

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16223

研究課題名（和文）糖尿病性腎臓病における糸球体病変形成機序解明を目指した細胞連関の解析

研究課題名（英文）Mechanism elucidation of diabetic kidney glomerular lesion based on single-cell RNA sequence.

研究代表者

藤本 大介 (Fujimoto, Daisuke)

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・助教

研究者番号：00896649

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究計画で、糖尿病腎(DKD)糸球体のシングルセルデータを構築し、DKD病態進展に關与する遺伝子の探索や細胞同士の相互連関の解明、及び新規治療法の開発を目標としていた。まず質の高いデータを得るためのプロトコル確立及びシングルセル解析の遂行を行い、得られたデータベースを基にDKD病態特異的な変動を示す遺伝子候補を見出した。次にそれら3遺伝子の遺伝子改変動物の作製に着手し、現在2種の遺伝子について系統樹立及び繁殖に成功した。腎症フェノタイプなどのデータ蓄積を目指し病態の解析を行うとともに、標的遺伝子に対する阻害薬/活性化薬を用いた薬物学的介入も並行して進め、臨床における治療応用を目指していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性腎臓病(DKD)は、末期腎不全に至る原因疾患として最多であり、根本的な治療法にも乏しいのが実情である。本研究はシングルセル解析により糸球体構成細胞種毎の解析が可能となり、病変形成に關与する遺伝子・パスウェイの探索及びそれらを標的としたDKD新規治療法の開発へ向けて大きな足がかりとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aims to elucidate the mechanisms of diabetic kidney disease (DKD) based on glomerular single-cell RNA sequencing database. Our original single-cell protocol enabled us to explore several candidate genes which may be involved in DKD pathogenesis. We created genetically modified animals and evaluated the renal phenotype, which could lead to the development of novel therapeutic strategy against DKD.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：糖尿病性腎臓病 糸球体 シングルセル解析 細胞連関

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎臓病 (DKD)は本邦において透析導入の原因腎疾患として最多であり、本疾患の発症・進展抑制は重要かつ喫緊の課題である。申請者はこれまで、DKD の糸球体病変、特にメサンギウム病変とポドサイト傷害の進展機序に着目して検討を行ってきた。DKD 進展の重要な臨床症候の一つとして多量の蛋白尿が挙げられるが、これにはポドサイト傷害が必須である (Mori KP et al. *JASN* 2017)。また、DKD にはメサンギウム細胞及び基質の病変 (メサンギウム増殖、Kimmelstiel-Wilson 結節)も特徴的な所見としてほぼ必発である。この両細胞の病変の進行に関しては、両細胞間の連関 (クロストーク)の存在がこれまでの single-nucleus RNA sequence 解析などで示唆されている (Wilson PC et al. *PNAS* 2019)が、病態進展に及ぼす影響の詳細なメカニズムについては十分に解明されていない。申請者らは、この両細胞間のクロストークが、ポドサイト傷害進展に及ぼす影響を、ER ストレスの観点から解明を試みた。ER ストレスに着目した理由としては、糖尿病モデルマウスの糸球体より抽出した cDNA の microarray データを用いたクラスター解析の結果、健常モデルに比して ER ストレス関連遺伝子の動きが認められ、その関与が考えられたからである。我々のこれまでの検討で、高糖濃度に暴露されたメサンギウム細胞とのクロストークにより、ポドサイトの正常な ER ストレス応答 (特に ERAD 機能)が阻害されることが示唆された。またポドサイト傷害の機序として、ポドサイト間のスリット膜の重要な構成分子であり、その機能維持に重要とされるネフリンへの影響が考えられた。すなわち、ネフリンはそのチロシン残基の適切なリン酸化により正常な機能が維持されるとされているが (New LA et al. *JASN* 2016)、本細胞間クロストークはこのネフリンのリン酸化を抑制することを明らかにした (Fujimoto D, *FASEB J* 2020)。

このような糸球体内での細胞間の連関が DKD 進展に関与する可能性及びその機序の詳細を探索するために、近年技術的進歩の著しいシングルセル解析 (scRNA-seq)を用いることを考慮した。本解析は上述のようなメサンギウム細胞-ポドサイト間の連関のみならず、DKD 糸球体病変形成に関与する因子や、治療標的となり得る遺伝子・パスウェイの探索にも有用である可能性があると考えられた。DKD は慢性経過で経時的に進行する疾患であり、技術的な困難が想定されたが、胎児腎での豊富な実績を有する本学発生医学研究所腎臓発生分野の協力も得ることで技術的困難を克服することが可能となった。

