

令和元年6月14日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19483

研究課題名(和文)次世代シーケンサー解析によるネフローゼ症候群の新規治療標的分子の探索

研究課題名(英文)Exploration of novel therapeutic targets for nephrotic syndrome by RNA-Seq based differential expression analysis

研究代表者

張 エイ (ZHANG, YING)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：00529472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ネフローゼ症候群に対する新規治療の標的候補分子を探索するため、次世代シーケンサーRNA-Seq法を用いて、ネフローゼ症候群モデルラット糸球体で発現が変化している分子の網羅的解析を行った。発現変化した分子群を用いたGene Ontology (GO)、KEGG pathway生物学的統計法での解析、並びに病態モデルでの発現動態解析により、Rap1 signaling pathway関連分子、Hmgcs2、Lnpep、Ptar1、カルシウムイオン活性化型陽イオンチャネルTRPM4、がネフローゼ症候群に対する新規治療標的候補分子として有望であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛋白尿は、腎糸球体障害を示す臨床所見であるだけでなく、蛋白尿自体が尿細管障害を誘導し、腎不全へと進行させる悪化因子であると考えられている。本研究では、次世代シーケンサーRNA-Seq法を用いて、ネフローゼ症候群モデルにおける糸球体の発現変動分子を網羅的かつ定量的に解析した。更に、生物学的統計解析法、分子生物学手法での解析、病態モデルでの発現動態の解析により新規治療薬開発の標的分子を同定した。本研究により得られた知見は、ネフローゼ症候群に対する新規治療法開発に貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：The development of more effective novel therapeutic is awaited. In this project, to explore novel therapeutic targets for nephrotic syndrome, we analyzed the glomerular gene expressions in the nephrotic syndrome model rats by RNA-Seq with next-generation sequencer. The analysis indicated that Rap1 signaling pathway may participate in maintenance of the barrier function of slit diaphragm. Hmgcs2, Lnpep and Ptar1 were evidently downregulated immediately after nephropathy induction and the decreased expression was maintained when proteinuria peaked. It is also shown that the expression of TRPM4, a Ca²⁺-activated cation channel, was altered in the proteinuric state in PAN nephropathy, a mimic of minimal change nephrotic syndrome. These findings indicate that Rap1 signaling pathway-associated molecules, Hmgcs2, Lnpep, Ptar1, and TRPM4 could be candidates of novel therapeutic targets for nephrotic syndrome.

研究分野：腎分子病態学

キーワード：蛋白尿 ポドサイト スリット膜 次世代シーケンサーRNA-Seq解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高度の蛋白尿を示す病態であるネフローゼ症候群は、腎糸球体上皮細胞（ポドサイト）の足突起間の細胞間接着装置であるスリット膜のバリア機能の障害により発症すると考えられている。スリット膜の構成分子として Nephrin、CD2AP、Podocin、NEPH1、TRPC6 などの分子が同定されてきた。研究代表者のグループは、シナプス関連分子である SV2B、Neurexin などの分子群が糸球体上皮細胞のスリット膜部に発現しており、スリット膜の機能維持に重要な役割を果たしていることを報告してきた。しかしながら、スリット膜の機能維持に関わる分子機構、各種病態での蛋白尿発症機序の詳細は不明で、有効な新規治療法の開発は急務である。RNA-Seq 解析法は、転写された RNA (mRNA) の配列をすべて解読し、それぞれのリード数をそれが由来する遺伝子の発現強度とする手法である。検出能力が高いため、低発現の転写産物まで検出できるため、病態で変動する遺伝子の解析、新規治療法の開発の標的分子の探索に有用な方法である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ネフローゼ症候群の病態モデルを用い、次世代シーケンサー解析による腎糸球体のすべての mRNA 配列の解読と発現量の測定を行い、ネフローゼ症候群の糸球体における発現変動遺伝子を同定し、ネフローゼ症候群に対する新規治療の標的候補分子を決定することである。

