

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07861

研究課題名（和文）腎尿細管エンドサイトーシスを制御する転写調節システムの解明

研究課題名（英文）Transcriptional regulatory systems controlling renal tubular endocytosis

研究代表者

張田 豊 (Harita, Yutaka)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10451866

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）：転写因子HNF4 をコードするHNF4Aの遺伝子変異は若年発症成人型糖尿病の原因になる。一方R76W変異ではHNF4Aの他の変異と異なりFanconi症候群を呈する。本研究ではHNF4A R76Wの下流を明らかにすることにより、尿細管再吸収に関与する分子のネットワークを解明することを目的とする。HNF4Aの下流分子、特にR76W変異により転写活性が変化する分子を複数同定し、機能不明の候補因子Xに着目した。Xのノックアウトマウスを作成したところ、ホモノックアウトマウスは特徴的な尿細管機能異常を呈することが明らかになった。HNF4Aの下流で尿細管機能を制御する新規の因子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎臓は血液をろ過して老廃物を除去する重要な器官です。尿細管とよばれる管では一度尿にろ過された物質を再吸収・再利用するプロセスが行われており、エンドサイトーシスと呼ばれます。体内の物質バランスを維持する上で不可欠な機能のため、その異常は、さまざまな腎疾患の発症に関与することが知られています。本研究は遺伝子異常で起こる腎尿細管エンドサイトーシスの異常に着目し、そのメカニズムを明らかにすることを目的としています。腎尿細管の再吸収機構の理解は、腎臓病の予防や治療法の開発に重要な知見の基盤となると考えられます。

研究成果の概要（英文）：Disrupted reabsorption in the renal proximal tubules leads to Fanconi syndrome. Mutations in HNF4A, which encodes the transcription factor HNF4, cause juvenile-onset adult-onset diabetes mellitus. Noticeably, HNF4A R76W mutation, unlike other HNF4A mutations, causes Fanconi syndrome. This study aims to clarify its downstream and to elucidate the molecular network involved in tubular reabsorption. Using a cultured cell model, we identified molecules whose transcription is promoted by HNF4A and further altered by R76W mutation. Of those identified, we focused on candidate factor X, whose function is unknown. We generated knockout mice for X and found that heterozygous knockout mice had no phenotype. The homozygous knockout mice exhibited Fanconi syndrome, indicating that X has an essential function in the kidney. RNA-seq and renal tissue staining of renal tissue revealed variable expression of several molecules associated with endocytosis in the tubules.

研究分野：小児科学

キーワード：腎尿細管 エンドサイトーシス Fanconi症候群

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎糸球体でろ過された原尿に含まれる蛋白質やイオンの大部分は尿細管で再吸収される。近位尿細管での糖、アミノ酸、リンなどの再吸収の破綻は、Fanconi 症候群を来す。近年では腎機能障害と尿細管でのエンドサイトーシス機能が密接に関連することが指摘されている(Nat Med. 2018, 24(11):1721-1731)が、尿細管再吸収を制御する分子メカニズムの全貌は明らかではない。核内受容体型転写因子のスーパーファミリーに属する HNF4 は主に肝臓や膵臓に発現しており、糖新生や脂質代謝、膵臓でのインスリン分泌を制御している(Nature 2013, 495(7441):394-8)。HNF4 をコードする HNF4A の遺伝子変異は常染色体優性遺伝疾患である若年発症成人型糖尿病 1 (MODY1) (Nature, 1996, 384(6608):458-60)および新生児期の高インスリン性低血糖や巨人症(Plos Med, 2007, 4(4):e118)を呈する。

興味深いことに HNF4 は腎臓では近位尿細管特異的に発現しているが、多くの HNF4A 変異患者では腎臓に異常をきたさない。しかし、HNF4A R76W(R63W, R85W と表記されることもある)ヘテロ変異患者では Fanconi 症候群を合併することが報告されている(J Clin Endocrinol Metab, 2012, 7(10):E2026-30, J Med Genet, 2014, 51(3):165-9)。R76W 変異でなぜ特徴的な腎尿細管再吸収障害が生じるのかは不明である。

Hnf4a ノックアウトマウスでは近位尿細管の発生異常により Fanconi 症候群の表現型を呈し、また尿細管での再吸収に関する遺伝子の発現が低下する(JCI Insight, 2018, 3(14):e97497)。このため HNF4 が尿細管の発生や尿細管での再吸収に深くかかわっていることは明らかである。しかし、ヒトでは転写因子としての機能喪失が明らかな HNF4A の他の変異ではこの病態を呈さないことから、単純な機能喪失とは異なる作用(ドミナントネガティブ作用など)を想定する必要がある。一方で R76W 変異は DNA 結合領域に近接しており、DNA 親和性を減少させることが予測されるが、R76W 変異以外の HNF4A 変異も DNA 親和性を低下させるため(Nature, 2013, 495(7441):394-8)、R76W 変異の特異性は説明できない。

