

令和 5 年 5 月 14 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16197

研究課題名(和文) 傷害特異的糖鎖修飾に着目した新規糸球体傷害マーカーの開発

研究課題名(英文) Altered glycosylation as a novel biomarker to detect glomerular injury

研究代表者

岩崎 剛史 (Iwasaki, Tsuyoshi)

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：60838366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は慢性腎臓病の予後予測に有用なポドサイト傷害マーカーを新規に開発することである。発症初期のポドサイト傷害動物モデルでRNA-seqによる網羅的発現解析を行ったところ、糖鎖修飾酵素遺伝子の発現上昇を認めた。これは傷害糸球体ではタンパクの糖鎖修飾が変化していることを示唆しており、ポドサイト傷害時にのみ出現する糖鎖修飾は、障害マーカーとなることが期待される。申請者は傷害ポドサイトの糖鎖修飾の網羅的な解析によって傷害マーカーとなる糖鎖を抽出することを試みた。将来的には、非侵襲的な臨床検査系として、傷害ポドサイト特有の糖鎖修飾を尿中で検出するELISAの開発を目指している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポドサイト傷害が糸球体の硬化から慢性腎臓病の進行につながると考えられているが、軽微で潜在的なポドサイトの傷害を腎生検組織を元に評価・スコア化することは困難であり、尿検査の様な非侵襲的な検査も開発されていない。申請者は蛋白尿出現前の傷害初期のポドサイト傷害動物モデルを解析し、糖鎖修飾酵素の発現が上昇していることに着目し、傷害時に変化した糖鎖修飾がポドサイト傷害マーカーになると考えた。傷害を受けたポドサイトの糖鎖修飾の変化については研究がほとんど及んでいない。糖鎖修飾に着目した傷害マーカーを探索する取り組みは、今後の腎病理診断や腎臓内科診療の場に新しいツールをもたらすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Podocyte injury promotes glomerulosclerosis regardless of the cause of the kidney disease and, in turn, leads to the progression of chronic kidney disease (CKD). With the aim of establishment of a novel biomarker that detects podocyte injury, we performed comprehensive gene expression analysis using RNA-seq of isolated glomeruli in preproteinuria stage. There was prominent increase of the expressions of glycosylation enzymes in the RNA-seq data, which suggested that injured-podocyte-specific modification of glycosylated protein has a potential to be a prognostic biomarker for CKD with high sensitivity.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：慢性腎臓病 ポドサイト

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)患者は我が国では1,300万人を超え、生命予後やQOL面に加え医療費面からも重大な問題になっている。CKDの多くでは、原疾患の悪化過程で糸球体傷害による腎機能低下が惹起されるため、糸球体傷害の程度を把握するニーズは極めて高い。

糸球体を構成する細胞の中でも、特に糸球体での濾過に関わるポドサイトの傷害が糸球体の硬化、ひいては腎臓の臓器予後の悪化につながると考えられているため、ポドサイトの障害を検出するアッセイ系が糸球体傷害マーカーとして有用になりうると考えられた。そこでポドサイトを主体に傷害する動物モデルを用いた RNA-seq による網羅的発現解析を行い、尿蛋白が陽性となる前から傷害糸球体で発現が変化する因子を網羅的に探索した。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目的は尿蛋白などより早期に糸球体傷害を検出できる新規マーカーの開発である。RNA-seqの解析により、傷害糸球体では尿蛋白が陽性となる前からSt6galnacファミリーなどの糖鎖修飾関連酵素の遺伝子発現が上昇していた。この結果は、傷害糸球体では膜タンパクや分泌タンパクの糖鎖修飾が変化している可能性を示唆しており、健常時とは異なる、障害糸球体に特有の糖鎖修飾は、より早期の検出が可能な感度の高い糸球体傷害マーカーとなりうると考えられた。そこで傷害糸球体で新たに出現する糖鎖を同定し、それが尿蛋白や尿中アルブミンといった現在保険適応となっている臨床検査に加わるバイオマーカーとなるか検証することを目的とした。また糖鎖修飾関連酵素以外にもRNA-seq解析で発現量の変動を認めた遺伝子の中から、主に膜タンパクや分泌蛋白を抽出し、糸球体障害マーカーとしての有用性を検討する。