3. 研究の方法

- (1) ネフローゼ症候群病態モデルを用い、次世代シーケンサーRNA-Seq 解析法により、ネフローゼ症候群の腎臓糸球体に発現するすべての mRNA (トランスクリプトーム) の配列の解読と発現量の測定を行った。
- (2) 病態誘導直後群に mRNA 発現が 50%以下に低下した分子に着目して、Gene Ontology (GO) と KEGG pathway 生物学的統計法により、これら分子の分子機能とシグナル伝達経路の解析を行った。
- (3) 病態発症時に mRNA 発現の変化が顕著である分子群の糸球体での局在、ネフローゼ症候群病態モデルでの発現動態の解析を行った。

4. 研究成果

(1) スリット膜特異的の傷害モデルである抗 Nephrin 抗体誘導腎症ラット (病態誘導直後 1h、蛋白尿のピーク時 Day 5) 糸球体を用いた次世代シーケンサーRNA-Seq 解析を行い、腎症の糸球体における発現変動遺伝子を同定した。正常コントロール群と比較し、病態誘導直後 (1h) に mRNA 発現量が 50%以下に減少した 870 分子、2 倍以上に増加した 880 分子を同定した。蛋白尿ピーク時 (Day 5) では、mRNA 発現量が 50%以下に減少した 601 分子、2 倍以上に増加した 794 分子を同定した。

発現変動分子の比較解析を行い、病態誘導直後 (1h) で mRNA 発現が 50%以下に低下した 870 分子のうち、316 分子の mRNA 発現は蛋白尿のピーク時 (Day 5) においても 50%以下に低下していた。また、1h で発現が 2 倍以上に増加した 880 分子のうち、407 分子は Day 5 でも mRNA 発現が 2 倍以上に増加していた。また、病態誘導初期 (1h) で発現が 50%以下に低下し蛋白尿がピーク時には発現が 2 倍以上増加する 5 分子、病態誘導初期 (1h) で発現が 2 倍以上増加し蛋白尿がピーク時には発現が 50%以下に低下する 2 分子を同定した。(図 1)。

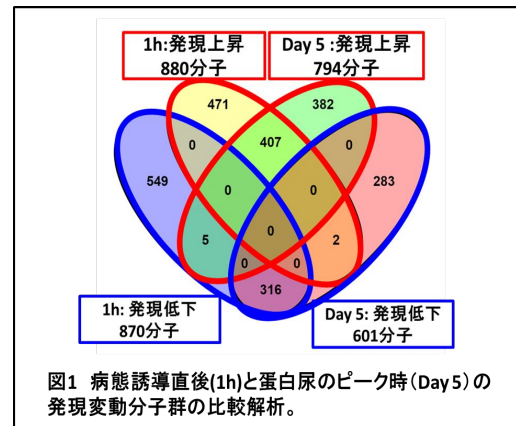
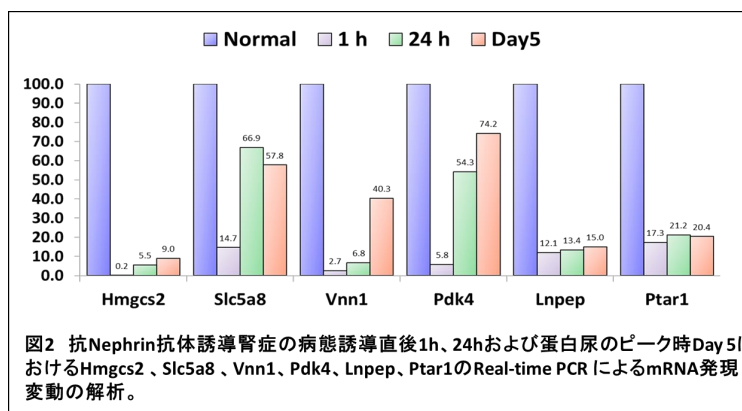


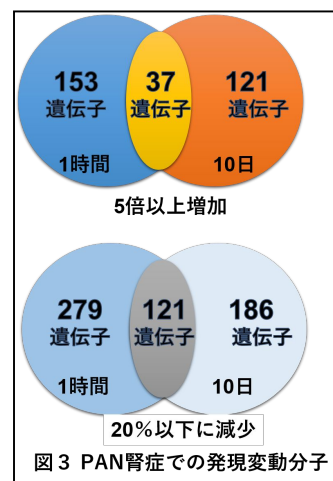
図1 病態誘導直後(1h)と蛋白尿のピーク時(Day5)の発現変動分子群の比較解析。

