

令和 5 年 9 月 13 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03698

研究課題名(和文) iPS細胞由来腎臓オルガノイドを用いた小児ネフローゼ症候群の発症機序の解明

研究課題名(英文) Clarification of the pathogenesis of childhood nephrotic syndrome using iPS cell-derived kidney organoids

研究代表者

飯島 一誠 (Iijima, Kazumoto)

神戸大学・医学研究科・客員教授

研究者番号：00240854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：11例の日本人小児ネフローゼ症候群患者から、尿蛋白防止機構として最も重要なスリット膜の主要構成蛋白であるNephrinをコードする遺伝子NPHS1のrisk haplotypeをnull (n=5), hetero (n=4)あるいはhomo (n=2)を持つiPS細胞を作成した。また、その一部のiPS細胞から腎臓オルガノイドの作成に成功した。今後、すべてのiPS細胞を腎臓オルガノイドあるいは腎系球体ポドサイトに分化誘導し、NPHS1のrisk haplotypeとNPHS1遺伝子発現の関連を明らかにする予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、日本人小児ネフローゼ症候群(NS)患者のゲノムワイド関連解析を行い、Nephrinをコードする遺伝子NPHS1のvariantがNSの発症に関連する可能性を世界で初めて見出したが、NPHS1 variantがNPHS1 mRNA発現を制御する機序として、Allele-specific expression (ASE)の可能性が高いと考えられた。今後、小児NS患者由来のiPS細胞から腎臓オルガノイドを分化誘導し、ASEが生じているかを確認することで、NSの発症機序の解明に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：From 11 Japanese pediatric patients with nephrotic syndrome, we generated iPS cells with null (n = 5), hetero (n = 4) or homo (n = 2) risk haplotypes of the gene NPHS1 that encodes Nephrin, the most important slit-membrane major component protein as a urinary protein prevention mechanism. They also succeeded in producing kidney organoids from some of the iPS cells. In the future, all iPS cells will be induced to differentiate into kidney organoids or renal glomerular podocytes to clarify the relationship between NPHS1 risk haplotype and NPHS1 gene expression.

研究分野：小児科学

キーワード：小児ネフローゼ症候群 iPS細胞 腎臓オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

小児ネフローゼ症候群(NS)は、我が国では小児 10 万人あたり 6.5 人/年の発症率であり、毎年、新たに、約 1,000 人の小児が本症候群を発症する。小児慢性腎疾患のなかで最も頻度の高い指定難病であり、20 - 30%の患者は成人期になっても再発を繰り返す難治例である。

小児 NS のネフローゼ期(すなわち高度蛋白尿を呈している時期)には、腎糸球体ポドサイト足突起が癒合し、尿蛋白を防止する上で最も重要と考えられるスリット膜が消失することはよく知られた事実であり、腎糸球体ポドサイト及びスリット膜の機能障害が NS の病態の本質であることは間違いなく考えられる。実際、小児 NS の 1-2%は、腎糸球体ポドサイトのスリット膜関連蛋白や細胞骨格蛋白などの遺伝子変異が原因であり、ステロイドやシクロスポリン等の免疫抑制薬にも反応せず末期腎不全に至る。

しかし、小児 NS の大半は、上記の遺伝子変異を有さず、その原因は不明である。40 年以上前に“T 細胞機能異常により、糸球体基底膜透過性亢進作用を持つ T 細胞由来液性因子が産生されることが原因である”という仮説が提唱されたが、その実態は依然として不明であり、T 細胞由来液性因子が原因であるか否かも明らかではない。

インフルエンザなどのウイルス感染や虫刺傷等により、小児 NS が発症・再発することはよく知られた事実であり、免疫学的な刺激がトリガーとなり小児 NS が発症する可能性は極めて高いと考えられる。また、時に家族内発症を認めることから、何らかの遺伝的素因がその発症に関わっている可能性が高いと考えられる。

すなわち、小児 NS は多因子疾患であり、疾患感受性の高い個人に、ウイルス感染などの免疫学的な刺激がトリガーとなり、何らかの機序でポドサイトが傷害され、腎糸球体スリット膜の機能障害が生じ、大量の蛋白尿を呈し、NS を発症するのではないかと推測される。

