

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K10138

研究課題名(和文) 小児原発性巣状糸球体硬化症における表現型決定因子のRNA-seq解析による解明

研究課題名(英文) Elucidation of phenotypic determinants in pediatric primary focal glomerulosclerosis by RNA-seq analysis

研究代表者

田中 絵里子 (Tanaka, Eriko)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：80439827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：小児ネフローゼ症候群9例(微小変化群7例、巣状分節性糸球体硬化症2例)の腎組織からレーザーマイクロダイセクションで糸球体を単離し、RNA sequencingによって発現RNAを解析した。糸球体では細胞の運動性や分化発達に関連したRNA変動が多くみられ、病型による相違は認めなかった。腎組織全体でのRNA sequencing5例(微小変化群3例、巣状分節性糸球体硬化症2例)の結果と比較検討したところ、腎組織全体では免疫分子のRNA発現変動が多くみられたが糸球体では認めなかった。ネフローゼ症候群では病型に関わらず腎臓全体での免疫系の変化が糸球体内の細胞機能の変化に関与し発症に繋がると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児ネフローゼ症候群は、免疫異常を背景に腎糸球体のポドサイトの形態変化をきたし発症することが言われているが、その発症機序の詳細は未だに解明されていない部分が多い。また、これまでに実際の腎組織における遺伝子発現の変化を包括的に解析した研究はほとんどない。本研究では小児ネフローゼ症候群患者の腎糸球体におけるRNA発現を解析することで、尿蛋白漏出の直接的な原因となる遺伝子発現の変化を確認することができた。この研究により小児ネフローゼ症候群の病態機序解明に近づき、病態に基づいた治療の開発に繋げることができると期待される。

研究成果の概要(英文)：We performed RNA sequencing to analyze RNA expressions in the glomerulus of pediatric nephrotic syndrome patients. Nine samples (7 minor glomerular abnormalities, and 2 focal segmental nephrotic syndrome) were analyzed. We found that RNA expressions concerning cell motility and cellular differentiation significantly changed. There were no differences between disease types. Comparing the result of RNA sequencing of whole kidney specimens from five samples revealed that the whole kidney showed significant changes in RNA expressions concerning immunity, whereas the glomerulus showed no changes in RNA expressions of immunity. Taken together, we speculated that the immunity alternation in the kidney affects the cell functions in the glomerulus, leading to development of nephrotic syndrome.

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：ネフローゼ症候群 RNA sequencing 腎糸球体 細胞分化 免疫分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児の末期腎不全患者は栄養不良や成長障害、心合併症などの様々な全身合併症を抱えており、透析療法を行っても合併症は持続しそれらを抱えながら日常生活を送ることを余儀なくされる。患児の QOL を改善するためには、腎疾患が発見された時点で末期腎不全への進展を防ぐ治療を行うことが重要である。

原発性単状分節性糸球体硬化症 (pFSGS) は進行性に腎機能が障害され、20 年で約 70% が末期腎不全に陥る腎予後不良の疾患である。典型的にはネフローゼ症候群 (NS) で発症し、治療抵抗性で徐々に腎機能が低下する。一方、同じく NS を呈する微小変化群 (MGA) は成人までに多くが自然治癒し、腎機能は保たれる。pFSGS は発症時の腎組織検査で MGA と診断されることもあり、同じ疾患の異なる表現型である可能性が考えられているが、その差異の原因は解明されていない

2. 研究の目的

本研究では、MGA および pFSGS の患者腎組織において惹起している遺伝子を RNA sequencing (RNA-seq) 解析によって同定比較し、相同点・相違点を解明することで表現型・予後の決定因子を規定し、小児ネフローゼ症候群の発症機序の解明に近づくとともに pFSGS を MCD の表現型に変化させるための治療ターゲットとなる分子と経路を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MGA および pFSGS 患者のパラフィン包埋腎組織検体を収集し、レーザーマイクロダイセクションにて腎糸球体のみを切り出し、total RNA を抽出して RNA-seq 解析をおこなった。

(2) それぞれの検体における RNA 発現変動を MGA と pFSGS に分けて比較し、相同点や相違点を解析した。

(3) RNA 発現をネフローゼ症候群の病期 (ネフローゼ期 (NS)、寛解期 (NSRm)、再発前 (NSbRl)、寛解導入時 (NSbRm)) の 4 つに分けて比較解析した。

