

令和 6 年 5 月 18 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17283

研究課題名（和文）マイクロRNA解析による特発性ネフローゼ症候群の病態解明と新規治療薬の開発

研究課題名（英文）Elucidation of pathophysiology of idiopathic nephrotic syndrome by microRNA analysis and development of novel therapeutic agents

研究代表者

辻 憲二（Tsuji, Kenji）

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：10816995

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）：本研究では、ネフローゼ症候群患者の血清に含有されるエクソソームが特発性ネフローゼ症候群の病因となる可能性を探るとともに、エクソソームに含有されるmicroRNAなどの因子を解析することによって特発性ネフローゼ症候群に対する新規治療法の探求を目指すことを目的とした。ネフローゼ症候群患者の血清および血清由来エクソソームの野生型マウスへの静脈注射により、遷延する尿蛋白が惹起されたことより、糸球体上皮細胞障害の要因となる因子が両者に含有されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ネフローゼ症候群の病因は依然として不詳であり、特に難治性NSの主な原因である巣状分節性糸球体硬化症の治療法は十分には確立されておらず、ネフローゼ症候群が持続する症例の腎予後は不良である。今回の我々の研究により、ネフローゼ症候群の病因因子が患者血清のエクソソームに含有されることが示唆された。今後の解析によって特定の病因が解明されれば新規治療法の開発につながる可能性も期待され、これらの新規治療の開発がもたらす腎予後の改善から社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to explore the possibility that exosomes contained in the serum of patients with nephrotic syndrome may be the cause of idiopathic nephrotic syndrome, and to explore new treatments for idiopathic nephrotic syndrome by analyzing factors such as microRNA contained in exosomes. Intravenous injection of serum from patients with nephrotic syndrome and serum-derived exosomes into wild-type mice induced persistent urinary protein, suggesting that both contain factors that cause glomerular epithelial cell damage.

研究分野：腎臓内科

キーワード：ネフローゼ症候群 マイクロRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糸球体濾過バリアは腎臓の重要な役割の 1 つであり、その中心的役割を持つ糸球体上皮細胞は、隣り合う互いの足突起を絡み合わせて特徴的なスリット膜と呼ばれる細胞間結合をもつ。このスリット膜は糸球体基底膜とともに糸球体濾過バリアの恒常性を保つのに不可欠である。CD2AP、Nephrin、Podocin などのスリット膜構成タンパクの遺伝子ノックアウトマウスはいずれも高度の蛋白尿を伴う糸球体上皮細胞障害をきたし、最終的に末期腎不全に陥る。糸球体上皮細胞障害によりネフローゼ症候群(NS)を呈する代表的な疾患として巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)及び微小変化型ネフローゼ症候群(MCNS)があり、特に難治性 NS の主な原因である FSGS の治療法が十分には確立されておらず、NS が持続する症例の予後は不良であり、腎移植後の再発率も高い。

一次性 FSGS の原因としては、腎移植後早期に再発がみられること、FSGS 患者血清をラットに投与することにより蛋白尿及び糸球体上皮細胞障害が認められることよりなんらかの液性因子が原因であることが考えられてきた。プロテオミクス解析の進歩によって血清中 suPAR が FSGS の原因である可能性が報告されたが、複数の他グループの検討により否定的な報告が相次いでおり、依然として FSGS の原因となりうる液性因子は不詳である。一方で MCNS においても同様に液性因子の関連が疑われ、特に T 細胞の異常との関連性が指摘され、IL-4, IL-13 等のサイトカインあるいは Hemopexin, Angptl4 が病因となる可能性が報告されてきたが、いまだに一定の評価は得られていない。

近年になりエクソソームによる細胞間情報伝達が解明され、ncRNA の一つであるマイクロ(micro)RNA も重要な細胞伝達因子として知られるようになっており、NS の病因となる液性因子はエクソソームを介している可能性も考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、NS 患者血清に含有されるエクソソームが特発性 NS の病因となる可能性を探るとともに、エクソソームに含有される microRNA などの因子を解析することによって特発性 NS の新規治療法の探求を目指す。

3. 研究の方法

(1) 特発性 NS 患者血清由来のエクソソームの抽出

特発性 NS 患者及び対象群として非 NS 患者より得られた血清より超遠心分離法を用いてエクソソームの抽出を行う。ウェスタンブロット法及び電子顕微鏡を用いて抽出エクソソームの質的評価を行う。