2. 研究の目的

本研究の目的は前述の通り、DKD の糸球体病変、特に糸球体内細胞連関機序の解明及び病態進展抑制のための治療方法の開発である。糖尿病治療はこの数十年で目覚ましい進歩を遂げ、腎症に対する治療法についてもレニン・アンジオテンシン系の抑制を含めた従来の治療に加え、SGLT2 阻害薬を筆頭に新たな段階へと展開している。しかしながら、DKD から末期腎不全に至る残存リスクは依然として大きな課題である。本研究では、DKD、中でも顕性蛋白尿を呈する病態進展に重要なポドサイトやメサンギウム細胞傷害機序の一端を明らかにすることで、新しい治療標的を提案できる可能性がある。本研究では、十分な予備検討により、これまでは技術的に質の高いサンプリングが困難とされてきた、週齢を重ねた糸球体傷害の強い DKD モデルでシングルセル解析が可能な水準に到達できていることは特徴かつ重要な点である。

3. 研究の方法

・糖尿病腎糸球体のシングルセル解析データを用いた病態進展機序の解明

我々は、胎児腎のシングルセル解析において豊富な経験と高い技術を有している本学発生医学研究所腎臓発生分野と共同で、種々の条件検討を行い、一般に困難とされてきた糸球体傷害の進行した糖尿病腎を用いた質の高いシングルセル RNA-seq データベースを得ることに成功した(図 1)。本データベースを用いて、糖尿病による糸球体障害の進展に重要な役割を果たす可能性のある候

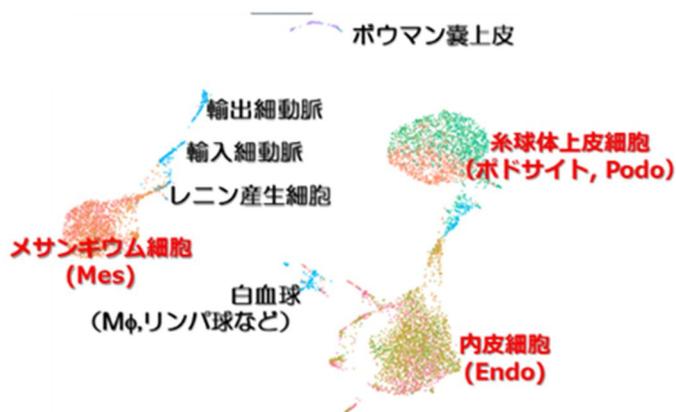


図 1. 20 週齢糖尿病マウス糸球体を用いた scRNA-seq による UMAP plot
データ処理過程において、確立したプロトコールにより、20 週齢においても死細胞含めた非特異的シグナルを最小限とした解析が可能であることが確認できた。

補遺伝子を複数見出すことが出来た。具体的な遺伝子名については研究途上でもあるため伏せるが、疾患特異的かつ細胞種特異的な遺伝子変動を示しているものであった。これらの遺伝子について、DKD マウス腎組織切片を用いて高感度 *in situ* hybridization (ISH)を行い、その発現時期や細胞種を評価することとした。

また前述の候補遺伝子について、遺伝子改変動物を作製し、病態へ与える影響を評価することを試みた。具体的には、多量の蛋白尿を呈するなどヒト糖尿病性腎臓病に類似したフェノタイプを示す脂肪萎縮性糖尿病モデルマウス(A-ZIP/F1)をベースとして、CRISPR/Cas9 の手法を用いて3系統の遺伝子ノックアウトマウスを作製することとした。

・病態への関与が想定されるターゲット因子・経路への介入方法の模索

標的遺伝子が病態に果たす役割を検討するために遺伝子改変マウスのフェノタイプの評価を行うことを検討したが、マウスの確立には時間を要するため、遺伝子機能の活性化薬や阻害薬を用いた *in vitro* 実験も同時に進めていく方針とした。