(2) 蛋白尿発症前の病態誘導直後 (1h) に発現が低下した分子は、蛋白尿発症の initiation event に関与しており、治療標的となる可能性が高いと考えられる。病態誘導直後 (1h) に mRNA 発現が 50%以下に低下した 870 分子に着目し、GO 分子機能 Enrichment 解析及び KEGG Pathway Enrichment 解析を行った。870 分子のうち、163 分子が細胞膜に分類された。これらの細胞膜分子の機能、どのようなシグナル伝達経路に関与しているのかを検討するため、この 163 分子に着目し、GO 分子機能 Enrichment 解析及び KEGG Pathway Enrichment 解析を行った。GO 分子機能 Enrichment 解析で、出現頻度が最も高い分子機能カテゴリーは膜受容体型チロシンキナーゼであった (P-value=2.22E-10, Fold enrichment=18.8)。KEGG Pathway Enrichment 解析では、Rap1 signaling pathway (P-value=1.35E-6, Fold enrichment=5.0) が出現頻度の最も高いパスウェイとして検出された。これらの所見により、Rap1 signaling pathway がスリット膜の機能維持に重要な役割を果たしていると考えられる。Rap1 signaling pathway に関与する分子は新規治療標的候補分子として有用であると考えられる。

(3) - 抗 Nephrin 抗体誘導腎症の病態誘導直後(1h)糸球体において、最も発現が顕著に低下していた Hmgcs2 (ケトン体の合成と分解などの代謝経路に参与する移転酵素)、Slc5a8 (溶質イオン輸送体である膜貫通タンパク質)、Vnn1 (酸化ストレス誘発性アポトーシスを負的に調節する加水分解酵素)、Pdk4 (ピルビン酸脱水素酵素)、Lnpep (アンギオテンシン活性化シグナル伝達経路に参与するアミノペプチダーゼ)、Ptar1 (プレニル基転移酵素)について、ネフローゼ症候群病態モデルでの発現動態の解析を行った。Slc5a8 と Vnn1、Pdk4 は蛋白尿の進展期(24h)とピーク時 (Day 5) で発現が回復する傾向が示されたのに対して、Hmgcs2、Lnpep、Ptar1 の mRNA 発現の低下が維持されていた(図2)。これらの所見により、Hmgcs2、Lnpep、Ptar1 がネフローゼ症候群に対する新規治療標的候補分子として有望であると考えられる。

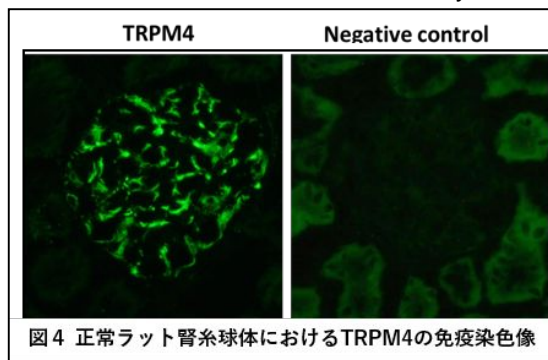


(3) - 抗 Nephrin 抗体誘導腎症での検討とともに、微小変化型ネフローゼ症候群モデルである Puromycin Aminonucleoside (PAN)腎症ラット糸球体材料を用いた次世代シーケンサーRNA-Seq解析を行った。病態誘導直後(1h)に mRNA 発現量が正常コントロールに比べ 20%以下に減少した 400 分子、5 倍以上に増加した 190 分子を同定した。蛋白尿ピーク時 (Day 10)では、mRNA 発現量が 20%以下に減少した 307 分子、5 倍以上に増加した 158 分子を同定した。病態誘導直後(1h)に mRNA 発現が 20%以下に低下した 400 分子のうち、121 分子の mRNA 発現は蛋白尿のピーク時(Day 10)においても 20%以下に低下していた。また、1h で発現が 5 倍以上に増加した 190 分子のうち、37 分子は Day 10 でも mRNA 発現が 5 倍以上に増加していた (図3)。