我々は最近、日本人小児 NS 患者のゲノムワイド関連解析及び国際メタ解析を行い、HLA class II と腎糸球体ポドサイトに強発現し、尿蛋白防止機構として最も重要なスリット膜の主要構成蛋白である Nephrin をコードする遺伝子 *NPHS1* の variant が NS の発症に関連する可能性を世界で初めて見出した (*J Am Soc Nephrol* 2018, doi: 10.1681/ASN.2017080859; *Kidney Int.* 2020, doi: 10.1016/j.kint.2020.05.029) (図 1, 2 参照)。

図1. 小児ステロイド感受性ネフローゼ症候群のゲノムワイド関連解析マンハッタンプロット

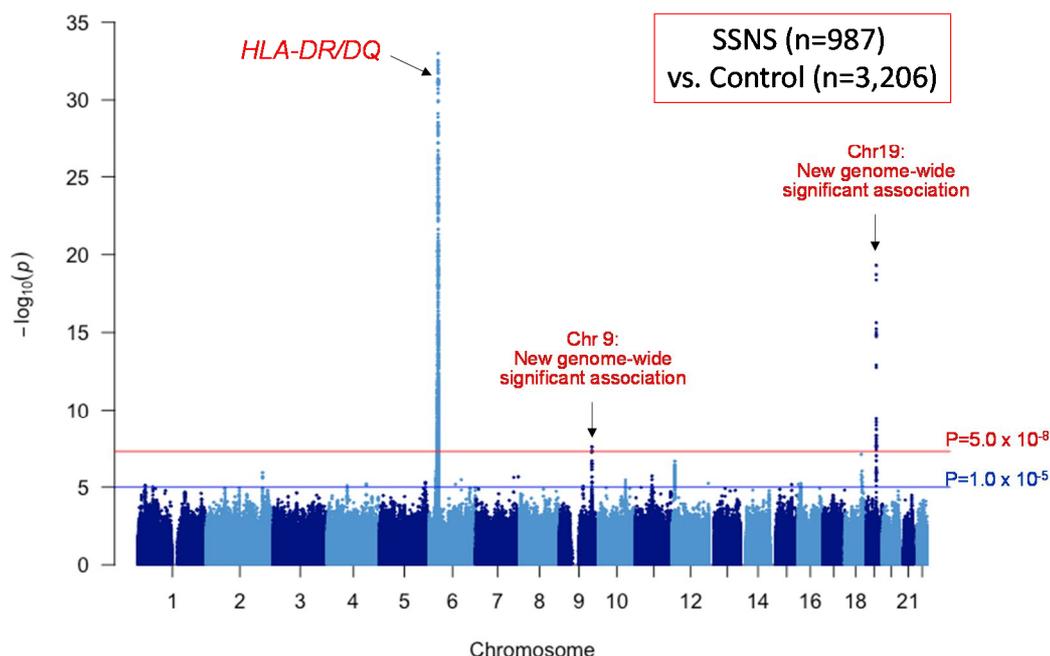
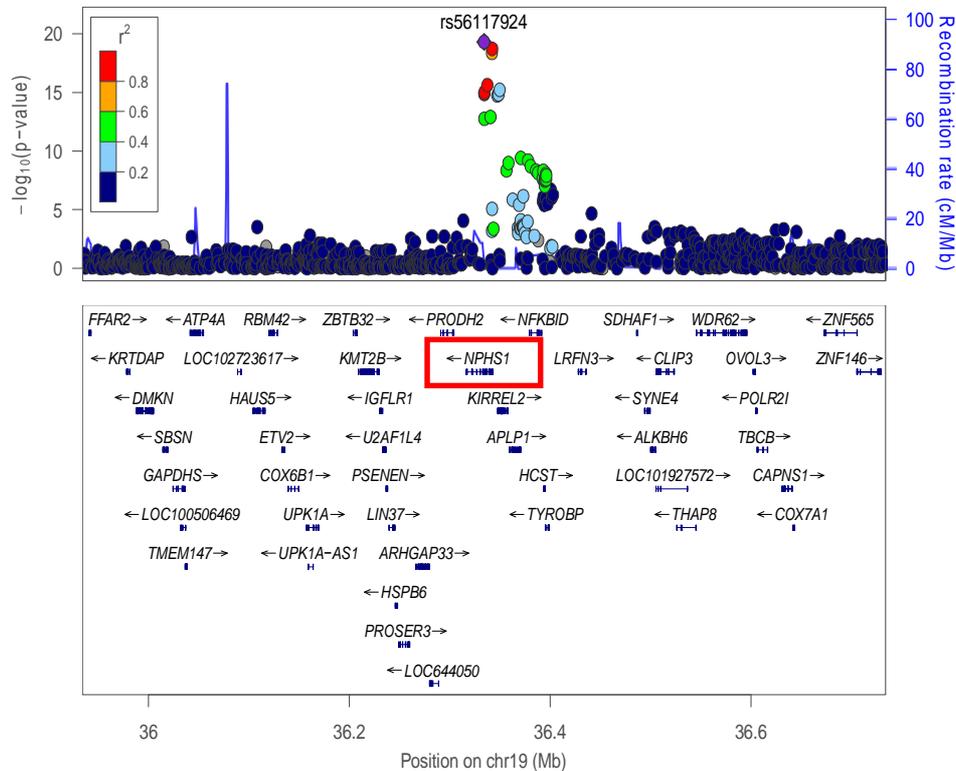


