

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	堀川 彩
学位授与の日付	平成31年3月31日	
論文名	A splicing variant of small nucleolar RNA host gene 4 is a novel non-coding RNA detectable in injured urinary podocytes (Small nucleolar RNA host gene 4 のスプライシングバリエーションは障害を受けた尿中ポドサイトに検出可能な新規 non-coding RNA である)	
論文審査委員	主査	乾 隆
	副査	青木 考
	副査	秋吉 秀保
	副査	石橋 宰

論文要旨

序章

腎疾患の多くは初期段階では自覚症状がほとんどなく、異常に気づいた段階では病状が進行していることが多い。さらに、慢性的に障害を受け続け機能が低下した腎臓の機能を回復させる技術は、腎移植以外確立されていない。そのため、腎疾患の治療は安静、保温、薬物療法、食事療法などによって腎臓への負担を減らし、腎不全への移行を防ぐ対症療法が主流である。しかしながら、腎障害の初期段階において適切な食事療法を行った場合の予後は良好であることから、早期の腎障害の診断、およびその病態管理が腎不全への移行を防ぐための重要な課題であると位置づけられている。腎臓の組織を直接採取し、組織評価を行う腎生検は、糸球体病変を含めた腎疾患を正確に評価する強力な診断方法であるが、腎生検はその高い侵襲性から適応対象や回数に制限が存在する。近年、腎機能評価の新たな尿バイオマーカーが見出されているものの、それらの多くは尿細管の病変に関するものであり、糸球体病変を特異的、かつ直接的に評価可能なバイオマーカーは未だ同定されていない。

ポドサイト（腎糸球体上皮細胞）は、腎臓の糸球体に存在する終末分化細胞である。ポドサイトはその形態的特徴である足突起をポドサイト同士で組み合わせ、スリット膜を形

成することで腎臓の糸球体で行われる血液濾過における最終濾過障壁として機能している。そのため、ポドサイトに障害が生じた際は重篤な蛋白尿を発症することが知られている。さらに、ポドサイトの尿中への脱落によるポドサイト数の減少が複数の腎症の進行と関係していることが報告されており、障害を受け尿中へと脱落したポドサイトは腎障害の早期発見のためのバイオマーカーとして有用であると期待が高まっている。しかしながら、その特異的検出を可能にするマーカー遺伝子の多くは、ポドサイトの障害とともに発現が減少することが報告されている。一方、近年蛋白質をコードしない non-coding RNA (ncRNA) が様々な生理学的、および病理学的プロセスに関与することが報告されている。また、様々な病態と関連して発現量が変動する ncRNA も多く報告されており、そのバイオマーカーとしての応用を視野に入れた研究が盛んに行われている。

本研究では、障害を受け脱落した尿中ポドサイトの検出による糸球体障害の診断を目指し、初代培養ポドサイトに対する次世代シーケンサーを用いたゲノムワイド遺伝子発現解析 (RNA-seq) によって、ncRNA を含めた新規糸球体障害マーカー候補遺伝子を網羅的に探索した。さらに、RNA-seq により得られたバイオマーカー候補遺伝子について、ポドサイト障害との関連性の検討、および腎障害モデル動物と腎疾患動物より採取した尿からの検出を試み、バイオマーカーとしての有用性を検討した。

第一章 ポドサイト選択的に発現する新規 ncRNA の同定

ポドサイト選択的な障害を誘導することで知られる puromycin aminonucleoside (PAN) を曝露した初代培養ポドサイトを用いた RNA-seq により、ポドサイト選択的に発現する PAN 誘導性遺伝子の探索を行った。初代培養ポドサイトは、鉄粉入りの PBS によって灌流した Wistar ラットの腎臓より磁気を利用して糸球体を単離し、培養することで生育した細胞を継代することによって得た。この細胞がポドサイトとしての性質を保っているか評価するため、免疫蛍光染色法によってポドサイトのマーカータンパク質である podocin、および Wilms' tumor protein 1 (WT1) を染色した。その結果、podocin は細胞の辺縁部に、WT1 は核に強い蛍光が確認され、それぞれの蛍光が既知の局在と一致したことから、得られた細胞がポドサイトとしての性質を保っていることが確認された。初代培養ポドサイトに対して、PAN を 24 時間曝露することで障害を誘導し、細胞生存率、lactate dehydrogenase (LDH) 放出、および Caspase-3/7 活性の評価を行った。その結果、PAN 濃度依存的な細胞生存率の減少、および Caspase-3/7 活性の上昇が認められた。一方、LDH の放出は認められなかったことから、先行研究と同様に PAN はポドサイトに対してアポトーシス型細胞死を引き起こすことを確認した。RNA-seq においては、重篤な細胞障害を示す前の段階における遺伝子発現を調べるため、PAN 濃度は細胞毒性試験において細胞毒性を示さない最大濃度である 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした。RNA-seq の結果、PAN によって発現が上昇する遺伝子を 7 種類、PAN によって発現が減少する遺伝子を 96 種類同定した。これらの遺伝子について Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) を用いたパスウェイ解析を行ったところ、PAN による遺伝子発現変動は細胞接着に関わるパスウェイに関連しており、PAN がポドサイトの細胞骨格の分解および基底膜剥離を引き起こすというこれまでの報告と一