次いで、PAN 腎症を用いた一連の解析で、遺伝子発現が顕著に低下していることを確認した分子群の中で、カルシウムイオン活性化型陽イオンチャネル TRPM4 に着目し、局在、ネフローゼ症候群病態モデルでの発現動態の解析を行った。TRPM4 は正常腎糸球体において毛細血管に沿った不連続な線状のパターンで観察された (図4)。TRPM4 の糸球体における局在を解析するため、糸球体の各細胞のマーカー(Thy1: メサンギウム細胞、RECA1: 内皮細胞、Podocalyxin: ポドサイト)を用いた二重蛍光染色を行い、糸球体において TRPM4 がポドサイトに限局して発現していることを確認した。

PAN腎症モデルでの発現動態解析を行い、蛋白尿ピーク時においても、TRPM4 の mRNA 発現が明確に低下していること、TRPM4 の染色パターンが変化していることを観察した。これらの観察結果から、TRPM4 の発現変化と局在変化が蛋白尿発症に関与していると考えられた。TRPM4 は蛋白尿の新規治療の有用な標的候補分子であると考えられる。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

1. Fukusumi Y, Zhang Y, Yamagishi R, Oda K, Watanabe T, Matsui K, Kawachi H. Nephrin-Binding Ephrin-B1 at the Slit Diaphragm Controls Podocyte Function through the JNK Pathway. Journal of American Society Nephrology. 29(5) 1462-1474. 2018. (査読有)
2. 河内裕、福住好恭、張瑩 レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系(RAAS)阻害薬 腎と透析 81 巻 p127-131 2016年 (査読無)

〔学会発表〕(計 21 件)

