

令和 3 年 12 月 6 日

若手研究者海外挑戦プログラム報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

受付番号 202180041

氏名 加世田 将大

(氏名は必ず自署すること)

若手研究者海外挑戦プログラムによる派遣を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。
なお、下記記載の内容については相違ありません。

記

- 1 派遣先: 都市名 マンチェスター (国名 英国)
- 2 研究課題名 (和文) : シングルセル解析により発見した糸球体腎炎治療候補因子の網羅的・薬理的検証
- 3 派遣期間: 令和3年6月2日 ~ 令和3年11月27日 (179日間)
- 4 受入機関名・部局名: University of Manchester · Division of Cell Matrix & Regenerative Medicine
- 5 派遣先で従事した研究内容と研究状況 (1/2 ページ程度を目安に記入すること)

Alport症候群は糸球体基底膜を構成するIV型コラーゲンの遺伝子変異により発症する難治性の糸球体腎炎である。現行の治療はrenin-angiotensin-system (RAS) 阻害剤による抗タンパク尿を基本とした対症療法であるが、効果は不十分であり、最終的に患者の大半は末期腎不全への移行を余儀なくされる。また、Alportの発症は糸球体基底膜の構造異常に端を発すものの、その後の病態進行過程には未だ不明な点が多く、有効な治療標的は同定されていない。このような背景のもと、私はAlportモデルマウスを活用した糸球体シングルセル解析により、病態形成機構に基づく新規治療標的を複数同定した。

派遣先の研究機関においてはゼブラフィッシュを活用した新規治療標的因子の評価と連続断面走査型電子顕微鏡 (SBF-SEM) を活用した糸球体構造の評価に従事した。ゼブラフィッシュは哺乳類と類似した3次元の糸球体構造を有する、遺伝子改変が容易、低コスト、多産、ライフサイクルが早いなどの特徴を併せ持つことから、新たな腎疾患モデルとして注目されている。派遣先のRachel研究室ではAlportの表現型を呈するゼブラフィッシュモデルを確立しており (Naylor RW *et al.*, *bioRxiv*. 2021), 私は糸球体シングルセル解析により同定した新規治療標的をCRISPR Cas9によりKnock downすることで、Alport病態における役割の解明に取り組んだ。期間内に有望な創薬標的を同定するまでには至らなかったが、帰国後も継続的な共同研究を実施していただけることになっている。また、SBF-SEMを活用した糸球体構造の評価では糸球体シングルセル解析を実施したAlportモデルマウスの病理をより詳細に捉えることに成功し、シングルセル解析の結果の解釈において重要な知見になるだけでなく、今後の解析においても強力なツールとなると考えられた。

6. 研究成果発表等の見通し及び今後の研究計画の方向性 (1/2 ページ程度を目安に記入すること)

派遣期間において得られた結果の一部を13th International podocyte conference (2021年7月27-31日), Kidney week2021 (2021年11月4-7日), The 2021 online International Workshop on Alport syndrome (2021年11月30日-12月4日)において発表し, 帰国後も複数の国内学会にて成果を発表予定である. また, 下記に示す展開を経て, 研究成果を国際誌に投稿予定である.

(1) Alportモデルゼブラフィッシュ (Naylor RW *et al.*, *bioRxiv*. 2021) を活用し, 腎機能評価を行う. 1細胞期の胚に対し, CRISPR Cas9による標的遺伝子の過剰発現・ノックダウンを行った後, 十分な排尿が開始する4日時点で各個体を96-well plateにて24時間飼育し, 内因的に発現させたNano-luc標識タンパク質のメディウム中への漏出量を指標にタンパク尿を測定する. 上記の検討で効果が認められた因子に関して, 糸球体病理評価と電子顕微鏡を活用したポドサイトの詳細な病理評価 (糸球体ろ過に重要な足突起構造の確認) を実施し, 治療候補因子のさらなる絞り込みを行う.

(2) 同定した因子を標的に, Alportモデルマウスに対する薬効評価を行う. 標的とする因子の活性を制御可能な化合物がある場合は創薬への発展を優先してそれらを使用し, 無い場合にはアデノウイルスベクターやアンチセンスオリゴヌクレオチドによる遺伝子の活性化・不活性化を行う. 経時的な腎機能測定 (タンパク尿, 血漿クレアチニン, GFR) と病理評価 (糸球体障害・炎症・線維化) に加えて, qRT-PCRやWestern Blotting, 免疫染色を用いて標的因子の活性効率と腎組織・糸球体内の局在を明らかにする. また, 電子顕微鏡を活用した3次元構造解析(SBF-SEM)を実施し, より定量的かつ微細にポドサイトの形態学的変化を捉える.

7. 本プログラムに採用されたことで得られたこと (1/2 ページ程度を目安に記入すること)

私は, これまでに国際学会や旅行等で短期間海外に行く機会があったが, 長期間にわたって海外の研究室で研究を行うという経験は今回が初めてであった. 今回の派遣では, ピザの申請や住居の手配, 銀行カードの発行といった1連の手続きを自ら行う必要があり, 異国の地で生活基盤を整えることの難しさを体験することができた. 一方で, 周囲の方々に様々な形で助けていただきながら, これらの手続きを進めることを通して, 英語でのコミュニケーションに少し自信をつけることができた.

研究環境について国内の所属研究室と異なる設備, ルールに戸惑うことが多々あった. 特に実験施設や機器を初めて扱う際には, ほとんどの場合で新たに講習を受ける必要があり, 研究のセットアップに多くの時間を要したが, 研究室や大学独自のノウハウを学ぶことができ, 結果として良い機会になったと考えている. 派遣先のRachel研究室は3名のスタッフ, 6名のポスドク, 2名の医師兼博士学生, 1名の博士学生から構成されており, メンバーそれぞれが多様なテーマを持って研究に取り組んでいる. 2週に1度のPIとの個人ミーティングと毎週の全体ミーティング, 2週に1度の査読会が行われており, 私も研究室の1員として同様のスケジュールでの生活をさせていただいた. 1つの結果に関する解釈や今後の展望に関して, 参加する全員が活発に議論する姿勢には大きな刺激を受けた. また, 多くのメンバーが効率を重視して短時間に集中して仕事を行っており, ワークライフバランスを考えながら仕事をする事の重要性を学ぶことができた. 研究室内にはフランス, ドイツ, ブラジル, 中国を含む留学生がおり, これらのメンバーとの交流を通して, 日本文化について再考するとともに, 異国の文化についての理解を深めることの重要性を学んだ.

以上の様に, 本プログラムによる派遣を通して, 研究面・生活面で非常に多くの経験をする事が出来た. この経験をもとに, 今後も真摯にかつ貪欲に研究活動に取り組み, Alport症候群を含む慢性腎臓病の治療薬開発に貢献できるよう日々研鑽を積んでいきたい. 末筆ながら, 本プログラムによる支援をいただきました日本学術振興会ならびに派遣先のRachel Lennon博士に, 心より感謝申し上げます.