(2) 特発性 NS 患者血清エクソソームによるげっ歯類の糸球体上皮細胞障害の検討

8 週齢の野生型 C57BL6J 雄性マウスを、生理食塩水 150 μ l の尾静注、对照患者の血清 150 μ l の尾静注、NS 患者の血清 150 μ l の尾静注、NS 患者由来エクソソーム 150 μ l の尾静注投与の 4 群に分けて、尿蛋白の惹起について検討する。蛋白尿の評価は静脈注射前、静注後 ~ 24 時間の蓄尿検体、静注 24 時間 ~ 48 時間の蓄尿検体を用いて、SDS-PAGE および Coomassie 染色によって評価する。

4．研究成果

(1) 特発性 NS 患者及び対照群の血清より TIM-4 法を用いてエクソソームを回収した。回収したエクソソームは透過型電子顕微鏡およびイムノプロット法で CD63 抗体を用いて確認した。さらに蛍光標識したエクソソームを培養系球体上皮細胞に添付したところ、細胞質への良好な取り込みが確認できた。

(2) 生理食塩水投与マウスは、投与前と比較して有意な尿蛋白の検出は認められなかった。対照患者由来の血清により静注後 24 時間後までの蓄尿で尿蛋白の検出が認められたが、24 時間～48 時間後の蓄尿では尿蛋白は消失した。一方で、NS 患者の血清およびエクソソームを静注したマウスは静注後 24 時間後、24 時間～48 時間後までの蓄尿ともに尿蛋白は検出された。

以上のことから、ヒト血清をマウスに静注した際には一時的な尿蛋白が惹起されることが示された。また、NS 患者の血清および血清由来のエクソソームの静注では、惹起される尿蛋白が遷延しており、糸球体上皮細胞障害の要因となる因子が両者に含有されることが示唆された。

