNAseqデータを再解析し、腎発生におけるnephron progenitorの自己複製プロセスや細胞間コミュニケーションなどを明らかとした。scRNAseq解析では、trajectory解析やRNA velocity解析などを用いることで、従来のbulk RNA sequenceとは異なった側面から生命現象を捉えることが可能となり、今後益々有用なツールとなると考えられます。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シングルセルRNA-seq解析では、trajectory解析やRNA velocity解析などを用いることで、従来のbulk RNA sequenceとは異なった側面から生命現象を捉えることが可能です。シングルセルRNA-seq解析技術は日々進化しており、今後益々有用なツールとなると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, single-cell RNA sequencing data obtained from embryonic mouse kidney were re-analyzed. Manifold learning based on partition-based graph-abstraction coordinated cells, reflecting their expected lineage relationships. Consequently, the coordination in combination with ForceAtlas2 enabled the inference of parietal epithelial cells of Bowman's capsule and the inference of cells involved in the developmental process from the S-shaped body to each nephron segment. RNA velocity suggested developmental sequences of proximal tubules and podocytes. In combination with a Markov chain algorithm, RNA velocity suggested the self-renewal processes of nephron progenitors. NicheNet analyses suggested that not only cells belonging to ureteric bud and stroma, but also endothelial cells, macrophages, and pericytes may contribute to the differentiation of cells from nephron progenitors.

研究分野：腎臓内科

キーワード：single cell RNA解析 腎発生

### 1. 研究開始当初の背景

本邦の慢性維持透析患者数は 2016 年度末時点で約 33 万人と未だに増加傾向が続いており、その医療費は年間 2 兆円近くに及んでいるため、その対策は非常に重要である。しかしながら、過去数十年にわたるさまざまな治療介入法の進歩にも関わらず慢性維持透析患者数の増加傾向が続いており、これまでとは異なる新たな視点から腎疾患治療アプローチを構築する必要があるのは明白である。

### 2. 研究の目的

我々を含めた世界中の腎臓病研究者が、腎臓病の発症進展メカニズムおよびその治療法を探索するにあたり、さまざまなヒト腎臓病サンプルや動物実験モデルなどを用いた検討を行ってきたが、これまでの腎臓病研究で得られた成果は腎臓の複雑な構造に起因する大きな問題を内包している。腎臓には現在判明しているだけでも 20 種類以上の固有の性質を持った細胞群が存在し、これら腎構成細胞間の相互作用が正常な腎機能維持に必須であると考えられている。しかしながら、これまでの研究では腎全体の表現型変化をとらえる事はできても腎構成細胞一細胞レベルでの表現型変化をとらえる事はできず、腎疾患の発症進展に重要な変化を見逃してきた可能性がある。しかも、腎病変部には多くの場合多種多様な免疫細胞が存在し、腎構成細胞群と複雑な相互作用を引き起こしているが、その全体像は不明な点が多い。この状況を打破すべく、我々は本研究において過去の腎臓病研究では把握し得なかったヒト正常腎および疾病腎における一細胞レベルの表現型をあぶり出し、これまでにない視点から腎臓病の本態に迫り、腎疾患に対する新たな治療介入法開発に資する学術的基盤を提供する。

### 3. 研究の方法

我々は本研究において下記の 3 段階に分けて、シングルセル RNA-sequence (scRNA-seq) 技術および spatial transcriptomics 技術を用いてヒト正常および病腎における腎構成細胞および腎浸潤免疫・炎症細胞の表現型を明らかにし、両実験にて得られたデータから artificial intelligence (AI) を用いて特徴量を抽出することにより、腎構成細胞および免疫炎症細胞の位置情報・相互作用を解明して新たな腎疾患治療法開発に資する学術基盤を構築する。