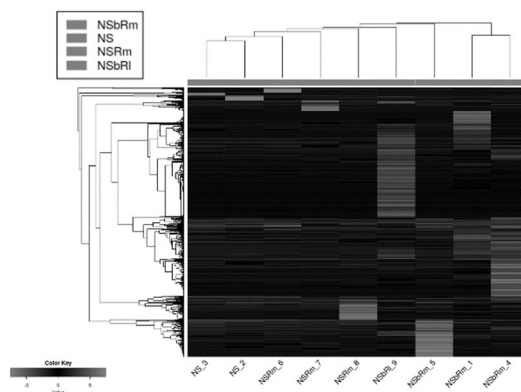
(4) 腎糸球体における RNA 発現変動を腎臓全体で RNA-seq 解析をおこなった結果と比較し相違点を解析した。

4. 研究成果

小児ネフローゼ症候群 9 例 (MGA 7 例、pFSGS 2 例) について RNA-seq 解析をおこなった。発現 RNA を MGA と pFSGS と病型ごとに分けて比較したが、大きな相違点は認めなかった。

RNA 発現をネフローゼの病期で分けた検討では病期ごとに発現 RNA の相同性が近く、ネフローゼ期と寛解期に発現 RNA の類似性がみられた (図 1、図 2、図 3)。

クラスターによる発現経路の解析では、細胞の運動性や細胞分化・発達、血管系に関連した経路の遺伝子の RNA 発現変動が多くみられた (図 4)。



左より NS 2 例, NSRm 3 例, NSbRl 1 例, NSbRm 3 例

図 1 ヒートマップと階層クラスター

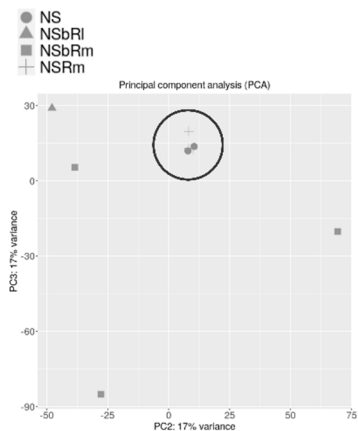


図 2 PCA 分析

上より NSRm-NSbRm, NSRm-NS, NSbRm-NS

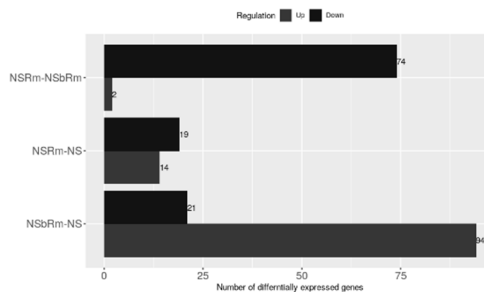
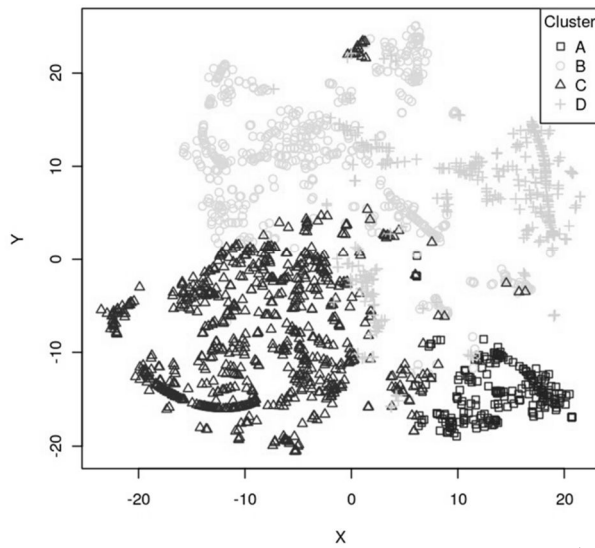


図 3 DEG 解析



Enriched pathways for each cluster

Cluster	adj.Pval	nGenes	Pathways
B	2.0e-03	133	Movement of cell or subcellular component
	2.0e-03	118	Locomotion
	2.0e-03	56	Blood vessel morphogenesis
	2.0e-03	107	Cell motility
	4.6e-03	61	Blood vessel development
	6.9e-03	219	Cellular developmental process
	7.0e-03	215	Cell differentiation
	7.8e-03	47	Angiogenesis
C	2.2e-03	255	Cell differentiation
	2.2e-03	259	Cellular developmental process
	6.3e-03	219	Animal organ development

図4 Enriched クラスタ解析

腎組織全体での RNA-seq 解析 5 例 (MGA 3 例、pFSGS 2 例) との比較では、腎組織全体では主に既報にあるような免疫経路に関連した分子の発現変化を認めたが、腎糸球体では同じ遺伝子の発現変化は認めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------