

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20908

研究課題名（和文）血栓性微小血管症の病因診断の試みー腎生検組織の空間的トランスクリプトーム解析ー

研究課題名（英文）Spatial transcriptomic analysis of renal biopsy specimens from patients with thrombotic microangiopathy

研究代表者

岩崎 沙理（Iwasaki, Sari）

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：60455631

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、様々な病因で発症する血栓性微小血管症（TMA）の症例について、腎生検組織を用いて、空間的トランスクリプトーム解析を行った。

まず、予備実験用に11検体を抽出した。腎生検組織を載せた専用スライドを蛍光染色し、糸球体を関心領域として設定した。関心領域ごとに得られた遺伝子発現データについて、品質確認、正規化し、2群に分けてクラスター解析等を行い、解析可能なことを確認した。次に、病理学的TMAのうち 造血幹細胞移植後TMA、薬剤性TMA、膠原病関連TMA、陰性コントロールを2-3例ずつ抽出し、GeoMxの検討を行った。得られた遺伝子発現データについて、解析を行っている最中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、様々な病因で発症する血栓性微小血管症（thrombotic microangiopathy: TMA）の症例について、腎生検組織を用いて、空間的transcriptome解析を行った。予備実験では、IgA腎症と非IgA腎症群とで、遺伝子発現profileに差異があることが見出され、異なるパスウェイが関与していることがわかった。現在、TMA症例についても同様の解析を進めている。本研究により、もし背景疾患によって、TMA組織の内皮細胞における遺伝子発現profileに差異が見出されるとすると、特異的な診断法や治療法の開発に大きく役立つことが期待されている。

研究成果の概要（英文）：We performed spatial transcriptome analysis on renal biopsy tissue from cases of thrombotic microangiopathy (TMA) of various etiologies by using GeoMx platform.

First, 11 specimens were selected for preliminary experiments. Special slides with renal biopsy tissues were fluorescently stained, and the glomeruli were set as the regions of interest. Gene expression profiles obtained for each region of interest were quality-checked, normalized, and divided into two groups for cluster analysis, etc., to confirm that the data could be analyzed. Next, 2-3 cases each of (1) post-HSCT TMA, (2) drug-induced TMA, (3) collagen disease-related TMA, and (4) negative control among pathological TMA were selected for GeoMx. The obtained gene expression data are currently being analyzed.

研究分野：Renal pathology

キーワード：血栓性微小血管症 空間的トランスクリプトーム 腎生検

1. 研究開始当初の背景

血栓性微小血管症 (thrombotic microangiopathy: TMA) は、細血管障害性溶血性貧血、消費性血小板減少、細血管内血小板血栓を 3 主徴とする疾患群の総称である。原発性 TMA として血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic thrombocytopenic purpura: TTP) や、溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome: HUS) が知られている。補体経路障害に伴う非典型的溶血性尿毒症症候群 (atypical HUS) に加えて、COVID-19 を含む様々な感染症、自己免疫性疾患 (全身性エリテマトーデス、抗リン脂質抗体症候群)、悪性腫瘍、薬剤 (VEGF 阻害剤、抗がん剤など)、妊娠、造血幹細胞移植に伴って発症する二次性 TMA が知られる。高齢化や悪性腫瘍患者の増加に伴って TMA の増加が認められる (Clin J Am Soc Nephrol. 2018)。

TMA 症例の腎組織では、糸球体を主体とする内皮細胞の腫大、基底膜からの剥離、内皮下の浸出液貯留を特徴とする組織像を認める。免疫複合体など沈着物は乏しく、また、必ずしも血栓形成を伴わない (図 1)。この病理学的 TMA は、臨床的な TMA 以外の症例でも認められ、原因や鑑別疾患が多岐に渡り、臨床的に既知の要因を検索しても特定に至らない症例も多い。悪性腫瘍や化学療法、感染など複数の要因が考慮される場合に、どの要因が病態の主体をなすのか診断に苦慮することも多い。その治療として血漿交換、新鮮凍結血漿の輸注、ステロイドや補体阻害薬であるエクリズマブ投与が行われるが、対症療法が中心で十分な治療効果が得られずに死亡に至る症例も多く経験され、病理学的 TMA に対する新規の特異的な治療法の開発が強く望まれている。

