

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22897

研究課題名(和文) 疾患特異的iPS細胞を用いた末期腎不全の新規原因遺伝子同定および機序解明

研究課題名(英文) Identification of novel causative genes and elucidation of mechanism in end-stage kidney disease using disease-specific iPS cells

研究代表者

山村 雄太 (Yuta, Yamamura)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：40881058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、原因不明の末期腎不全症例の原因および病態解明を目指したものである。1)原因不明の末期腎不全症例に遺伝性腎疾患が多数存在する可能性があること、2)腎発生に必須の転写因子であるPAX2遺伝子により制御される遺伝子群が、遺伝性腎疾患の原因遺伝子となりうる可能性があること、に着目した。

PAX2遺伝子変異を有する腎コロボーマ症候群患者より疾患特異的iPS細胞を樹立し、CAGEによる網羅的トランスクリプトーム解析を行うことにより、ヒト腎発生過程におけるPAX2制御遺伝子を同定した。これらの知見は、遺伝性腎疾患の新規原因遺伝子の同定に有用な知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で同定したPAX2制御遺伝子群の知見は、解析困難なヒト腎発生過程を、疾患特異的iPS細胞を用いて模倣することにより解析可能としており、学術的に意義の高い研究である。ヒト腎発生過程におけるPAX2遺伝子の意義を評価する上で重要な知見である。さらに、腎発生過程のみならず、PAX2遺伝子の関与が報告されている急性腎障害後の腎再生を考える上でも有用な知見となる可能性があり、今回の研究成果を基盤とした種々の研究進展が期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the cause and pathophysiology of end-stage kidney disease (ESKD). We focused on that 1) some ESKD patients with unknown etiology probably have genetic kidney diseases, and 2) PAX2-regulated genes may cause genetic kidney diseases.

We established disease specific iPSCs from renal coloboma syndrome patients with PAX2 mutation and identified PAX2-regulated genes during kidney development. These knowledges are useful for the identification of novel causative genes for genetic kidney diseases.

研究分野：腎臓病

キーワード：PAX2遺伝子 腎コロボーマ症候群 遺伝性腎疾患 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

本邦における新規透析導入患者数は、年々増加傾向を示している。透析導入患者の原疾患は、糖尿病性腎症・慢性糸球体腎炎および腎硬化症が上位3つを占めているが、4番目に多いのが原疾患不明である。原疾患不明の割合は、医療体制の整備・診断技術の進歩にも関わらず、年々増加している。その背景には診断の困難さなどから診断未確定となった多くの遺伝性腎疾患およびCAKUT (Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract) の症例が存在していると推測する。実際に、次世代シーケンサーの普及により遺伝性腎疾患の新規原因遺伝子に関する報告は増加の一途にある。さらに低形成・異形成腎を呈するCAKUTの関連遺伝子は極めて多く、約15%は遺伝子異常が同定されているが、その他の大部分のCAKUTは病因不明である (J Am Soc Nephrol 2006; 17: 2864-2870)。そのため末期腎不全の誘因となる新規原因遺伝子を同定することは、原因不明の腎不全症例を減らす上で重要である。

2. 研究の目的

これまで申請者らは、PAX2 遺伝子に着目し解析を行ってきた。PAX2 遺伝子は腎発生に必須の転写因子であり、腎コロボーマ症候群およびCAKUTの主要な原因遺伝子として知られている。腎発生過程において、多くの遺伝子発現変動に関与し、その上流および下流遺伝子は様々な腎発生に関与する遺伝子が存在する。我々は腎コロボーマ症候群患者に対して、PAX2 と関連する遺伝子のターゲットシーケンスを行う事で、KIF26B の新規遺伝子異常を同定し、世界第一例目の報告を行った (PLoS One. 2015; 10: e0142843)。これら背景から、原因不明の腎不全症例の一因として、PAX2 によって制御される遺伝子変異に起因する症例が多く存在しているのではないかと着想に至った。本研究では、ヒト腎発生過程における PAX2 遺伝子の転写制御ネットワーク解析を基盤として、原因不明の末期腎不全の新規原因遺伝子同定および機序解明を目的とした。