【研究方法 1】 scRNA-seq は発展途上の技術であるため、本研究ではまずヒト腎組織 scRNA-seq を行う実験条件の最適化を図る。なお、本研究では正常腎組織としては腎悪性腫瘍で腎全摘術を受けた患者の腎正常部分を、病腎としては腎生検組織の一部を用いる。最近、腎組織の scRNA-seq に関する報告が散見され始めたが、既報で用いられた手法には大きく 2 つの問題点がある。一つ目は近位および遠位尿細管細胞が腎構成細胞の約 8 割を占めているため、RNA-seq の際に糸球体などの腎構成細胞データが得にくい事である。この問題点に対して、我々はビオチン化 lotus tetragonolobus lectin および peanut lectin を用いてそれぞれ近位・遠位尿細管を単離除去する技術を有しており (J Am Soc Nephrol. 2011; 22:902-13)、同手法を用いて近位および遠位尿細管細胞割合を減少させた上で scRNA-seq を行い、全ての腎構成細胞の sequence データをより深く得る手法を本研究にて確立する。二つ目の問題は最適な腎一細胞分離方法が定

まっていない点である。腎構成細胞のうち細胞外マトリックスに囲まれている細胞は分離されにくい事が既に明らかになっている(J Am Soc Nephrol. 2018;29: 2060-2068)。この点は酵素分解処理時間を延長すれば解決する可能性があるが、37 処理時間を延長すると RNA 分解が進み、本来の情報が失われてしまうという予備的検討結果を我々は有している。このため、cold-active protease 類 (Biology 2013;2:7 55-783) を用いて RNA の質を維持しつつ全腎構成細胞を単離する手法を本研究にて確立する。

【研究方法 2】 scRNA-seq および spatial transcriptomics については国際共同企画 Human Cell Atlas プロジェクトを担っている理化学研究所チームリーダーShin Jay W 博士および茂呂和世博士の協力のもと行う。Spatial transcriptomics (Science 2016:353;78-82) は基盤上にバーコード付き capture probe を配置して *in situ* でライブラリーを作成し、バーコード情報をもとに発現している mRNA の組織上の位置情報を得る技術である。scRNA-seq は一細胞レベルの細胞表現型を同定する非常に強力な方法であるが、細胞の位置情報は失われるという欠点を有している。

#### 4 . 研究成果

シングルセル RNA-seq 解析は、RNA の発現量を 1 細胞ごとに網羅的に計測する技術で、腎臓のように多種多様な細胞で構成される臓器の解析において非常に有用な知見をもたらします。我々は、sequence read archive に登録されている複数のシングルセル RNA-seq データを再解析し、腎発生における nephron progenitor の自己複製プロセスや細胞間コミュニケーションなどを明らかにすることとした。

マウス胚の腎臓から得られたシングルセル RNA シーケンスデータを再分析した。Partition-based graph abstraction (PAGA) initialized ForceAtlas2 で E18.5 マウス腎臓構成細胞をマッピングし、発生系譜との関係を検討した。sequence read archive に登録されている複数のシングルセル RNA-seq データを再解析し、腎発生における nephron progenitor の自己複製プロセスや細胞間コミュニケーションなどを明らかにした。シングルセル RNA-seq 解析では、trajectory 解析や RNA velocity 解析などを用いることで、従来の bulk RNA sequence とは異なった側面から生命現象を捉えることが可能となった。シングルセル RNA-seq 解析技術は日々進化しており、今後益々有用なツールとなると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsui I, Matsumoto A, Inoue K, Katsuma Y, Yasuda S, Shimada K, Sakaguchi Y, Mizui M, Kaimori JY, Takabatake Y, Isaka Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Single cell RNA sequencing uncovers cellular developmental sequences and novel potential intercellular communications in embryonic kidney	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-80154-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
研究分担者	井上 和則  (Inoue Kazunori)  (10631301)	大阪大学・医学系研究科・助教   (14401)	
研究分担者	水井 理之  (Mizui Masayuki)  (30423106)	大阪大学・医学系研究科・講師   (14401)	
研究分担者	松井 功  (Matsui Isao)  (60456986)	大阪大学・医学系研究科・助教   (14401)	

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
---------	---------