

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17730

研究課題名(和文) 後天性嚢胞腎を対象とした腎不全におけるシアル酸修飾とKdn蓄積の意義について

研究課題名(英文) Study of the Sialic Acid Modification and Kdn Accumulation in Acquired Cystic Kidney Disease

研究代表者

川西 邦夫 (Kawanishi, Kunio)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：00578750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腎不全状態の腎臓には非遺伝性の嚢胞疾患である後天性嚢胞腎(ACKD)が生じる。透析患者では腎細胞癌の発生頻度が非透析患者の5-15倍に増加するが、透析年数に応じて後天性嚢胞腎随伴腎細胞癌(ACD-RCC)の頻度が増加することが知られる。透析患者血清中にシアル酸分子種であるデアミノノイラミン酸(Kdn)が蓄積し、ヒト血清中に抗Kdn抗体が存在することに着目し、ACKDとACD-RCCの進展にはKdnが関与していると仮定した。患者組織、細胞培養においてKdn型糖ペプチドを探索可能な手法を確立した。ACD-RCC組織中にKdn型糖ペプチドは発見できなかったが、マーカー候補となる分子を複数発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

透析患者のKdn蓄積とヒト血清中に抗Kdn抗体が存在するという発見から、ACKDのACD-RCCへの進展メカニズム解明を目指し、Kdn探索を行った。研究を通して、ACD-RCC組織からKdn型ペプチドを発見することはできなかったが、ヒト細胞株上でKdn型ペプチドを検出する手法を確立できた意義は大きい。また、研究期間中に米国での事前検討を深化させ、脊椎動物が保存するマンノース代謝経路とKdn産生の意義は過剰なマンノースの緩衝機構にあるとする学説を論文化できた。また研究の過程で透析腎癌マーカーとして有力な分子を複数発見し特許出願した社会的意義は大きく、検証のための多施設共同研究を開始できている。

研究成果の概要(英文)：Acquired cystic kidney disease (ACKD), a non-hereditary cystic disease, occurs in kidneys of chronic kidney disease (CKD) patients. The frequency of renal cell carcinoma is 5- to 15-fold higher in hemodialysis patients than in non-hemodialysis patients, and the frequency of acquired cystic kidney-associated renal cell carcinoma (ACD-RCC) is known to increase with the number of years of dialysis. According to the discoveries of deaminoneuraminic acid (Kdn) accumulation in hemodialysis patients, and the presence of anti-Kdn antibodies in human serum, we hypothesized that Kdn is involved in the development of ACKD and ACD-RCC. We established a method to detect Kdn-conjugated glycopeptides in patient tissues and cell cultures. Although we could not find Kdn-conjugated glycopeptides in ACD-RCC tissues, we found several unique sialylated peptides that could be useful biomarkers for ACD-RCC.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：後天性嚢胞腎 後天性嚢胞腎随伴腎細胞癌 シアル酸 Kdn バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

透析腎癌に特異的な組織型である、Acquired cystic disease associated RCC (ACD-RCC) は、後天性嚢胞腎 (Acquired cystic kidney disease, ACKD) を母地として発生すると考えられるが詳細なメカニズムは不明である。研究者が米国で行った事前検討によると、透析患者の血清中には遊離型のシアル酸が過剰に蓄積し、ヒトの主要なシアル酸分子種である *N*-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) だけではなく、デアミノノイラミン酸 (Kdn) の血中濃度も上昇していた。Kdn は魚類から発見されたシアル酸分子種で、マウスやヒトなどの哺乳類の細胞でも遊離型の Kdn は産生されるが糖鎖修飾には用いられないとされている。しかし、頭頸部癌や前立腺癌などの癌組織から遊離型 Kdn が上昇している、あるいはオリゴ型の Kdn が検出されるという報告がある。研究者が米国で行った追加検討で、ヒト血清中には抗 Kdn 抗体が存在すること確認できた。以上から腎不全特有の病態である ACKD 及び ACD-RCC の進展に、Kdn の蓄積と抗 Kdn 抗体による微小炎症が関与するという仮説を立てた。一方、透析腎癌診療の問題点として、造影 CT や MRI などの画像所見に特異的なものがなく、術前診断が難しいことがあげられる。このため Kdn 型糖鎖が ACD-RCC の組織中に含まれていれば、新規腫瘍マーカーとしての活用が可能と考えた。