「どのような転写調節ネットワークが尿細管機能、特にエンドサイトーシス機能に関与するのか」が学術的な問いである。R76W 変異の下流を明らかにすることは、これまでに知られていない尿細管機能制御メカニズムの解明に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では HNF4A R76W の下流を明らかにすることにより、尿細管再吸収に関与する分子のネットワークを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) R76W の下流候補因子の探索

既存のデータベースを利用し、HNF4 α の下流分子を探索する。腎臓由来の培養細胞(HEK293 細胞)にそれらのプロモーターを発現させ、ルシフェラーゼアッセイを行う。この方法では HNF4 α による直接の影響を検討することが可能である。HNF4 α により直接転写が制御されるかどうか、また R76W 変異によりその転写が抑制されるかどうか検討し、関係するプロモーター領域を明らかにする。

(2) 候補分子を介したエンドサイトーシスのメカニズムの検討

同定された候補因子がエンドサイトーシスに関与する膜受容体と直接あるいは間接的な相互作用の可能性について検討する。X と既知の尿細管エンドサイトーシス関連分子の結合を免疫沈降で検討する。X を過剰発現させ共沈する分子を網羅的に質量分析で同定する。細胞生物学的研究およびプロテオーム解析については申請者がこれまでに行った方法を使用する(J Cell Sci. 2020, 32482797, Sci Rep. 2018, 29402915)。X 等の候補分子の細胞内ネットワークからエンドサイトーシスの新たなメカニズムを明らかにする。

(3) 候補遺伝子のノックアウトマウスの解析

有力な候補遺伝子についてはノックアウトマウスの表現型解析を行う。

4. 研究成果

(1) R76W の下流候補因子の探索

HNF4 α のターゲットを探索するために、HepG2 細胞を用いた ChIP-seq、siRNA によるノックダウンを行ったマイクロアレイのデータや、抗 HNF4 α 抗体を用いた腎臓の ChIP-seq のデータから遺伝子を抽出した。これらの候補遺伝子についてルシフェラーゼアッセイシステムを確立し、HNF4A により転写活性が制御されるかどうか、また R76W 変異がその転写を抑制するかどうかを検討した。その結果、HNF4A により転写が制御され、R76W

変異によりそれが阻害される分子を複数同定した。その中に新規遺伝子 X が含まれていた。X は腎臓、特に近位尿細管刷子縁に発現するが、これまでにその機能はほとんど分かっていない分子であった。

(2) 候補分子を介したエンドサイトーシスのメカニズムの検討

近位尿細管の頂端面（刷子縁）では Cubilin や Amnionless からなる膜複合体(CUBAM)と Megalin という受容体が存在し、原尿中の蛋白質を尿細管に取り込んでいる。これまでに CUBAM 複合体を培養細胞に発現させたエンドサイトーシスの細胞モデルの作成に成功した(Sci Rep 2018, 8(1):2351)(J Cell Sci 2020, 133(13):jcs242859)。このシステムを利用し、X がこれらのシステムと関連しているかを検討した。その結果 X は生化学的には既知のエンドサイトーシス複合体との直接の関連を見出すことはできなかった。