3. 研究の方法

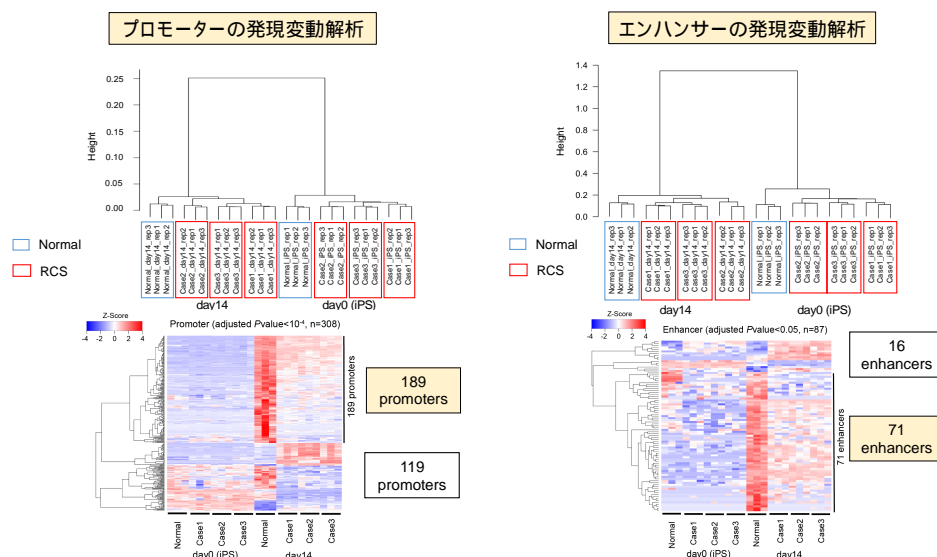
PAX2 変異を有する腎コロボーマ症候群特異的 iPS 細胞を用い、腎系譜細胞へと分化誘導を行った。分化誘導過程における各プロモーター・エンハンサーの転写活性をCAGE (Cap Analysis of Gene Expression) により評価した。健常者由来 iPS 細胞および疾患特異的 iPS 細胞それぞれ3検体を比較することで、ヒト腎発生過程における PAX2 制御遺伝子を同定した。さらに FANTOM など既存のデータベースにより、種々の腎発生に関する CAGE 解析および RNA-Seq のデータを手し、候補遺伝子の絞り込みを行った。

4. 研究成果

(1) 腎コロボーマ症候群特異的 iPS 細胞を用いた網羅的トランスクリプトーム解析

PAX2 遺伝子変異を有する腎コロボーマ症候群特異的 iPS 細胞を用いて、ヒト腎発生過程を模倣した実験系での PAX2 遺伝子の影響を評価した。iPS 細胞から既知の陣系譜細胞への分化誘導法を用いて解析サンプルを作成した。解析対象として、分化誘導過程における PAX2 遺伝子の発現推移、および既知のネフロン前駆細胞の表面マーカーを用いて、分化誘導前および分化誘導 day14 時点の Integrin 8+/PDGFR⁻ の細胞群を解析対象とした。CAGE を用いた分化誘導過程の網羅的な遺伝子発現解析により PAX2 により制御される候補として 189 のプロモーターと 71 のエンハンサーを同定した (図1)。

