

令和 5 年 4 月 24 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08642

研究課題名（和文）機能的CRISPRスクリーニングによるポドサイト恒常性関連遺伝子の網羅的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of podocyte homeostasis-related genes by functional CRISPR screening.

研究代表者

佐々木 隼人（Sasaki, Hayato）

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号：20768048

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000 円

研究成果の概要（和文）：申請者はマウス由来の糸球体上皮細胞（ポドサイト）株が糸球体基底膜の細胞外基質であるラミニン521の刺激により、ポドサイト様に分化し、細胞増殖が低下することを見出した。続いてCas9を発現するマウス由来ポドサイト細胞株に、キナーゼタンパクをコードする遺伝子群を標的にしたgRNAを発現するレンチウイルスライブラリーを導入し、ラミニン521刺激による選択圧をかけた。次世代シーケンシング解析の結果、選択圧によりエンリッチされたgDNAから、ポドサイトのラミニン521刺激応答性に関わる遺伝子群およびシグナル経路が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの国民の健康に重大な影響を及ぼしている慢性腎臓病は腎機能の低下をもたらすポドサイトの障害が決定的な病因である。しかし、現在までに構築されているポドサイトの分子基盤は主に腎症家系の解析から発見された腎症関連遺伝子に基づくものであり、ポドサイト障害の分子機序の全貌は未だ解明されていない。糸球体基底膜の細胞外基質であるラミニン521刺激に対する分化応答性はポドサイトの恒常性に関わる機能であり、本研究成果は糸球体基底膜の細胞外基質異常を原因とするポドサイト障害の分子機序解明の一助となる。

研究成果の概要（英文）：I found that mouse podocyte cell lines differentiate into podocyte-like cells and exhibit reduced cell proliferation in response to stimulation with laminin 521, an extracellular matrix of the glomerular basement membrane. Next, Cas9-expressing mouse podocyte cell lines transduced with sgRNA lentiviral library particles that targeted the genes encoding kinase proteins were exposed to the stimulation with laminin 521. Using next generation sequencing, I identified a group of genes and signaling pathways involved in the response of podocytes to laminin 521 stimulation.

研究分野：遺伝医学

キーワード：ポドサイト 細胞外基質

## 1. 研究開始当初の背景

腎臓の糸球体は循環血液を常に濾過して老廃物や毒素を排出し、体内環境を健康に維持している。糸球体に関わる疾患は濾過機能の低下をもたらす、腎臓は慢性腎臓病(CKD)という病態を経過する。CKDは徐々に濾過機能が低下する病態であり、進行に伴って末期腎不全や心血管疾患のリスクが上昇する。糸球体の濾過機能を担うポドサイトは糸球体の血管を覆い囲む上皮細胞であり、濾過機能の低下をもたらすポドサイトの障害はCKDの進行において決定的な病因である。CKDの原疾患には遺伝疾患が含まれており、ヒトの腎症家系からはポドサイト障害をもたらす遺伝子変異(NPHS2やACTN4等)がいくつも発見された。しかし、ポドサイトの恒常性に関わる分子機序の全貌を解明するためには、従来の遺伝学的手法では限界があった。

## 2. 研究の目的

本研究は、上記の背景からポドサイトの分子基盤を強化することを目的として、ポドサイト細胞株を用いたCRISPRスクリーニングによりポドサイトの恒常性に関与する遺伝子を網羅的に探索することを試みた。

## 3. 研究の方法

CRISPRスクリーニングは、CRISPR法により作成した遺伝子変異細胞ライブラリーから何らかの選択圧やレポーター遺伝子等により細胞を分離し、エンリッチされた遺伝子変異を次世代シーケンシングにより検出する手法である。本研究では、レンチウイルスベクターによりマウス由来ポドサイト細胞株にCas9を定常的に発現させ、これにキナーゼタンパクをコードする遺伝子を標的とするgRNA発現レンチウイルスライブラリーを感染させ、細胞ライブラリーを作成した。この細胞ライブラリーをラミニン $\alpha 5 \beta 2 \gamma 1$  (521)コーティングした培養ディッシュにて増殖培養した後、細胞を回収し、gDNAの次世代シーケンシング解析を行った。