## 3. 研究の方法

質量分析により、単離した糸球体の糖鎖プロファイルを傷害モデルと健常な糸球体との間で比較することで、傷害ポドサイトに特異的な糖鎖修飾を同定する。その糖鎖修飾の糖鎖ペプチドを抗原として、抗体を作成し、ポドサイト傷害動物モデルの腎組織の免疫染色を行い、本当に傷害糸球体でのみにシグナルが陽性となるか再確認する。その上で、ヒトの腎生検や摘出腎からの腎組織で同様の検討を行う。更に原因疾患ごとに腎病理所見や、腎予後との相関を検証する。また糸球体から尿中に分泌されたタンパクの傷害糸球体特異的糖鎖を検出することで、ポドサイト傷害が評価できる非侵襲的な尿検査系を立ち上げる。まず作成した抗体で動物モデルの尿のウェスタンブロッティングを行い、傷害糸球体特異的糖鎖を尿中でも検出できるかを検証する。その上で臨床検査に簡便に利用できるように、新規抗体を元にした ELISA などの検査方法を確立する。ELISA で動物モデル検体の傷害ポドサイト特異的糖鎖を検出できるようになったら、今度はヒトの尿サンプルで同様の検討を行い、尿蛋白や尿中アルブミンといった現在保険適応となっている臨床検査に対する優位性を検証する。

## 4. 研究成果

当初単離糸球体を用いる予定であったが、糖鎖修飾を受けた膜蛋白を含む尿細管細胞や炎症細胞の混入が避けられず、単離方法を検討したが、再現性のある結果が得られなかった。そこでポドサイト培養細胞にSt6galnacファミリーを発現させ、糖鎖プロファイルを親株と比較して解析

する方法に変更した。

マウスやヒト腎、hiPS細胞からのkidney organoidなどのsingle cell RNA-seqの報告でもポドサイトで発現を認める遺伝子の中にSt6galnacファミリー2-6は含まれていたがSt6galnac1は検出されていなかった(Park J, et al. Science 2018, Tracy T, et al. Dev Cell 2019)。申請者が行ったRNA-seqでは健常糸球体ではSt6galnac-2,3,4,6のmRNAが検出されている点では、前述の既報と一致した結果であった。St6galnacファミリーの中で傷害ポドサイトで有意な発現上昇を認めたものはSt6galnac-1,2のみであったことから、まずhSt6galnac-1をクローニングした。発現確認のために汎用培養細胞にクローニングしたhSt6galnac-1を発現させたところ、ウェスタンブロッティングでhSt6galnac-1の発現は確認できたが、発現細胞では分裂増殖に異常をきたすことがわかった。今後の解析のためにはhSt6galnac-2のクローニングと並行して、発現量の調整のために発現ベクターのプロモーターを検討する必要があると考えられた。

糖鎖修飾以外に、RNA-seq解析で発現の上昇する遺伝子の中で、特に膜タンパクや分泌タンパクを中心に、ポドサイト障害マーカーとしての検討を行ったが、免疫染色やウェスタンブロッティングにより障害マーカーとして有望と思われる遺伝子はまだ見つからない。一方、RNA-seqで発現が低下した遺伝子の中で、今まで報告されていない複数の遺伝子でポドサイトの足突起の癒合や蛋白尿が顕在化するより早期の段階から、蛋白レベルで糸球体での発現が低下していることが免疫染色で確認できた。これらの遺伝子はポドサイト障害マーカーとはならないが、傷害を受けたポドサイトの病態メカニズムを解明する上で重要な知見であると考えられた。

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