4. 研究成果

本研究計画において、DKD 糸球体の質の高いシングルセルデータベースを構築し、それを用いてDKD 病態進展に関与する遺伝子の

探索や、細胞同士の相互連関の解明、及び将来的にそれらをターゲットとした新規治療法の開発などを目標としていた。研究初年度においては質の高いデータを得るためのプロトコル確立及びシングルセル解析の遂行を主として行った。最終年度においては、得られたデータベースを基にDKD 病態特異的な変動を示す遺伝子候補を複数見出し、DKD 腎組織を用いた発現評価 (*in situ* hybridization 図2)を行うとともに、それらの遺伝子が腎症に及ぼす影響を評価するために遺伝子改変動物の作製を試みた。具体的な遺伝子名については伏せるが、CrisperCas9 の手法を用いて着目遺伝子3種についてそれぞれノックアウトマウスを作製しており、現在そのうち2種については系統樹立及び繁殖に成功している。現在野生型個体とノックアウト個体において、糖尿病状態での腎症のフェノタイプについて継続的に観察している段階であり、アルブミン尿の程度などで、一部個体に両群で差が見られる結果が得られつつある。今後も残り1つの遺伝子改変動物の樹立を目指すとともに、各系統の腎症に関するデータを蓄積していくことを継続する。

また、標的遺伝子に対する阻害薬や賦活化薬、遺伝子産物の投与実験などの薬物学的介入を行うことで腎症への影響を評価し、将来的に臨床における治療応用を目指す。ポドサイトセルライン (MPC5)などを用いた *in vitro* 実験を進めており、これらの知見を踏まえて次年度以降の新しい計画へと活かしていく。

正常コントロール

糖尿病 (A-ZIP/F1)

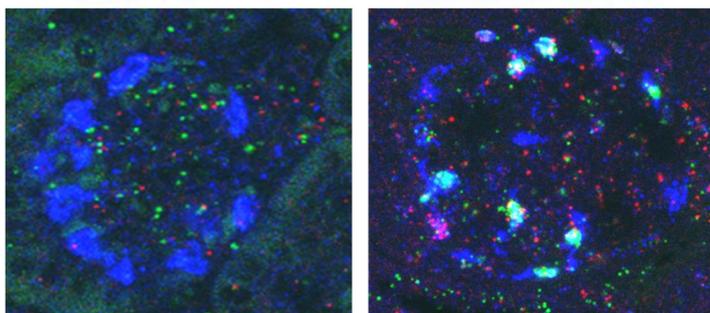


図2. 糖尿病マウス糸球体の高感度 *in situ* hybridization

一例として解糖系に関連する酵素遺伝子 X の発現を評価した。糖尿病糸球体でポドサイトに一致して X (白色で表示) の発現が亢進している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 0件）

1. 著者名 Hata Yusuke, Date Ryosuke, Fujimoto Daisuke, Ikeda Hanako Ohashi, Umemoto Shuro, Kanki Tomoko, Nishiguchi Yoshihiko, Mizumoto Teruhiko, Hayata Manabu, Kakizoe Yutaka, Izumi Yuichiro, Kakizuka Akira, Mukoyama Masashi, Kuwabara Takashige	4. 巻 322
2. 論文標題 A novel VCP modulator KUS121 exerts renoprotective effects in ischemia-reperfusion injury with retaining ATP and restoring ERAD-processing capacity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 F577 ~ F586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajprenal.00392.2021	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 Nishiguchi Yoshihiko, Hata Yusuke, Date Ryosuke, Fujimoto Daisuke, Umemoto Shuro, Kanki Tomoko, Yokoi Hideki, Mori Keita P, Handa Takaya, Watanabe-Takano Haruko, Kanai Yugo, Yasoda Akihiro, Izumi Yuichiro, Kakizoe Yutaka, Mochizuki Naoki, Mukoyama Masashi, Kuwabara Takashige	4. 巻 37
2. 論文標題 Osteocrin, a bone-derived humoral factor, exerts a renoprotective role in ischemia?reperfusion injury in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nephrology Dialysis Transplantation	6. 最初と最後の頁 444 ~ 453
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 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 Fujimoto Daisuke, Kuwabara Takashige, Mukoyama Masashi	4. 巻 46
2. 論文標題 Need to continue or discontinue RAS inhibitors as CKD stage advances? Any alternative?	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 2048 ~ 2050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-023-01318-7	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤本大介	
2. 発表標題 エクソソーム介在性糸球体内細胞間クロストークを標的とした新たな糖尿病性腎臓病治療薬の探索	
3. 学会等名 第45回日本高血圧学会学術総会	
4. 発表年 2023年	

1. 発表者名 Fujimoto Daisuke
2. 発表標題 Novel drug screening strategy to explore exosome-targeted intervention of intraglomerular crosstalk for diabetic kidney disease
3. 学会等名 ASN KidneyWeek 2023 (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
---------------------------	-----------------------	----

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