## 2. 研究の目的

腎不全状態で蓄積する Kdn 及び、ヒト血清中で抗 Kdn 抗体を発見した。これらの存在が末期腎不全患者特有の非遺伝性疾患である ACKD とその ACD-RCC への進展に関与するという仮説のもと、患者組織の解析、腎不全マウスモデルによる病態メカニズムの解明を行うことを主要な目的とした。研究過程で透析腎癌に特異的な糖ペプチドを見出すことができれば、特異的な診断モダリティがない透析腎癌に対する新規バイオマーカー開発研究に発展させることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ACD-RCC 患者組織の遺伝子解析

ACD-RCC は 2016 年に WHO 腎細胞性腫瘍分類に追加された比較的新しい疾患概念であるため、遺伝子解析が途上である。研究では、透析腎癌のうち高頻度となる ACD-RCC と淡明細胞型腎細胞癌の患者組織から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝解析を行った。対照として癌周囲組織由来、非透析例淡明細胞型腎細胞の癌組織由来の RNA を用いた。クラスター解析、パスウェイ解析に加えて、糖転移酵素、糖ヌクレオチド輸送体、硫酸基転移酵素など糖鎖修飾に関わる酵素の遺伝子情報を日本糖鎖科学統合データベース (<https://jcgddb.jp/database.html>) より抽出し ACD-RCC、淡明細胞型腎細胞の癌部および非癌部の遺伝子発現の群間比較を行った。

### (2) ACD-RCC 患者組織の糖鎖解析

ACD-RCC の糖鎖情報の詳細を調査した報告は検索した限りでは認められず、研究では、糖鎖情報を網羅的に解析可能なレクチンアレイによる解析を行った。レクチンは糖鎖を認識するタンパク質で、その標的となる糖鎖情報の多くが明らかとなっている。このレクチンをマイクロアレイ上に固定化したレクチンアレイは、クルードなサンプルから特異的な標的 (タンパク質など) の糖鎖プロファイルを調べることが可能である。ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体を薄切し、顕微鏡ガイド下でレーザーを用いた選択的な組織採取を行った。組織サンプルから糖タンパク質を抽出し蛍光標識させたのちに、レクチンアレイチップにアプライし専用のリーダーでシグナルを測定した。

### (3) *Cmah* ノックアウトマウスを用いた腎不全モデルの解析

虚血再灌流障害を利用した急性腎傷害 (AKI) モデルは広く用いられているが、この AKI モデルを野生型マウスの片側の腎臓に適応し 36 週間観察すると、傷害された腎臓に乳頭状腎細胞癌が形成されるという驚くべき報告があった (A.J. Peired, et al, Sci Transl Med 12 (2020) eaaw6003)。この報告を追試し、かつ、本研究の重要な要素である慢性腎不全の影響を観察する目的で、AKI モデルを作製後、12 ヶ月間観察することとした。なお、脊椎動物のシアル酸分子種には Neu5Ac、Kdn に加えて N-グリコシルノイラミン酸 (Neu5Gc) が存在する。Neu5Ac が核内で CMP-シアル酸シンターゼ (CMAS) により CMP-Neu5Ac に変換され、CMP-Neu5Ac ヒドロキシラーゼ (CMAH) が作用し CMP-Neu5Gc が合成される。ヒトは進化の過程で CMAH の偽遺伝子化が生じているため Neu5Gc が合成できない。しかし食肉由来など外来性の Neu5Gc がヒト糖鎖合成に使用されることが示されており、抗 Neu5Gc 抗体の存在および炎症性疾患への関与が報告されている。このため野生型に加えて *Cmah* ノックアウトマウスを実験に用い、よりヒトに近いシアル酸分子種組成での腎不全モデルを作製し腎腫瘍の発生の有無について解析を行った。

