

1細胞RNA-seq解析を用いたAKI to CKDの病態解明と治療応用: 健康長寿の実現に向けて

大阪大学大学院医学系研究科 遺伝学
特任助教（常勤） 南 聡

はじめに

従来急性腎障害（Acute kidney injury; AKI）は自然治癒する予後良好な疾患であると考えられてきたが、近年の臨床研究によりAKIは慢性腎臓病（Chronic kidney disease; CKD）に至る予後不良な病態であることが判明した（AKI to CKDとよばれる）^(1, 2)。AKIはその頻度が非常に高く、CKDは完成すると治療法の限られる疾患であることからAKI to CKDの病態解明やCKDへの進展予防は臨床的に非常に重要である。

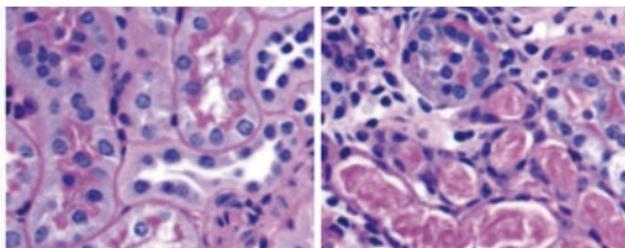
AKI to CKDの病態には腎臓を構成する様々な細胞における、様々なシグナリング経路が関係していることが知られている⁽³⁾が、その中でも近位尿細管細胞がAKI to CKDにおいて中心的な役割を果たすことが明らかとなりつつある^(4, 5)。AKI後近位尿細管細胞は脱分化し死に至った尿細管細胞を補うべく増殖したのちに再分化することにより修復に関わる一方で、近位尿細管細胞の中には脱分化、増殖した後に再分化異常をきたすことにより萎縮に至り線維化促進因子を分泌しCKDの進展を促進するsubpopulationが存在することが明らかとなった⁽⁶⁾。

近年、1細胞RNAseq解析技術が目覚ましい進歩を遂げ1細胞RNAseqデータを用いた最先端の解析により細胞の分化過程の推定し各分化過程を制御するドライバー遺伝子を同定することが可能となってきた。そこで申請者は1細胞RNAseq解析により近位尿細管細胞が障害を受けた後、尿細管の修復や萎縮を制御するドライバー遺伝子を同定することを目指し研究を開始した。

結 果

まず腎動脈をクリップにて血行遮断することにより虚血を行い、その後クリップを外すことにより再灌流障害を惹起した。様々な虚血時間やその後の経時的な腎臓のサンプリング・組織学的評価により、虚血時間を35分、IRI後2週間の時点において著明な腎線維化を認めることを明らかとし、このモ

図 1



同一マウス個体内における虚血再灌流障害 2 週間後の近位尿細管細胞の拡大像。左図の近位尿細管細胞は形態学的には完全に修復されている。右図の近位尿細管細胞は著明に萎縮しており修復がうまく働かなかったことが示唆される。

デルをAKI to CKDマウスモデルとして確立した。またこのマウスモデルにおいて近位尿細管は同一個体内であってもAKI後に完全に修復される細胞と、修復がうまく働かず萎縮に至る細胞に二分されること（図1）を明らかとした。次にマウスのsham、IRI2日後、5日後、14日後の腎臓の1細胞RNAseq解析を1万細胞/sample、5万リード/細胞で実施した。腎構成細胞をサブクラスタリングしたところ腎臓は13種類の細胞から構成されることが明らかとなった（図2）。さらに近位尿細管細胞をサブクラスタリングするとPCT（proximal convoluted tubule；近位曲尿細管）という近位尿細管の腎表層に近いセグメントが8個、PST（proximal straight tube；近位直尿細管）という腎深層に近い近位尿細管のセグメントが4個のクラスターに分類された（図3）。引き続き近位尿細管細胞のRNA velocity解析⁽⁷⁾を行うとPSTは1方向性の分化の軌道をたどるのに対して、PCTはある起点から2方向に分岐していくことが明らかとなった（図4）。また2つの終着点のトランスクリプトームを検証したところ、一方は血管新生やマトリックスモデリングに関する因子を高発現するような「Repaired Cluster」、もう一方は炎症性サイトカインを高発現しCKDへの進展を増悪させるような「Unrepaired Cluster」であることが分かった（図5）。さらに各サブクラスターにおける高発現変動遺伝子（dynamic gene: unspliced/spliced RNA比の高い遺伝子）上位100遺伝子を抽出し、修復尿細管へ向かうサブクラスターと修復不全尿細管へ向かうサブクラスターを比較することにより、尿細管修復に直接関わるドライバー候補遺伝子を34遺伝子同定した。