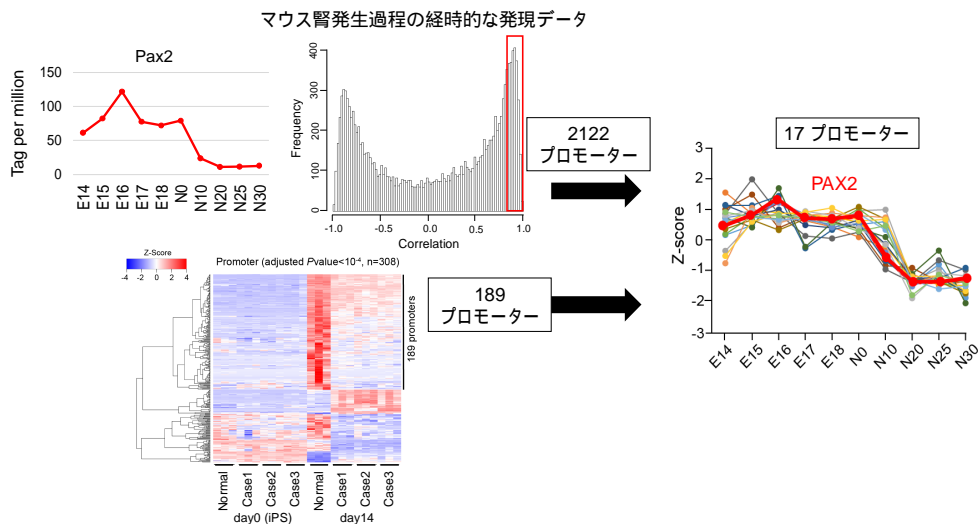
図1



2) 既知のデータベースを用いた PAX2 により制御される遺伝子群の評価

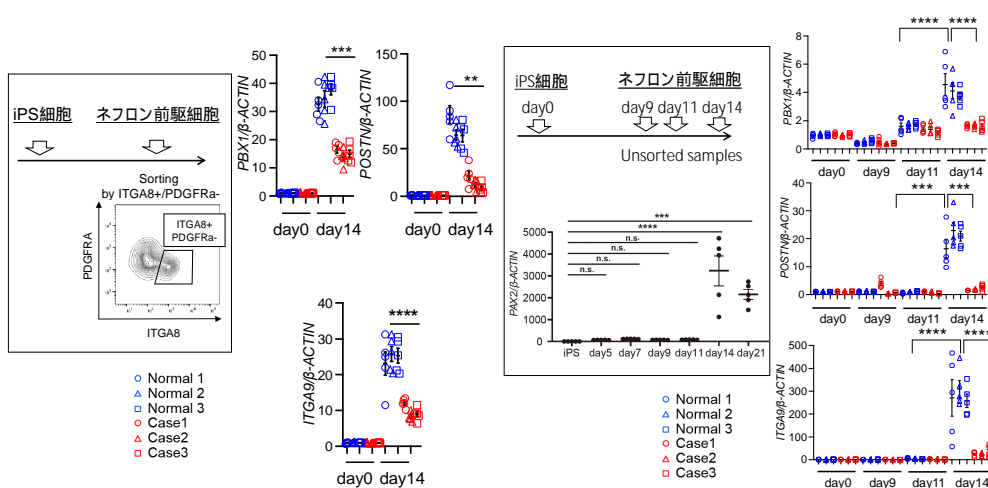
CAGE により抽出した 189 プロモーターに着目し、以降の解析を行うことで候補遺伝子の絞り込みを行った。FANTOM データベースより腎発生過程における継時的な遺伝子発現データを入力した。PAX2 遺伝子と類似した発現パターンを呈する遺伝子群に着目し、PAX2 遺伝子との相関係数が 0.8 以上の遺伝子群を抽出した。FANTOM データベースから抽出した PAX2 遺伝子との相関係数が 0.8 以上の 2122 プロモーターと、iPS 細胞由来サンプルを用いた CAGE 解析で抽出した 189 プロモーターを比較し、17 プロモーターを PAX2 遺伝子により制御される候補遺伝子として同定した (図 2)。