### (4) *GNE* 遺伝子細胞培養株を用いた Kdn 型糖ペプチド検出方の確立

米国での事前検討で得られた透析患者での Kdn 蓄積のメカニズム解明を目的に、ヒトやマウスの細胞にマンノースを添加し、細胞内の成分について、高速液体クロマトグラフィーや質量解析を行ったところ、遊離型 Kdn の産生促進については確認できた一方、糖鎖に含まれる Kdn は、ごく微量しか検出できなかった。このことは、哺乳類の細胞は過剰なマンノースを遊離型 Kdn に変換する代謝経路を備えてはいても、Kdn を糖鎖合成に利用しないことを示唆した。この実験で用いた BJAB-K20 細胞はパーキットリンパ腫患者から樹立された EB ウイルス感染陰性の B 細胞性腫瘍株で、シアル酸合成に必須である UDP-N-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼを欠失しているため、シアル酸合成能が低下している。外因性のシアル酸を取り込み糖鎖合成に用いることが可能である。Neu5Ac が主要なシアル酸となるヒト細胞を用いた解析では、相対的に超微量となる Neu5Gc や Kdn を検出することが困難となるが、BJAB-K20 の培養条件に Neu5Ac 以外のシアル酸分子種 (Neu5Gc や Kdn) を添加すると Neu5Gc 型糖鎖や Kdn 型糖鎖を増強することが可能である。あるいはより安価な手法としてマンノースを培養液中に付加すると、BJAB-K20 細胞は内因性に Kdn 合成が促進させるため、Kdn 型糖鎖を増強することができる。この系で得られたサンプルを陽性コントロールとして Kdn 型糖鎖あるいは糖ペプチド解析方法の確立を行った。

### (5) 低真空走査型顕微鏡による細胞および組織の糖鎖構造解析

低真空走査型顕微鏡 (LVSEM) は、専用の固定処理が不要かつ含水試料の観察が可能であることが特徴で、ホルマリン固定検体や培養細胞の観察が可能であり、腎生検検体への応用などが期待されている。研究では、透析腎癌に生じた疾患特異的な糖鎖修飾を認識するレクチンを用いた組織染色を行なった後、染色に用いる 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) 色素を重金属イオンで増感し LVSEM 上での可視化を可能とする手法の開発を行った。また、臨床検体を用いた LVSEM 観察法を改善する過程では、希少腎疾患研究などを対象とし、複数の論文発表や共同研究に発展させた。

## 4. 研究成果

### (1) ACD-RCC 患者組織の遺伝子解析

ACD-RCC と透析例の淡明細胞型腎細胞の癌部の糖鎖関連遺伝子 (220 遺伝子) の発現を比較したところ、ACD-RCC ではシアル酸やフコースの修飾に関わる酵素群の遺伝子発現が亢進していた。

なお、非癌部では ACD-RCC と透析例の clear cell RCC との間に糖鎖関連遺伝子発現の有意な差異を認めなかった。また、対照として行った透析例と非透析例の淡明細胞型腎細胞の遺伝子発現解析においては、癌部では有意な差異は認めなかった。

#### (2) ACD-RCC 患者組織の糖鎖解析

ACD-RCC に特異的な糖鎖構造の網羅的解析を目的に、つくばバイオバンクセンターの FFPE 検体から癌部と非癌部を顕微鏡ガイド下にレーザーを用いたサンプリングにより単離し、それぞれの糖タンパク質を抽出後、レクチンアレイによる解析を行った。ACD-RCC では透析例の淡明細胞型腎細胞と比較し、シアル酸やフコースを認識するレクチンのシグナルが有意に上昇していた。この結果を元に、腎癌の凍結組織サンプルに対し Kdn 検出を目的とする質量解析を施行したが、明らかな Kdn 型糖鎖を確認できなかった。また、産業技術総合研究所（産総研）との共同研究により糖鎖付加部位特異的のグリコーム解析法（Glyco-RIDGE 法）を適応したが、Kdn 型糖ペプチドを見出すことはできなかった。しかしながら、この過程で ACD-RCC で有意となるシアル化ペプチドを複数発見することができ、腎癌患者血清検体でも確認できたことから特許出願を行った。