図2. 19番染色体領域の拡大図



しかし、それらの variant が、どのような機序で NS の発症に関与するのは依然として明らかではなく、そのメカニズムを解明する必要がある。我々は、先行研究において、ボストン小児病院/ハーバード大学の Mathew G Sampson 博士らの協力のもとに、特発性ネフローゼ症候群を中心とした患者の全ゲノム情報と腎生検検体（糸球体及び尿細管）の RNA-Seq 情報を統合した Nephrotic Syndrome Study Network (NEPTUNE) データベースを利用して、*NPHS1* variant の作用機序を検討したところ、*NPHS1* variant は eQTL や sQTL として作用するのではなく、minor allele すべて (risk haplotype) を hetero で有する患者で、Allele-specific expression (ASE) という現象が生じて *NPHS1* mRNA 発現に影響を与えていることが示唆されている

(*Kidney Int.* 2020, doi: 10.1016/j.kint.2020.05.029)

(図 3, 4 参照)

図3. *NPHS1*領域のゲノムワイド有意な主要バリエーション

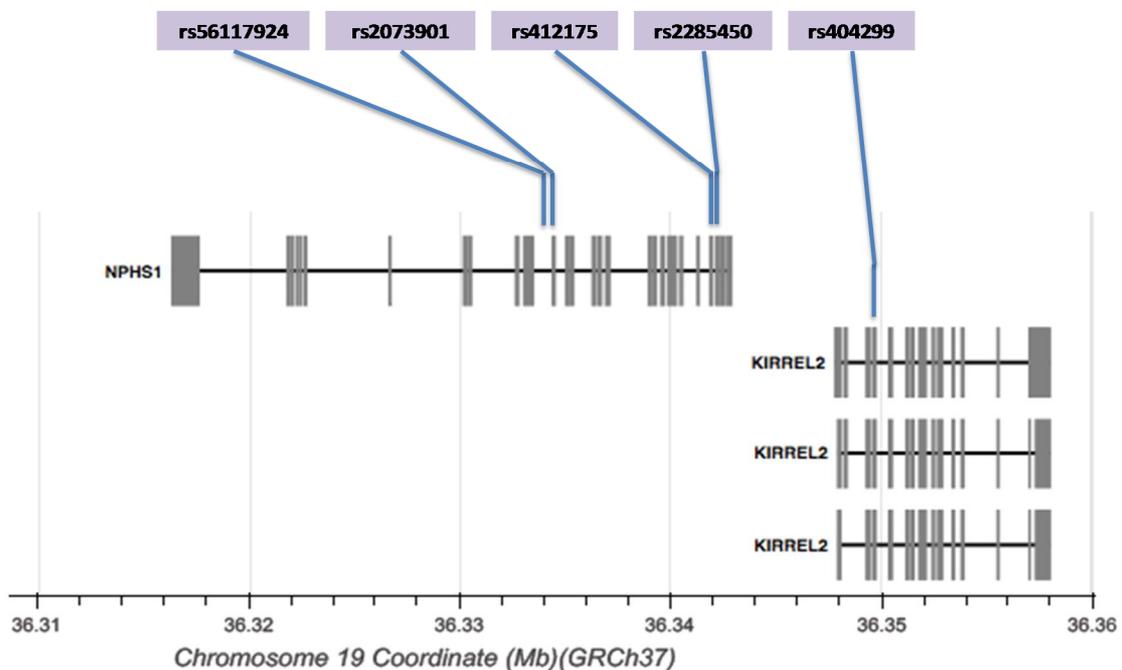
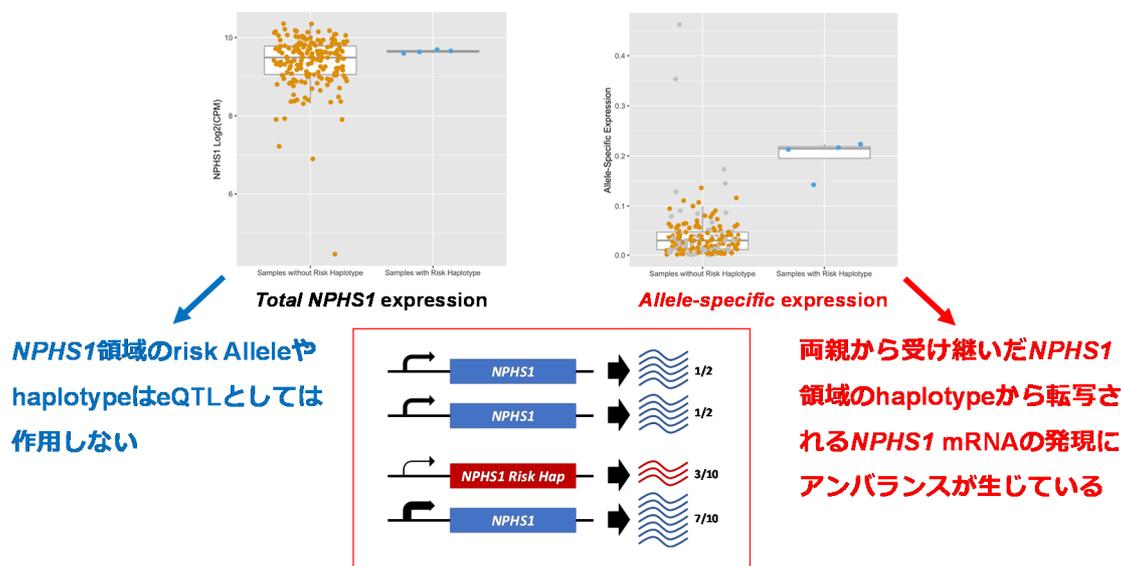