致した。しかしながら、PAN によって発現が上昇した遺伝子としてポドサイト特異的な遺伝子は同定できなかった。そのため、未アノテーション転写領域についても解析を行ったところ、small nucleolar RNA host gene 4 (*Snhg4*) の第 3 イントロン領域が転写されており、この転写産物の発現は PAN によって上昇していることが示唆された。そのため、*Snhg4* と未知転写産物についてラットにおける発現組織分布を RT-qPCR によって評価したところ、*Snhg4* は全身に広く発現していた一方、未知転写産物はポドサイトおよび脾臓に選択的に発現することが明らかとなった。そこで未知転写産物を *Snhg4-pod* と命名し、PAN 誘導性ポドサイト障害における発現変動を RT-qPCR により解析した結果、*Snhg4-pod* は PAN 濃度依存的に発現が上昇していた。さらに、5'-および 3'-RACE 法によって *Snhg4-pod* の全長配列を決定した。その結果、*Snhg4-pod* は *Snhg4* と第 1 エクソン、および第 2 エクソンが共通していた。一方、*Snhg4-pod* の第 3 エクソンは *Snhg4* の第 3 エクソン、および第 3 イントロン領域を含む配列を有していることが明らかとなった。しかしその 3'末端配列は一定ではなく、複数種類の配列が認められた。そこで、*Snhg4-pod* における poly(A) 鎖の有無を検討したところ、*Snhg4-pod* は poly(A) 鎖を持たないことが示唆され、このことにより 3'末端が分解を受けやすく不安定になっていると推測された。以上の結果から、ポドサイト選択的に発現しており、ポドサイト障害によって発現が誘導される遺伝子として、新規の ncRNA である *Snhg4-pod* を同定することに成功した。

第二章 *Snhg4-pod* のバイオマーカーとしての応用の検討

第一章において同定した新規 ncRNA である *Snhg4-pod* のバイオマーカーとしての有用性を、ポドサイト障害との関連性や腎障害動物の尿沈渣からの検出によって評価した。PAN 誘導性ポドサイト障害はミトコンドリア障害を伴うことが報告されている。そのため、PAN を曝露したポドサイトにおいてミトコンドリア障害が起きているか免疫蛍光染色によるシトクロム *c* の放出評価、および qPCR によるミトコンドリア DNA 量の比較によって検討した。その結果、PAN 曝露によってシトクロム *c* の蛍光が減弱したため、ミトコンドリアからのシトクロム *c* の放出が引き起こされていることが推察された。さらに、PAN 曝露によるミトコンドリア DNA 量の有意な減少が認められたため、PAN を曝露したポドサイトにおいてミトコンドリア障害が生じていることを確認した。そこで、ミトコンドリア障害と *Snhg4-pod* との関連性を検討するために、シトクロム *c* オキシダーゼを阻害することでミトコンドリア障害を引き起こすことが知られているアジ化ナトリウムをポドサイトに曝露し、細胞毒性試験、Caspase-3/7 活性評価、および *Snhg4-pod* 発現量の比較を行った。その結果、アジ化ナトリウムは PAN と同様に、細胞生存率の低下や Caspase-3/7 活性の上昇、および *Snhg4-pod* の発現上昇を誘導した。このことから、PAN 誘導性ポドサイト障害に伴う *Snhg4-pod* の発現誘導は、ミトコンドリア障害と関連していることが示唆された。

次に、腎障害モデルラットの尿沈渣から単離した RNA を用いて RT-PCR による *Snhg4-pod* の検出を試みた。PAN を単回腹腔内投与することによって作製した腎障害モデルラットは、尿中総蛋白質量、および尿中蛋白質濃度がそれぞれ投与後 5 日目、および 7 日目をピークとした一過性の病態を示した一方で、*Snhg4-pod* は PAN 投与後 7 日目、およ

び10日目の尿沈渣において検出された。さらに、臨床検体である腎疾患のイヌの尿沈渣において *Snhg4-pod* が検出可能かどうかを検討した。その結果、腎疾患のイヌの尿沈渣より *Snhg4-pod* に相当する転写産物を検出することに成功した。以上の結果より、*Snhg4-pod* はポドサイトのミトコンドリア障害と関連して発現が誘導され、実験的腎障害モデルである PAN 投与ラットや臨床検体である腎疾患のイヌの尿沈渣に含まれる尿中ポドサイトを検出可能であることが示唆された。

結論

本研究において、ポドサイト選択的に発現し、さらに PAN 誘導性ポドサイト障害によって発現が誘導される新規 ncRNA として、*Snhg4* のスプライシングバリエーションである *Snhg4-pod* を同定した。ポドサイトの障害に伴う *Snhg4-pod* の発現誘導はミトコンドリア障害と関連していることが示唆された。さらに、PAN 投与によって作製した腎障害モデルラットの尿沈渣から、その病態にตอบสนองして検出されること、および臨床検体である腎疾患のイヌの尿沈渣からも *Snhg4-pod* に相当する転写産物が検出可能であることを明らかとした。以上の結果より、*Snhg4-pod* が障害を受け尿中へ脱落したポドサイトを検出可能な新規糸球体障害マーカーとなり得る可能性を示した。