これまで腎病理では、蛍光抗体法を用いた免疫グロブリンや補体沈着の有無、電子顕微鏡を用いた沈着物の超微構造、質量分析による沈着分子の同定、により疾患を分類してきた。しかしながら、これらの手法は、病理学的 TMA など沈着物を伴わない病変の分類には有用とは言えない。一方で、最新技術である組織切片を用いた空間的 transcriptome 解析では、内皮細胞のみならず、それを取り巻く微小環境に存在する炎症細胞なども含めて、位置情報を保持した網羅的な遺伝子発現を評価可能となる。

近年、腎組織においてもシングルセル遺伝子発現解析による成果が著しい。例えば、腎臓の血管内皮細胞は、高い濾過圧にさらされる糸球体、糸球体前後の輸出入細動脈、傍尿細管毛細血管、上行・下降直血管(vasa recta)との間で、遺伝子発現パターンが異なり、内皮細胞を部位別に区別できることが示されている (Nature Com. 2019)。また、加齢に伴って腎で増加する慢性炎症では、CD4 陽性 T 細胞の minor population が、特定の B 細胞の活性化を通じて腎組織を荒廃させることが報告され、個々の微小な細胞集団に焦点を当てた研究の重要性が腎臓研究者の間でますます認識されている (J Clin Invest. 2022)。

腎臓での空間的 transcriptome 解析による新知見も少数報告されてきている。TMA と同様に沈着物を伴わない糸球体病変である collapsing glomerulopathy では、原因を HIV か SARS-CoV2 かを区別できたのみならず、同一生検組織内でも糸球体ごとに遺伝子発現パターンが異なっていることが示された (Kidney Int 2021)。

以上のような研究動向を踏まえ、これまでの手法ではアプローチが難しかった内皮細胞傷害性疾患においても、単細胞レベルの変化を空間的に把握することで、病因に応じた特徴を捉えられる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

様々な病態から発症する病理学的 TMA を、病因により切り分けて診断する方法を確立できないか、あるいは、診断や治療のターゲットとなる標的分子/経路を見出すことはできないか、より選択的な治療を行い、治療成績の向上につなげることはできないか、ということが本研究の核心をなす学術的な「問い」である。

本研究では、病理学的 TMA の診断に至ったヒト腎生検組織を用いて、空間的 transcriptome 解析を行い、そのデータ解析をもとに個々の糸球体病変や血管病変に応じた病因診断が可能であるかを検証することを目的とする。本研究の成果は遺伝子発現パターンからの病理学的 TMA の新規分類といった診断病理学に貢献するのみならず、分子機構の解明や治療のターゲットとなる標的分子と経路の解明や、病理学的 TMA の新しい予防法や治療法の開発にも貢献する。

3. 研究の方法

1) ヒト腎生検組織ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、GeoMx Digital Spatial Profiler (NanoString 社) をプラットフォームとする空間的 transcriptome 解析を行うための予備実験を行った。固定条件等の異なる腎生検症例 (IgA 腎症等) を 11 例抽出し、専用の positive charges slide にパラフィン切片を接着させた。スライドを 4 種の蛍光抗体で染色し、技術者とミーティングの上、糸球体病変を中心として、直径 500 μ m 程度の関心領域を設定した。関心領域ごとに得られた遺伝子発現データについて、品質の確認、正規化を行った。IgA 腎症と非 IgA 腎症の 2 群に分けてクラスター解析やパスウェイ解析を行った。この方法で、十分な検討がで

きることを確認した。

2) 本実験として、病理学的 TMA のうち比較的急性期の内皮細胞傷害像を示す 造血幹細胞移植後 TMA、薬剤性 TMA(抗 VEGF 阻害剤)、膠原病関連 TMA(抗リン脂質抗体症候群) コントロール の 4 群について、それぞれ 3 例ずつ抽出した。全 12 例のパラフィン切片を予備実験と同様の方法で準備し、GeoMx へと持ち込んだ。関心領域として糸球体病変を選択し、遺伝子発現データと取得した。現在、それらを解析中である。

4. 研究成果

1) 予備実験における研究成果

市立札幌病院の腎病理データベースを用いて、IgA 腎症、他の腎炎を計 11 例抽出した。

腎組織 FFPE 切片を 1 枚の専用スライドに貼付し、GeoMx による空間的トランスクリプトーム解析を施行した。

健常者腎組織から同様の方法で回収されたトランスクリプトームの公開データ (Human Kidney Atlas) を加えて、解析を行った。

Raw count data の box plot では、半数以上のカウント数が最低値のサンプルを検討から除外した。PCA 解析においては、正常コントロールと、腎炎組織とで分布が分かれた。