図4. *NPHS1*領域のリスクハプロタイプは Allele-specific expression を惹起する



2. 研究の目的

本研究では、小児 NS 患者由来の iPS 細胞を作成し、その iPS 細胞からマルチステップ分化誘導した腎臓オルガノイドを用いて、*NPHS1* の variant が NS の発症に關与するメカニズム、特に ASE 等の遺伝子発現に影響を及ぼす現象の有無を明らかにすることを目的とする。

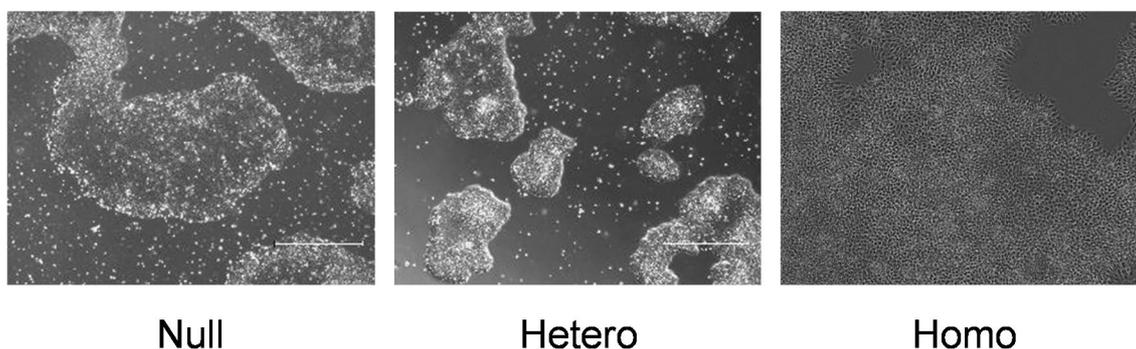
3. 研究の方法

我々の先行研究で *NPHS1* risk haplotype が明らかになっている小児 NS 患者のリンパ球より iPS 細胞を作成し、その iPS 細胞からマルチステップ分化誘導した腎臓オルガノイドの RNA-seq を行い、*NPHS1* mRNA において ASE 等の遺伝子発現に影響を及ぼす現象が生じているか否かを検討する。