図2

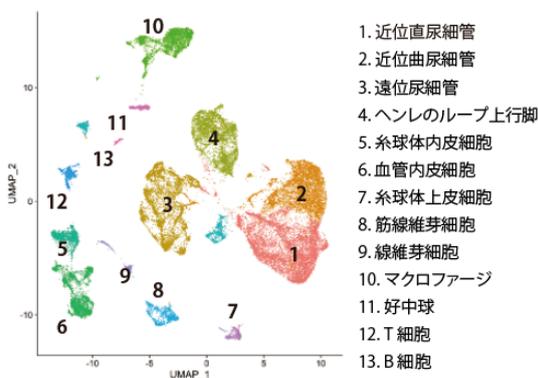


図3

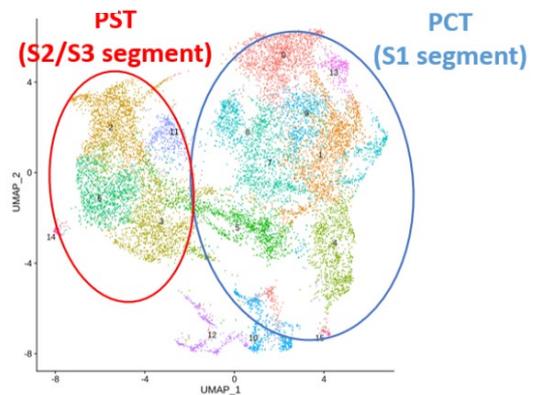


図4

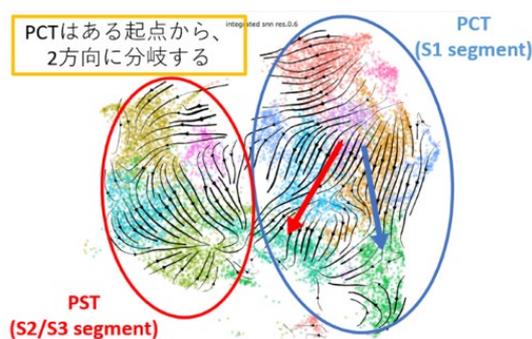
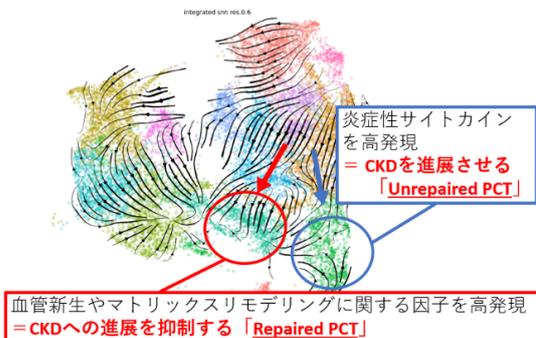


図5



考 察

従来、AKI to CKDにおけるPSTとPCTとの役割の違いは不明であったが、今回の結果からはPCTがAKI to CKDに中心的な役割を果たすことが示唆された。またAKI後の尿細管細胞の増殖にはPCTが中心的な役割を果たすことが示唆された（図6）。本研究により尿細管修復に直接関わるドライバー候補遺伝子を34 遺伝子同定した。今後は34個抽出しているドライバー遺伝子の中から、培養細胞や腎オルガノイドを用いた二次スクリーニングを用いることによりAKI to CKDの進行に重要な因子を抽出する方針である。また今回の研究で確定した尿細管細胞サブクラスターと他の腎構成細胞間の相互作用の全体像をリガンド-受容体遺伝子発現パターンを解析することにより抽出した後、細胞共培養実験・ヒト腎生検組織・遺伝子改変マウスなどを用いた包括的な解析によりAKI to CKD transitionに重要な因子の同定を行っていきたいと考えている。

要 約

今回1細胞RNA-seq解析を用いることによりAKI to CKDの病態解明を行った。その結果、①PSTはAKI後、Repairするか細胞死に至るという運命をたどるのに対して、PCTは、Repaired PCTとUnrepaired PCTの2方向に分化すること、また②Unrepaired PCTから炎症性サイトカインが放出され、線維化に至ること、がわかった。また本研究により尿細管修復に直接関わるドライバー候補遺伝子を34 遺伝子同定したため今後AKI to CKDに重要な因子の同定を行っていく。

文 献

1. Leung KC, Tonelli M, James MT: Chronic kidney disease following acute kidney injury-risk and outcomes. *Nat Rev Nephrol*, 9: 77-85, 2013
2. Coca SG, Singanamala S, Parikh CR: Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Kidney Int*, 81: 442-448, 2012
3. Basile DP, Bonventre JV, Mehta R, Nangaku M, Unwin R, Rosner MH, Kellum JA, Ronco C, ADQI XIII Work Group: Progression after AKI: understanding maladaptive repair processes to predict and identify therapeutic treatments. *J Am Soc Nephrol*, 27: 687-697, 2016
4. Takaori K, Nakamura J, Yamamoto S, Nakata H, Sato Y, Takase M, Nameta M, Yamamoto T, Economides AN, Kohno K, Haga H, Sharma K, Yanagita M: Severity and frequency of proximal tubule injury determines renal prognosis. *J Am Soc Nephrol*, 27: 2393-2406, 2016
5. Liu BC, Tang TT, Lv LL, Lan HY: Renal tubule injury: a driving force toward chronic kidney disease. *Kidney Int*, 93: 568-579, 2018
6. Venkatachalam MA, Weinberg JM, Kriz W, Bidani AK: Failed tubule recovery, AKI-CKD transition,

and kidney disease progression. *J Am Soc Nephrol*, 26: 1765-1776, 2015

7. La Manno G, Soldatov R, Zeisel A, Braun E, Hochgerner H, Petukhov V, Lidschreiber K, Kastrioti ME, Lönnerberg P, Furlan A, Fan J, Borm LE, Liu Z, van Bruggen D, Guo J, He X, Barker R, Sundström E, Castelo-Branco G, Cramer P, Adameyko I, Linnarsson S, Kharchenko PV: RNA velocity of single cells. *Nature*. 560: 494-498, 2018