1. 張瑩、他 4 名 キサンチン酸化還元酵素阻害薬トピロキソスタットのポドサイト保護作用 第 61 回日本腎臓学会 朱鷺メッセ/ホテル日航新潟 2018 年 6 月 8 日~10 日 (新潟県、新潟市)
2. 福住好恭、張瑩、他 1 名 スリット膜の新たな機能分子 第 61 回日本腎臓学会 朱鷺メッセ/ホテル日航新潟 2018 年 6 月 8 日~10 日 (新潟県、新潟市)
3. 福住好恭、張瑩、他 2 名 Nephtrin-binding ephrin-B1 at slit diaphragm controls podocyte functions through JNK pathway 第 61 回日本腎臓学会 朱鷺メッセ/ホテル日航新潟 2018 年 6 月 8 日~10 日 (新潟県、新潟市)
4. 安田英紀、張瑩、他 2 名 ポドサイト傷害モデルの糸球体における FKBP12 の発現 第 61 回日本腎臓学会 朱鷺メッセ/ホテル日航新潟 2018 年 6 月 8 日~10 日 (新潟県、新潟市)
5. 高村紗由里、福住、張瑩、他 3 名 Interaction of the Par-complex with Ephrin-B1/Nephtrin plays an essential role in podocyte 第 61 回日本腎臓学会 朱鷺メッセ/ホテル日航新潟 2018 年 6 月 8 日~10 日 (新潟県、新潟市)
6. 福住好恭、張瑩、他 1 名 Ephrin-B1 at slit diaphragm controls podocyte functions through JNK pathway independently of nephrin signaling 第 12 回国際ポドサイトカンファレンス(国際学会)2018 年 5 月 30 日~6 月 2 日 (モントリオール、カナダ)
7. 福住好恭、高村紗由里、張瑩、他 2 名 Identification of cytoplasmic proteins associated with Ephrin-B1 at the slit diaphragm of podocyte: PDZ proteins, Par6, Par3 and NHERF2 are associated with Ephrin-B1 第 51 回米国腎臓学会(国際学会)2018 年 10 月 23 日~28 日 サンディエゴ、アメリカ
8. 安田英紀、福住好恭、張瑩、他 1 名 FK506 binding protein (FKBP12) is highly expressed in glomerular podocyte in kidney: FKBP12 in podocyte is co-localized with actin cytoskeleton and is re-distributed in injured podocytes 第 51 回米国腎臓学会(国際学会)2018 年 10 月 23 日~28 日 サンディエゴ、アメリカ
9. 張瑩、他 2 名 スリット膜特異的障害モデルにおける発現上昇遺伝子の検討:次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析 第 60 回日本腎臓学会 2017 年 5 月 26 日~28 日 仙台国際センター東北大学百周年記念会館 (宮城、仙台)
10. 福住好恭、張瑩、他 1 名 ネフローゼ症候群モデルにおける新規 Ephrin-B1 関連分子 Vangl2 の発現動態の解析 第 60 回日本腎臓学会 2017 年 5 月 26 日~28 日 仙台国際センター東北大学百周年記念会館 (宮城、仙台)
11. 高村紗由里、福住好恭、張瑩、他 2 名 PAN 腎症、ADR 腎症における細胞極性因子 Par3、Par6 beta の発現動態 第 60 回日本腎臓学会 2017 年 5 月 26 日~28 日 仙台国際センター東北大学百周年記念会館 (宮城、仙台)
12. 張瑩、他 2 名 TRPM4 is expressed at the apical surface of podocyte just above slit diaphragm, and its altered expression is involved in podocyte injury 第 50 回米国腎臓学会(国際学会)2017 年 10 月 31 日~11 月 5 日 ニューオーリンズ、アメリカ
13. 福住好恭、張瑩、他 1 名 Vangl2 is associated with ephrin-B1, a novel critical component of the slit diaphragm, and its downregulation is involved in the initiation event of the podocyte injury 第 50 回米国腎臓学会(国際学会)2017 年 10 月 31 日~5 日 ニューオーリンズ、アメリカ
14. 福住好恭、張瑩、他 1 名 Ephrin-B1 bound to nephrin at the slit diaphragm controls podocyte function through JNK pathway independently with nephrin phosphorylation 第 50 回米国腎臓学会(国際学会)2017 年 10 月 31 日~11 月 5 日 ニューオーリンズ、アメリカ
15. 高村紗由里、福住好恭、張瑩、他 2 名 Par6 beta interacted with ephrin-B1 at the slit diaphragm could be a differential diagnostic marker of nephrotic syndrome: Interaction of the Par-complex molecules with ephrin-B1/nephrin in podocyte 第 50 回米国腎臓学会(国際学会)2017 年 10 月 31 日~11 月 5 日 ニューオーリンズ、アメリカ
16. 張瑩、他 2 名 次世代シーケンサー解析による新規ネフリン関連分子、スリット膜機能分子の同定 第 59 回日本腎臓学会 2016 年 6 月 17 日~19 日 パシフィコ横浜(神奈川、横浜)
17. 福住好恭、張瑩、他 2 名 スリット膜の形成、維持における Ephrin-B1 の役割 タモキシフェン誘導ポドサイト特異的 KO マウスを用いた解析 第 59 回日本腎臓学会 2016 年 6 月 17 日~19 日 パシフィコ横浜(神奈川、横浜)
18. 高村紗由里、福住好恭、張瑩、他 2 名 ネフローゼ症候群モデルにおける細胞極性因子 Par3 の発現動態の解析 59 回日本腎臓学会 2016 年 6 月 17 日~19 日 パシフィコ横浜(神奈川、横浜)
19. 張瑩、他 2 名 RNA-Seq based differential expression analysis in rats with slit diaphragm specific dysfunction: the glomerular expression profiles of nephropathy

- induced by anti-nephrin antibody 第 49 回米国腎臓学会 (国際学会) 2016 年 11 月 15 日
~ 20 日 シカゴ、アメリカ
20. 福住好恭、張瑩、他 1 名 Ephrin-B1 interacts with the basal site of the extracellular domain of nephrin in cis and regulates the barrier function and the signal transduction pathway of the slit diaphragm 第 49 回米国腎臓学会 (国際学会) 2016 年 11 月 15 日 ~ 20 日 シカゴ、アメリカ
21. 福住好恭、張瑩、他 2 名 腎系球体上皮細胞スリット膜形成、維持における Ephrin-B1 の役割の解明 第 39 回日本分子生物学会 2016 年 11 月 30 日 ~ 12 月 02 日 パシフィコ横浜 (神奈川、横浜)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.med.niigata-u.ac.jp/nim/welcomej.html>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：河内 裕

ローマ字氏名：KAWACHI Hiroshi

研究協力者氏名：福住 好恭

ローマ字氏名：FUKUSUMI Yoshiyasu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。