#### (3) *Cmah* ノックアウトマウスを用いた腎不全モデルの解析

野生型、*Cmah* ノックアウトマウスの雌雄各 20 匹ずつに対し、虚血再還流による AKI モデル作製から 12 ヶ月間の観察を行った。血清 Cr は漸増し慢性腎不全状態にあることを確認できた。定期的にエコーで腎臓を観察したが明らかな腫瘍形成は認めなかった。最終的に 12 ヶ月で組織を確認したところ、嚢胞化は認めるものの、明らかな腫瘍形成は見出すことができなかった。既報では野生型であっても、AKI 後、12 週目と 36 週目に 55.6%のマウスに乳頭腺腫が、36 週目には 22.2%のマウスに腎細胞癌が認められるとあったが、本研究では腫瘍形成を確認することができなかった。以上から、化学発癌による腫瘍形成と腎不全モデルの組み合わせによる腫瘍モデルでの検討を追加した。鉄二トリロ三酢酸 (Fe-NTA) をマウスの腹腔内に投与すると、活性酸素、フリーラジカル産生などにより腎腫瘍が形成されることが報告されている (J.L. Li, et al, Cancer Res 47 (1987) 1867-1869)。野生型マウス (A/J, BALB/c) に 5/6 腎摘術を施行し、長期投与に耐えうる量で Fe-NTA を投与し観察したところ、ごく少数のマウスに腎細胞癌形成 (乳頭状腎細胞癌) を認めたが、腎不全モデル群で有意な発生率の増加を確認することはできなかった。

#### (4) *GNE* 遺伝子細胞培養株を用いた Kdn 型糖ペプチド検出方法の確立

マンノースを培養液中に付加した BJAB-K20 細胞を回収後、超遠心により細胞膜成分を回収しシアル酸定量を行うと Kdn が増加していた。このサンプルに対し、Kdn 型糖ペプチドを網羅的に検出する目的で産総研との共同研究による Glyco-RIDGE 解析を行ったところ、Kdn 型糖ペプチドを同定することができた。また、米国での事前検討をふまえ、マンノース代謝に関わる酵素の遺伝子配列の相違を検討したところ、進化の過程で純化淘汰がなされてきたことがわかった。さらに、*N*-アセチルノイラミン酸リン酸合成酵素は、42 番目のアミノ酸がメチオニン (M42) であることが Kdn 型の糖鎖合成に重要であると報告されているが、系統解析を行うと、魚類や両生類では M42 となる配列が、爬虫類、鳥類、哺乳類ではロイシン (L42) やバリン (V42) などに変化する中、ヒトを含む類人猿では M42 となっていることを突き止めた。さらに、魚類の CMP-シアル酸合成酵素 (CMAS) の遺伝子をヒト細胞に組み込むと、その細胞膜成分から Kdn 型糖鎖が確認できた。以上のことから、脊椎動物は、マンノース過剰への対応という共通の選択圧に対して、似かよった性質や形態を保持する収斂進化を遂げる一方で、ヒトを含む哺乳類では、マンノース代謝の結果として遊離型の Kdn を合成するが、Kdn 型糖鎖は合成しないという進化の過程を経て発達したことが示唆された (J Clin Invest 131 (2021) e137681)。