図 2



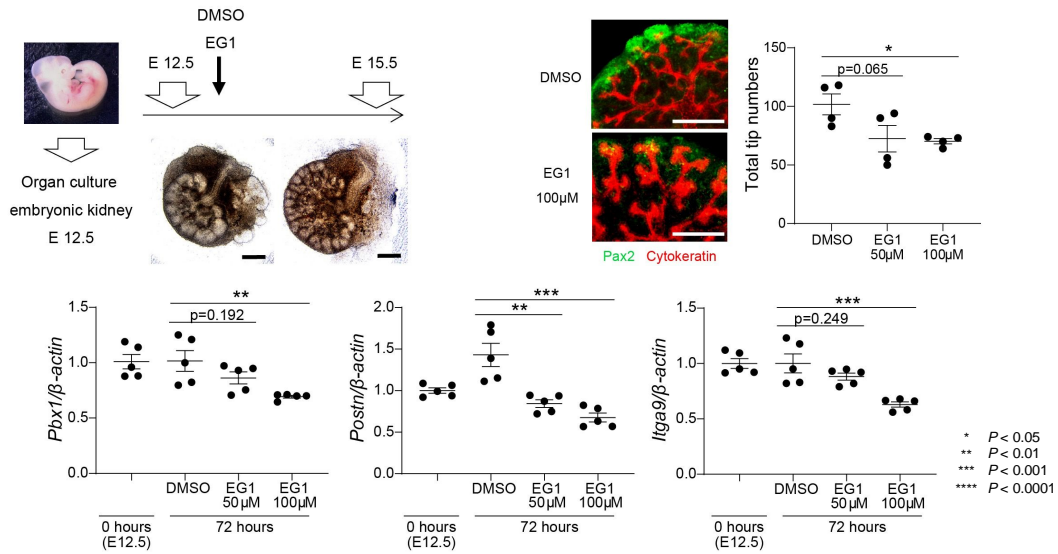
さらに候補遺伝子の絞り込みを行うため、継時的なリアルタイム PCR、マウス器官培養を用いた Pax2 遺伝子の阻害実験などを行った。リアルタイム PCR による検討では、CAGE 解析で得られた結果と同様の発現パターンが再現可能であった。さらに PAX2 と同じく day14 に発現増強する遺伝子群を確認するため、day0 および day14 に加えて day9, day11 の発現推移を確認した。PAX2 遺伝子と同様に day11 から day14 にかけて遺伝子発現増強が見られ、疾患例では発現増強が抑制されている複数の候補遺伝子を同定した (図 3)。

図 3



さらにマウス胎生 12.5 日の後腎を採取および器官培養し、PAX2 阻害薬である EG1 の投与を行うことで、腎発生過程における PAX2 遺伝子の影響を評価した。PAX2 阻害薬である EG1 の投与に伴い、尿管芽の分岐数は減少した。さらに、これまでの iPS 細胞を用いた実験で抽出した候補遺伝子のうち、Pbx1, Postn, Itga9 が EG1 投与に伴い濃度依存性に低下することを確認した (図 4)。

図 4



以上より、腎発生過程において PAX2 遺伝子と関連が深いと推測される遺伝子として PBX1 , POSTN ,および ITGA9 を同定した . 今回の研究を通じて得たヒト腎発生過程における PAX2 制御遺伝子に関するデータは、希少疾患である遺伝性腎疾患の新規原因遺伝子同定に有用な知見である。さらに、PAX2 遺伝子が関与する腎障害後の再生過程など、より広く存在する腎疾患へ適応できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuta Yamamura, Kengo Furuichi, Yasuhiro Murakawa, Shigeki Hirabayashi, Masahito Yoshihara, Keisuke Sako, Shinji Kitajima, Tadashi Toyama, Yasunori Iwata, Norihiko Sakai, Kazuyoshi Hosomichi, Philip M Murphy, Atsushi Tajima, Keisuke Okita, Kenji Osafune, Shuichi Kaneko, Takashi Wada	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of candidate PAX2-regulated genes implicated in human kidney development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 9123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-88743-1.	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

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山村雄太、古市賢吾、岩田恭宜、坂井宣彦、和田隆志
2. 発表標題 腎コロボーマ症候群特異的iPS細胞の遺伝子発現解析
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年～2021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
---------	---------