今後は NS 患者由来のエクソソームに含有される microRNA を解析し、疾患特異的 microRNA 候補として可能性のある mimic を作成して解析を行うことにより、疾患の病態に関わる microRNA の特定を行い、さらに特定しえた microRNA を阻害する抗体を作成することにより新規治療薬の開発を目指す予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsuoka-Uchiyama Natsumi, Tsuji Kenji, Sang Yizhen, Takahashi Kensaku, Fukushima Kazuhiko, Takeuchi Hidemi, Inagaki Kenichi, Uchida Haruhito A., Kitamura Shinji, Sugiyama Hitoshi, Wada Jun	4. 巻 12
2. 論文標題 The association between hypothyroidism and proteinuria in patients with chronic kidney disease: a cross-sectional study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-19226-0	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 Uchiyama-Matsuoka Natsumi, Tsuji Kenji, Uchida Haruhito A., Kitamura Shinji, Itoh Yoshihiko, Nishiyama Yuki, Morimoto Eisaku, Fujisawa Satoshi, Terasaka Tomohiro, Hara Takayuki, Ogura-Ochi Kanako, Inagaki Kenichi, Wada Jun	4. 巻 13
2. 論文標題 Masked CKD in hyperthyroidism and reversible CKD status in hypothyroidism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1048863
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2022.1048863	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 Yizhen Sang, Kenji Tsuji, Kazuhiko Fukushima, Kensaku Takahashi, Shinji Kitamura, Jun Wada	4. 巻 321
2. 論文標題 Semaparin3A inhibitor ameliorates renal fibrosis through the regulation of JNK signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 F740-F756
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajprenal.00234.2021	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 Kenji Tsuji, Shinji Kitamura and Jun Wada	4. 巻 -
2. 論文標題 Potential Strategies for Kidney Regeneration with Stem Cells: An overview	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	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) なし	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 Kenji Tsuji, Shinji Kitamura, Jun Wada	4. 巻 22
2. 論文標題 MicroRNAs as Biomarkers for Nephrotic Syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22010088	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 Matsuoka-Uchiyama Natsumi, Tsuji Kenji, Takahashi Kensaku, Fukushima Kazuhiko, Takeuchi Hidemi, Kitamura Shinji, Inagaki Kenichi, Uchida Haruhito A., Wada Jun	4. 巻 13
2. 論文標題 Association between Urinary Creatinine Excretion and Hypothyroidism in Patients with Chronic Kidney Disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 669 ~ 669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics13040669	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 Tsuji Kenji, Nakanoh Hiroyuki, Takahashi Kensaku, Morita Takafumi, Sang Yizhen, Fukushima Kazuhiko, Matsuoka-Uchiyama Natsumi, Onishi Yasuhiro, Uchida Haruhito A., Kitamura Shinji, Wada Jun	4. 巻 5
2. 論文標題 Kidney Veno-Muscular Characteristics and Kidney Disease Progression: A Native Kidney-Biopsy Study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Kidney Medicine	6. 最初と最後の頁 100733 ~ 100733
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xkme.2023.100733	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 Tsuji Kenji, Nakanoh Hiroyuki, Fukushima Kazuhiko, Kitamura Shinji, Wada Jun	4. 巻 13
2. 論文標題 MicroRNAs as Biomarkers and Therapeutic Targets for Acute Kidney Injury	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 2893 ~ 2893
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics13182893	査読の有無 無
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 Sang Yizhen, Tsuji Kenji, Nakanoh Hiroyuki, Fukushima Kazuhiko, Kitamura Shinji, Wada Jun	4. 巻 13
2. 論文標題 Role of Semaphorin 3A in Kidney Development and Diseases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 3038 ~ 3038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics13193038	査読の有無 無
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 Haraguchi Soichiro, Tsuji Kenji, Nakanoh Hiroyuki, Fukushima Kazuhiko, Kitamura Shinji, Wada Jun	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of HIF-PHD inhibitors in kidney development	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nephrology Dialysis Transplantation	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) 10.1093/ndt/gfae078	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 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 辻憲二, 喜多村真治, 和田淳
2. 発表標題 成体腎臓幹細胞由来のエクソソームによる腎臓再生機序の解明と制御
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内山奈津実, 辻 憲二, 喜多村真治, 稲垣兼一, 内田治仁, 杉山 齊, 和田 淳
2. 発表標題 甲状腺機能低下症とCKDの関連性におけるCr代謝の影響についての検討
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻憲二, 喜多村真治, 和田淳
2. 発表標題 成体腎臓幹細胞由来のエクソソームによる腎臓再生機序の解明と制御
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内山奈津美, 辻 憲二, 喜多村真治, 稲垣兼一, 内田治仁, 杉山 齊, 和田 淳
2. 発表標題 甲状腺機能低下症とCKDの関連性におけるCr代謝の影響についての検討
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻憲二, 喜多村真治, 高橋謙作, 福島和彦, 小林直哉, 和田淳
2. 発表標題 人工知能 (AI) は血液透析 (HD) 患者のエポエチン BS (BS) の糖尿病 (DM) 有無による腎性貧血治療反応差を予測する
3. 学会等名 第65回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 辻憲二, 喜多村真治, 高橋謙作, 福島和彦, 小林直哉, 和田淳
2. 発表標題 人工知能 (AI) による血液透析患者のエポエチン BSの腎性貧血治療反応予測プログラムの開発
3. 学会等名 第65回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 辻憲二, Yizhen Sang, 福島和彦, 高橋謙作, 喜多村真治, 和田淳
2. 発表標題 Semaphorin3Aを介したポドサイト障害機序の解明
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 辻憲二, 喜多村真治, 高橋謙作, 福島和彦, 小林直哉, 和田淳
2. 発表標題 人工知能 (AI) による血液透析患者のエポエチン BS(BS)の腎性貧血治療反応予測プログラムの開発
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 辻憲二, 喜多村真治, 高橋謙作, 福島和彦, 小林直哉, 和田淳
2. 発表標題 人工知能 (AI) は血液透析患者のエポエチンalpha ; BSの糖尿病有無による腎性貧血治療抵抗性を予測する
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yizhen Sang, Kenji Tsuji, Kazuhiko Fukushima, Kensaku Takahashi, Shinji Kitamura, Jun Wada
2. 発表標題 Semaphorin3A-inhibitor ameliorates renal fibrosis in unilateral ureter obstruction mice.
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kenji Tsuji, Kensaku Takahashi, Takafumi Morita, Yasuhiro Onishi, Shinji Kitamura, Hitoshi Sugiyama and Jun Wada
2. 発表標題 The Prognostic Value of Renal Venous-muscular Complex Variant in Native Kidney Biopsy Specimens: An observational cohort study.
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辻憲二, 田中景子, 竹内英実, 田邊克幸, 森永裕士, 木野村賢, 内田治仁, 喜多村真治, 杉山齊, 和田淳
2. 発表標題 ゆで卵を用いた模擬腎生検：コロンプスの卵.
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辻憲二, 岡本修吾, 大西康博, 田中景子, 竹内英実, 田邊克幸, 森永裕士, 内田治仁, 喜多村真治, 和田淳
2. 発表標題 医学生に対する腎セミナー開催についての検討
3. 学会等名 第66回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 辻憲二, 喜多村真治, 和田淳
2. 発表標題 スチレン系軟質樹脂を用いた腎生検シミュレーターの開発と有用性の検討
3. 学会等名 第66回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 辻憲二, 喜多村真治, 和田淳
2. 発表標題 AKI研究の最先端. 急性腎障害の診断と治療におけるmicroRNAの有用性
3. 学会等名 第66回日本腎臓学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 辻憲二
2. 発表標題 人工知能による自然言語処理からの医学研究の方向性, 若手によるホットな臨床研究の祭典
3. 学会等名 第53回日本腎臓学会西部学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2023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

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