(5) 低真空走査型顕微鏡による細胞および組織の糖鎖構造解析

前述のレクチンアレイ解析で得られた結果をもとに ACD-RCC で有意となる複数のレクチンを選抜した。FFPE 検体に蛍光染色を行い全面観察撮像と蛍光強度の定量化を行った。さらに、免疫染色やレクチン染色に重金属増感法を組み合わせた、低真空走査型電子顕微鏡観察に成功した。LVSEM 観察法を深化させる過程で、アクセリード社との共同研究による X 連鎖劣性遺伝性アルポート症候群マウスの腎組織解析、東京医科歯科大学との共同研究による成人発症型ネフロン瘻の組織解析、東京女子医科大学との共同研究による Proliferative glomerulonephritis with monoclonal immunoglobulin G deposits (PGNMID)の組織解析に LVSEM を活用し、複数の論文報告を行った。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kawanishi Kunio	4. 巻 2021
2. 論文標題 Exploring comprehensive glycan profiles of acquired cystic kidney disease associated renal cell carcinoma to establish a new diagnostic biomarker	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Impact	6. 最初と最後の頁 40-42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21820/23987073.2021.6.40	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 川西 邦夫, 岡谷 千晶, 長田 道夫	4. 巻 35
2. 論文標題 後天性嚢胞腎随伴性腎細胞癌における糖鎖関連遺伝子の次世代シーケンサー解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本透析医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 673-678
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 Okita Yukari, Zheng Ling, Kawanishi Kunio, Miyoshi Hiroto, Yanagihara Kazuyoshi, Kato Mitsuyasu	4. 巻 26
2. 論文標題 Polyvinyl alcohol scaffolds and supplementation support 3D and sphere culturing of human cancer cell lines by reducing apoptosis and promoting cellular proliferation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 336-343
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12843	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 Fujimaru Takuya, Kawanishi Kunio, et al.	4. 巻 6
2. 論文標題 Genetic Background and Clinicopathologic Features of Adult-onset Nephronophthisis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kidney International Reports	6. 最初と最後の頁 1346-1354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ekir.2021.02.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawanishi Kunio, Saha Sudeshna, Diaz Sandra, Vaill Michael, Sasmal Aniruddha, Siddiqui Shoib S., Choudhury Biswa, Sharma Kumar, Chen Xi, Schoenhofen Ian C., Sato Chihiro, Kitajima Ken, Freeze Hudson H., M?nster-K?hnel Anja, Varki Ajit	4. 巻 131
2. 論文標題 Evolutionary conservation of human ketodeoxynonulosonic acid production is independent of sialoglycan biosynthesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 e137681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI137681	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Saha Sudeshna, Coady Alison, Sasmal Aniruddha, Kawanishi Kunio, Choudhury Biswa, Yu Hai, Sorensen Ricardo U., Inostroza Jaime, Schoenhofen Ian C., Chen Xi, M?nster-K?hnel Anja, Sato Chihiro, Kitajima Ken, Ram Sanjay, Nizet Victor, Varki Ajit	4. 巻 12
2. 論文標題 Exploring the Impact of Ketodeoxynonulosonic Acid in Host-Pathogen Interactions Using Uptake and Surface Display by Nontypeable Haemophilus influenzae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e03226-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.03226-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Song Jiang Ying, Saga Nobuyuki, Kawanishi Kunio, Hashikami Kentaro, Takeyama Michiyasu, Nagata Michio	4. 巻 10
2. 論文標題 Bidirectional, non-necrotizing glomerular crescents are the critical pathology in X-linked Alport syndrome mouse model harboring nonsense mutation of human COL4A5	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-76068-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Kunio Kawanishi
2. 発表標題 Glycopathological Profiling of Acquired Cystic Disease Associated Renal Cell Carcinoma
3. 学会等名 1st East Asia Renal Pathology Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川西 邦夫
2. 発表標題 シアル酸生物学からみた後天性嚢胞腎随伴性腎細胞癌の新規バイオマーカー開発
3. 学会等名 第11回分子腎臓フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川西 邦夫、岡谷 千晶、藤田 晋一郎、村谷 匡史、佐藤 隆、梶 裕之、久野 敦
2. 発表標題 後天性嚢胞腎随伴性腎細胞癌における糖鎖遺伝子と糖鎖発現の網羅的解析
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kunio Kawanishi
2. 発表標題 Glycan profile of acquired cystic disease associated renal cell carcinoma using lectin microarray systems
3. 学会等名 the 63th Annual Meeting of the Japanese Society of Nephrology
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川西 邦夫
2. 発表標題 シンポジウム10「透析腎癌」糖鎖解析からみえた透析腎癌の特徴
3. 学会等名 第50回日本腎臓学会東部学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 Kunio Kawanishi
2. 発表標題 Glycopathological Profiling of Acquired Cystic Disease Associated Renal Cell Carcinoma
3. 学会等名 East Asia Renal Pathology Conference (International Travel Award 採択 > COVID-19により延期) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川西邦夫
2. 発表標題 シンポジウム「透析腎癌」透析腎癌の糖鎖解析
3. 学会等名 第50回日本腎臓学会東部学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 腎細胞癌検出用糖タンパク質マーカー	発明者 川西邦夫、久野敦、 岡谷千晶、佐藤隆、 坂上弘明、梶裕之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-22741	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>体内のマンノース濃度を保つ仕組みを解明～進化の過程で選択された糖代謝経路～  <a href="https://www.tsukuba.ac.jp/journal/medicine-health/20210210140000.html">https://www.tsukuba.ac.jp/journal/medicine-health/20210210140000.html</a></p>
---

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