4. 研究成果

研究期間の途中で、より良質な iPS 細胞作製が可能な業者に変更したことや、患者数の少ない homo の検体収集には遠方の研究協力機関での収集が必要であったがコロナ禍等で患者検体の収集に時間を要したこと、一部の検体で iPS 細胞の作成に問題が生じたことなどから、当初の予定より研究の進捗が遅れ、研究期間終了時点で、11 例の日本人小児ネフローゼ症候群患者から、*NPHS1* risk haplotype を null (n=5), hetero (n=4)あるいは homo (n=2)で持つ iPS 細胞を作成することに成功した。(図 5 参照) また、その一部の iPS 細胞から腎臓オルガノイドの作成に成功した。

図5. 疾患iPS細胞の樹立



今後、すべての iPS 細胞からの腎臓オルガノイド作成を行い、*NPHS1* mRNA を強発現するポドサイトを中心に、RNA-seq を行い、*NPHS1* mRNA において ASE が生じているか否かを確認する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Horinouchi Tomoko, Nozu Kandai, Iijima Kazumoto	4. 巻 37
2. 論文標題 An updated view of the pathogenesis of steroid-sensitive nephrotic syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatric Nephrology	6. 最初と最後の頁 1957-1965
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00467-021-05401-4	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 -
1. 著者名 Xiaoyuan Jia, Tomohiko Yamamura, Rasheed Gbadegesin, Tomoko Horinouchi, Kandai Nozu, Pierre Ronco, Matthew G Sampson, Katsushi Tokunaga, Kaumoto Iijima, et al.	4. 巻 98
2. 論文標題 Common risk variants in NPHS1 and TNFSF15 are associated with childhood steroid-sensitive nephrotic syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 1308-1322
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.kint.2020.05.029	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 該当する
1. 著者名 Malakasioti G, Iancu D, Milovanova A, Tsygin A, Horinouchi T, Nagano C, Nozu K, Kamei K, Fujinaga S, Iijima K, et al. ; CN1 in Monogenic SRNS Study Investigators	4. 巻 103
2. 論文標題 A multicenter retrospective study of calcineurin inhibitors in nephrotic syndrome secondary to podocyte gene variants	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 962-972
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.kint.2023.02.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ishimori S, Horinouchi T, Fujimura J, Yamamura T, Matsunoshita N, Kamiyoshi N, Sato M, Ogura M, Kamei K, Ishikura K, Iijima K, Nozu K	4. 巻 -
2. 論文標題 Is influenza vaccination associated with nephrotic syndrome relapse in children? A multicenter prospective study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatric Nephrology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00467-022-05783-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagano C, Hara S, Yoshikawa N, Takeda A, Gotoh Y, Hamada R, Matsuoka K, Yamamoto M, Fujinaga S, Sakuraya K, Kamei K, Hamasaki Y, Oguchi H, Araki Y, Ogawa Y, Okamoto T, Ito S, Tanaka S, Kaito H, Aoto Y, Ishiko S, Rossanti R, Sakakibara N, Horinouchi T, Yamamura T, Nagase H, Iijima K, Nozu K	4. 巻 3
2. 論文標題 Clinical, Pathological, and Genetic Characteristics in Patients with Focal Segmental Glomerulosclerosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Kidney360	6. 最初と最後の頁 1384-1393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34067/KID.0000812022	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4件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 飯島一誠
2. 発表標題 エビデンスに基づいた小児ネフローゼ症候群の治療
3. 学会等名 第42回日本小児腎不全学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯島一誠、野津寛大、佐古まゆみ
2. 発表標題 小児ネフローゼ症候群の病因探索研究および治療開発研究 UP TO Date
3. 学会等名 第55回日本小児腎臓病学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazumoto Iijima
2. 発表標題 State of the art nephrotic syndrome: Insights into pathogenesis and treatment
3. 学会等名 54th Annual Scientific Meeting of the European Society for Pediatric Nephrology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazumoto Iijima
2. 発表標題 MMF after rituximab for complicated FRNS/SDNS
3. 学会等名 19th Congress of the International Pediatric Nephrology Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔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	堀之内 智子 (Horinouchi Tomoko) (30754593)	神戸大学・医学研究科・助教 (14501)	
研究分担者	高里 実 (Takasato Minoru) (40788676)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー (82401)	
研究分担者	野津 寛大 (Nozu Kandai) (70362796)	神戸大学・医学研究科・教授 (14501)	
研究分担者	長野 智那 (Nagano China) (60814316)	神戸大学・医学研究科・医学研究員 (14501)	

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