(3) 候補遺伝子 X ノックアウトマウスの解析

機能が不明な X についてノックアウトマウスを作成し解析した。ヘテロノックアウトマウスは表現型がなかった。ホモノックアウトマウスはマウスの生存には違いが見られなかったが、特徴的な尿細管機能異常を呈することが明らかになった。腎組織の RNA-seq や腎組織染色を行い、尿細管におけるエンドサイトーシスに関連する幾つかの分子の発現が変動していた。これらの結果は HNF4A の下流因子として X を同定し、X が腎臓において重要な機能を有すること、さらにそのメカニズムを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Takizawa Keiichi, Ueda Koji, Sekiguchi Masahiro, Nakano Eiji, Nishimura Tatsuya, Kajiho Yuko, Kanda Shoichiro, Miura Kenichiro, Hattori Motoshi, Hashimoto Junya, Hamasaki Yuko, Hisano Masataka, Omori Tae, Okamoto Takayuki, Kitayama Hirotsugu, Fujita Naoya, Kuramochi Hiromi, Ichiki Takanori, Oka Akira, Harita Yutaka	4. 巻 25
2. 論文標題 Urinary extracellular vesicles signature for diagnosis of kidney disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105416 ~ 105416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.105416	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 Okada Akira, Ikeda Kurakawa Kayo, Harita Yutaka, Shimizu Akira, Yamaguchi Satoko, Aso Shotaro, Ono Sachiko, Hashimoto Yohei, Kumazawa Ryosuke, Michihata Nobuaki, Jo Taisuke, Matsui Hiroki, Fushimi Kiyohide, Nangaku Masaomi, Yamauchi Toshimasa, Yasunaga Hideo, Kadowaki Takashi	4. 巻 23
2. 論文標題 Comparison of bleeding complications after pediatric kidney biopsy between intravenous sedation and general anesthesia: a nationwide cohort study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Pediatrics	6. 最初と最後の頁 33-33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12887-022-03828-8	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 Nakamura Misako, Kanda Shoichiro, Kajiho Yuko, Hinata Munetoshi, Tomonaga Kotaro, Fujishiro Jun, Harita Yutaka	4. 巻 12
2. 論文標題 A case of right hypodysplastic kidney and ectopic ureter associated with bicornuate uterus in a prepubertal girl	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 CEN Case Reports	6. 最初と最後の頁 122 ~ 129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13730-022-00730-1	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 Miura Kenichiro, Kaneko Naoto, Hashimoto Taeko, Ishizuka Kiyonobu, Shirai Yoko, Hisano Masataka, Chikamoto Hiroko, Akioka Yuko, Kanda Shoichiro, Harita Yutaka, Yamamoto Toshiyuki, Hattori Motoshi	4. 巻 38
2. 論文標題 Precise clinicopathologic findings for application of genetic testing in pediatric kidney transplant recipients with focal segmental glomerulosclerosis/steroid-resistant nephrotic syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatric Nephrology	6. 最初と最後の頁 417 ~ 429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00467-022-05604-3	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 Shirai Yoko, Miura Kenichiro, Kaneko Naoto, Ishizuka Kiyonobu, Endo Amane, Hashimoto Taeko, Kanda Shoichiro, Harita Yutaka, Hattori Motoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 A novel de novo truncating TRIM8 variant associated with childhood-onset focal segmental glomerulosclerosis without epileptic encephalopathy: a case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Nephrology	6. 最初と最後の頁 417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12882-021-02626-1	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 Toyohara Miwako, Kajiho Yuko, Toyofuku Etsushi, Takahashi Chie, Owada Keiho, Kanda Shoichiro, Harita Yutaka, Ohnishi Hidenori, Wada Taizo, Imai Kohsuke, Kanegane Hirokazu, Morio Tomohiro, Oka Akira	4. 巻 9
2. 論文標題 An infant with X linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency presenting with Pneumocystis pneumonia: A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Case Reports	6. 最初と最後の頁 e05093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ccr3.5093	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 Ishizuka Kiyonobu, Miura Kenichiro, Hashimoto Taeko, Kaneko Naoto, Harita Yutaka, Yabuuchi Tomoo, Hisano Masataka, Fujinaga Shuichiro, Omori Tae, Yamaguchi Yutaka, Hattori Motoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Degree of foot process effacement in patients with genetic focal segmental glomerulosclerosis: a single-center analysis and review of the literature	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-91520-9	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 Nakamura Misako, Kanda Shoichiro, Kajiho Yuko, Morisada Naoya, Iijima Kazumoto, Harita Yutaka	4. 巻 10
2. 論文標題 A case of 17q12 deletion syndrome that presented antenatally with markedly enlarged kidneys and clinically mimicked autosomal recessive polycystic kidney disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 CEN Case Reports	6. 最初と最後の頁 543 ~ 548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13730-021-00604-y	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 Ando Taro, Miura Kenichiro, Yabuuchi Tomoo, Shirai Yoko, Ishizuka Kiyonobu, Kanda Shoichiro, Harita Yutaka, Hirasawa Kyoko, Hamada Riku, Ishikura Kenji, Inoue Eisuke, Hattori Motoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Long-term kidney function of Lowe syndrome: A nationwide study of pediatric and adult patients	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/gfae080	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 Hirano Yoko, Kanda Shoichiro, Hidaka Moe, Kato Motohiro, Nishikawa Masako, Yatomi Yutaka, Tanaka Hiroyuki, Kinumaki Akiko, Kajiho Yuko, Harita Yutaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Post-renal Biopsy Retroperitoneal Haematoma Accompanied by Decreased Coagulation Factor XIII Levels in Immunoglobulin A Nephropathy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cureus	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) 10.7759/cureus.54026	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 Takizawa Keiichi, Nishimura Tatsuya, Harita Yutaka	4. 巻 4
2. 論文標題 Enzyme-linked immunosorbent assay to detect surface marker proteins of extracellular vesicles purified from human urine	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 102415 ~ 102415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2023.102415	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 Harita Yutaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Urinary extracellular vesicles in childhood kidney diseases	5. 発行年 2023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/s00467-023-06243-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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 長澤 武、滝澤 ひろみ、滝澤 慶一、梶保 祐子、神田 祥一郎、張田 豊
2. 発表標題 HNF4 による変異特異的尿細管機能制御機構の解明
3. 学会等名 第30回発達腎研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 張田豊
2. 発表標題 遺伝性腎疾患研究最前線:国内で行われている最先端の研究に触れる ネフロン全体から見た蛋白尿発症の分子メカニズム
3. 学会等名 日本腎臓学会学術集会
4. 発表年 2021年~2022年

1. 発表者名 Takeshi Nagasawa, Hiromi Takizawa, Keiichi Takizawa Yuko Kajiho, Shoichiro Kanda, Motohiro Kato, Yutaka Harita
2. 発表標題 Establishment of a novel mouse model of renal Fanconi syndrome
3. 学会等名 The 18th Congress of Asian Society for Pediatric Research (国際学会)
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
研究 分担 者	神田 祥一郎 (Kanda Shoichiro) (60632651)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	

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