IgA 腎症と健常者との比較

KEGG では protein digestion and absorption が活性化し、ER でのたんぱく質合成が抑制されていた。

G0(BP)解析ではB細胞性免疫や古典的経路の補体活性化経路が上昇し、HSR(Heat Shock Protein) や PTG2 に関連する刺激への反応の経路が抑制されていた。

G0(MF)解析では免疫グロブリン結合が活性化して HSP 関連のたんぱく質の折り畳みや酸素の結合が抑制されていた。

IgA 腎症と非 IgA 腎症との比較

KEGG では PI3K-Akt や protein digestion and absorption などの COL1A1, COL6A1 に関連する経路が有意に活性化し、vascular smooth muscle construction の経路が抑制されていた。

G0 解析(BP)では金属イオンへの反応や血管内皮細胞の増殖に関係する MT1G をキー遺伝子とした経路が抑制されていた。

先行研究との比較

Al Mehedi Hasan らが重要と指摘した遺伝子 5 つのうち、DUSP1 が本研究でも有意であった。

DUSP1 は、MAP キナーゼの脱リン酸化酵素をエンコードしており環境ストレスへの反応や細胞増殖抑制に関係する。

で protein digestion and absorption 経路が活性化しており、で protein synthesis / folding 経路が低下していたことから、炎症に伴う蛋白の分解吸収促進、合成が減少している状態が推測される。HSPA1B、HSP90AA1、HSPA1A はその中心的な遺伝子であり IgA 腎症における蛋白発現調整に寄与することが推測される。

ともに免疫複合体の形成、結合に関する経路が有意となっており、IgA 腎症に特徴的なメサンギウム領域への IgA 免疫複合体の沈着に一致する現象として理解される。

の Volcano plot で抽出された COL1A1 は、の KEGG 解析で抽出された COL6A1 と共に protein digestion and absorption, PI3-Akt signaling pathway, ECM-related interaction 経路に関連しており、メサンギウム基質増加に関連する重要遺伝子の可能性がある。

DCN や ABI3BP は細胞外基質の増大にかかわり、IgA 腎症で、ほかの腎症に対して特に発現が多かったため IgA 腎症の糸球体病変に特徴的な遺伝子である可能性がある。

DUSP1 は環境ストレス反応や細胞増殖抑制に関連する遺伝子で、先行研究と一致した遺伝子変化が確認され、IgA 腎症糸球体病変の重要遺伝子である可能性がある。

2) 本実験における研究成果

病理学的 TMA と病理学的に診断された症例のうち、造血幹細胞移植後 TMA、薬剤性 TMA(VEGF 阻害剤)、膠原病関連 TMA(抗リン脂質抗体症候群関連腎症)、陰性コントロール について、臨床的、病理学的なデータが揃った典型例を 3 例ずつ抽出した。それぞれの腎組織を専用スライドに貼付し、予備実験と同様の手法で GeoMx の検討を行った。得られた遺伝子発現データについて、現在解析を行っている最中である。

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 0件）

1. 著者名 Yuka Maya 1, Yasuyuki Fujita 1, Kodai Miyamoto 1, Machiko Nishimura 2, Sari Iwasaki 3, Satoko Shimizu 1	4. 巻 20(3)
2. 論文標題 Pseudoangiomatous stromal hyperplasia (PASH) arising in an axillary accessory breast	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Dtsch Dermatol Ges.	6. 最初と最後の頁 354-356
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ddg.14710. Epub 2022 Feb 15.	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2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩崎 沙理
2. 発表標題 腎病理企画：Peritubular capillaritis and Capillaropathy
3. 学会等名 日本腎臓学会東部学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩崎 沙理
2. 発表標題 抗リン脂質抗体症候群腎症の臨床病理学的検討
3. 学会等名 北海道病理談話会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大橋健一、小池淳樹、富田茂樹、原 重雄、岩崎 沙理	4. 発行年 2022年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 436
3. 書名 非腫瘍性疾患病理アトラス 腎	

〔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
---------	---------