## 4. 研究成果

まず、ポドサイトの機能的変化を選択圧に利用した細胞の分離方法を検討したところ、成熟した糸球体基底膜の細胞外基質であるラミニン 521 をコーティングした培養ディッシュにマウス由来ポドサイト細胞株を播種すると、細胞質が薄く広がる形態変化を示し、増殖性が低下することを見出した(図1)。ラミニン 521 刺激を与えた細胞では、ポドサイトのマーカーであるNphs1、Synpo、Wt1の発現上昇、糸球体基底膜を構成する細胞外基質であるコラーゲンIVおよびラミニンをコードする遺伝子の発現上昇が認められた。マウス由来ポドサイト細胞株は温度感受性SV40T抗原により比較的未分化な状態で不死化している細胞株であり、以上の結果はラミニン 521 刺激がマウス由来ポドサイト細胞株をポドサイト様に分化させたことを示唆している。興味深いことに、マウス由来ポドサイト細胞株の分化誘導に慣習的に使用されるコラーゲンIによる刺激はラミニン 521 刺激と類似した遺伝子発現変化と増殖性の低下を誘導した。ただし、コラーゲンI刺激による形態変化は紡錘形でラミニン 521 刺激と異なっており、Il6の発現上昇も認められた。ポドサイトにおけるIl6の発現上昇は高グルコース負荷やリポポリサッカライド刺激でも認められる応答であるため、コラーゲンI刺激によるマウス由来ポドサイト細胞株の応答は生理的な分化ではなく、病的な変化と考えられる。また、ラミニン 521 と共に成熟した糸球体基底膜を構成する主要分子であるコラーゲン $\alpha 3(\alpha 4)\alpha 5$ 刺激では細胞応答性は乏しかった。この結果は、糸球体基底膜の構造的にポドサイトと直接相互作用しているのがラミニン 521 だと考えられていることと整合性がある。また、ヒト由来ポドサイト細胞株はラミニン 521 刺激に対する応答性はマウス由来ポドサイト細胞株に比べて低かった。この結果はヒト由来ポドサイト細胞株がTERTにより分化した状態で不死化していることに原因があると考えられる。次に、レンチウイルスベクターによりマウス由来ポドサイト細胞株にCas9を定常的に発現させたクローン株を作成した。これにキナーゼタンパクをコードする遺伝子を標的とするgRNA発現レンチウイルスライブラリーを感染させ、遺伝子変異細胞ライブラリーを作成した。ラミニン 521 刺激に対する細胞応答性が失われている細胞は、ラミニン 521 刺激下で分化せず、そのまま増殖を続けるはずである。細胞ライブラリーをラミニン 521 コーティングした培養ディッシュに播種し、増殖培養を行なった。コントロールの細胞は未コート培養ディッシュに対照群と同じ細胞密度で播種し、増殖培養を行った。培養4日後、細胞を回収し、ゲノム抽出、gDNAの調整および精製を行い、次世代シーケンシング解析を行った。これによりラミニン 521 刺激の選択圧によりエンリッチされたgDNAが標的とする遺伝子群が明らかとなり、さらにGO解析およびパスウェイ解析により、ラミニン 521 刺激に対するポドサイトの分化応答性に関わるシグナル経路を類推した。

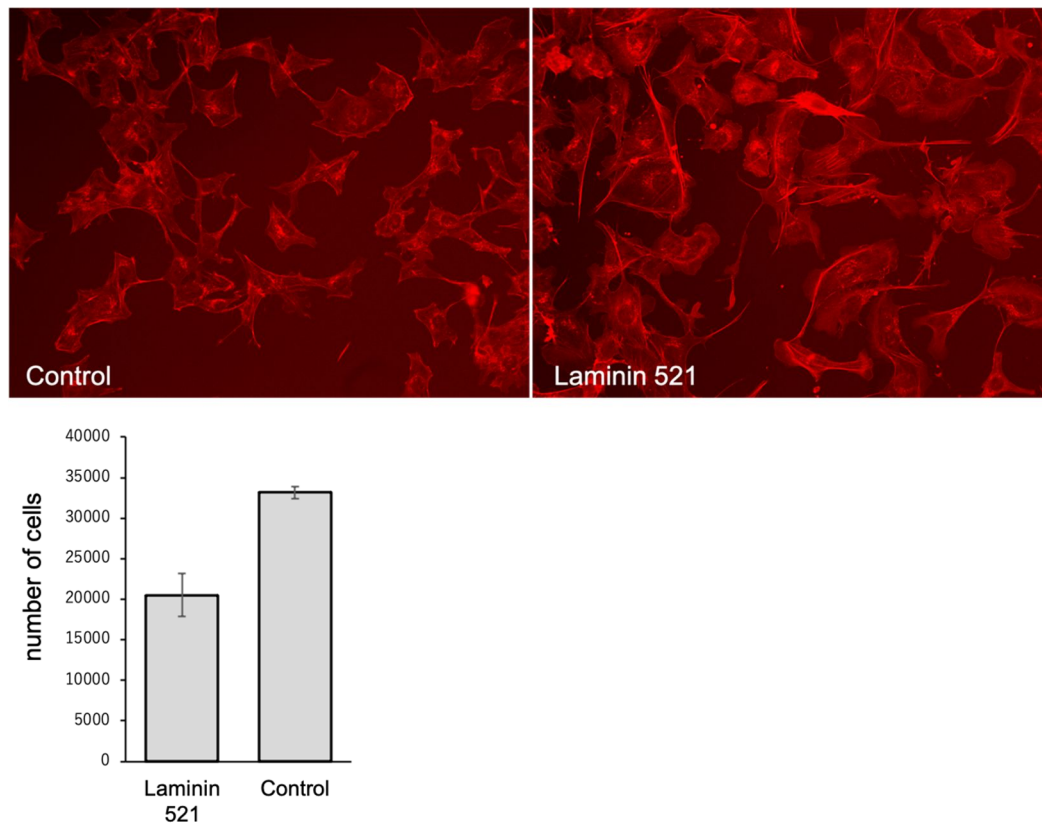


図 1. ラミニン  $\alpha 5 \beta 2 \gamma 1$  刺激によるマウス由来ポドサイト細胞株の形態変化と増殖性の低下

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 佐々木 隼人
2 . 発表標題 発生工学 ・ 遺伝学的アプローチを駆使したマルチドメインタンパク Tensin2 の機能解析
3 . 学会等名 日本実験動物学会（招待講演）
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 稲垣 駿平, 佐々木 隼人, 佐々木 宣哉
2 . 発表標題 TNS2欠損はECMに対するポドサイトの細胞応答を乱す
3 . 学会等名 日本実験動物学会
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 佐々木隼人, 伊藤優輝, 高橋悠記, 日裏剛基, 渡邊正輝, 佐々木宣哉
2 . 発表標題 Tensin2欠損ポドサイト細胞株におけるインテグリンシグナルの解析
3 . 学会等名 第67回 日本実験動物学会
4 . 発表年 2020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
---------	---------