審査結果の要旨

腎疾患の多くは初期段階では自覚症状がほとんどなく、異常に気づいた段階では病状が進行していることが多い。現在、慢性的に障害を受け続け機能が低下した腎臓の機能を回復させる治療法は、腎移植以外確立されていない。そのため、腎疾患の治療は腎臓への負担を減らし、腎不全への移行を防ぐ対症療法が主流である。しかし、腎障害の初期段階において適切な食事療法を行った場合の予後は良好であることから、早期の腎障害の診断およびその病態管理が重要な課題である。ポドサイトは高度に分化した終末分化細胞であり、糸球体の血液濾過における濾過障壁として重要な役割を有している。そのため、ポドサイトの障害は重篤な蛋白尿の発症へとつながる。さらに、障害を受けたポドサイトは尿中へ脱落し、その尿中ポドサイト数は複数の腎症の進行と相関することが近年報告されている。そこで、本学位申請者は、障害を受け脱落した尿中ポドサイトの検出による糸球体障害の診断を目指し、初代培養ポドサイトに対するゲノムワイド遺伝子発現解析 (RNA-seq) によって、新規糸球体障害マーカー候補遺伝子を網羅的に探索した。さらに、得られた候補遺伝子について、バイオマーカーとしての有用性を検討した。

第一章では、ポドサイト選択的に障害を誘導することが知られている puromycin aminonucleoside (PAN) に曝露した初代培養ポドサイトを用いた RNA-seq により、ポドサ

イト選択的に発現する PAN 誘導性遺伝子の探索を行った。その結果、PAN によって発現が上昇する遺伝子を 7 種類、および PAN によって発現が減少する遺伝子を 96 種類同定した。これらの遺伝子についてパスウェイ解析を行ったところ、PAN による遺伝子発現変動は細胞接着に関わるパスウェイに関連しており、PAN がポドサイトの細胞骨格の分解および基底膜剥離を引き起こすというこれまでの報告と一致した。しかし、PAN によって発現が上昇した遺伝子として、ポドサイト特異的な遺伝子は同定できなかったため、未アノテーション転写領域についても解析を行ったところ、non-coding RNA (ncRNA) である *small nucleolar RNA host gene 4 (Snhg4)* の第 3 インترون領域を含む未知転写産物の存在が示唆された。そこで、*Snhg4* と未知転写産物の発現組織分布を RT-qPCR によって検討した結果、前者はほぼ全身で発現するのに対し、後者はポドサイト選択的に発現していた。5'-および 3'-RACE 解析の結果、本転写産物は *Snhg4* のスプライスバリエーションであることが判明したため、これを *Snhg4-pod* と命名した。次に、PAN により障害を誘導した培養ポドサイトにおける *Snhg4-pod* の発現変動を検討したところ、PAN 誘導性ポドサイト障害に伴って *Snhg4-pod* の遺伝子発現レベルが上昇することが示された。以上より、ポドサイト選択的に発現し、且つポドサイト障害によって発現が誘導される遺伝子として、新規 ncRNA である *Snhg4-pod* を同定することに成功した。

第二章では、第一章において同定した *Snhg4-pod* のバイオマーカーとしての有用性を、ポドサイト障害との関連性や腎障害動物の尿沈渣からの検出によって評価した。シトクロム *c* オキシダーゼを阻害することによりミトコンドリア障害を引き起こすことが知られているアジ化ナトリウムにポドサイトを曝露した結果、アジ化ナトリウムは PAN と同様に、細胞生存率の低下や Caspase-3/7 活性の上昇および *Snhg4-pod* の発現上昇を誘導した。以上の結果と PAN がポドサイトのミトコンドリア障害を誘導するというこれまでの報告から、ポドサイトにおいて PAN が惹起する *Snhg4-pod* の発現はミトコンドリア障害と関連していることが示唆された。次に、PAN の腹腔内投与により腎障害モデルラットを作製し、尿沈渣からの *Snhg4-pod* の検出について検討した結果、*Snhg4-pod* は病態の進行の指標の 1 つである尿中蛋白質量がピークとなる投与後 7 日目および 10 日目の尿沈渣においてのみ検出された。さらに、腎疾患のイヌの尿沈渣において *Snhg4-pod* に相当する転写産物が検出可能か検討したところ、当該 RNA を検出することに成功した。以上の結果から、*Snhg4-pod* はポドサイトのミトコンドリア障害と関連して発現が誘導されること、および実験的腎障害モデルである PAN 投与ラットや、臨床検体である腎疾患を患うイヌ由来の尿沈渣に含まれる尿中ポドサイトを検出可能であると考察した。

本申請論文は、ポドサイト障害に伴い発現が誘導される ncRNA である *Snhg4-pod* を初めて同定した画期的な研究であり、腎疾患に伴うポドサイト障害の鑑別診断や早期発見のためのバイオマーカー候補として期待される。これらの知見は診断薬開発を含めた創薬科学に大きく貢献するものである。したがって、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。