

平成 30 年 5 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18987

研究課題名(和文)長鎖ncRNA MALAT1を標的とした慢性腎臓病治療戦略開発に向けた研究

研究課題名(英文)The role of MALAT1 in the pathogenesis of chronic kidney disease

研究代表者

尾花 理徳(OBANA, Masanori)

大阪大学・薬学研究科・助教

研究者番号：50745883

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):慢性腎臓病の病態発症機構の解明を目指し、長鎖ncRNA MALAT1の腎臓における役割について検討した。MALAT1は、腎疾患病態モデル動物で発現上昇したが、P2X7R 欠損マウスでは抑制された。この時、腎傷害の抑制も認められた。培養ポドサイトを用いた検討から、P2X7RのリガンドであるLL-37はMALAT1の発現を上昇させ、また細胞死も誘導した。腎臓において、MALAT1はLL-37/P2X7Rの下流シグナルとして、細胞死に関連する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文):Chronic kidney disease (CKD) is a leading cause of kidney failure and cardiovascular diseases. Although there is an unmet medical need for CKD treatments, the mechanisms of physiological and pathological changes of kidney remain to be elucidated. Recently, attention has been drawn to noncoding RNA (ncRNA) as therapeutic targets and biomarkers of diseases. In the present study, we examined the role of MALAT1, long ncRNA, in kidney diseases. The expression of MALAT1 was increased in a mouse model of kidney disease. The kidney injury was suppressed in P2X7R knockout mouse, accompanied by reduced expression of MALAT1. LL37, a ligand of P2X7R, increased MALAT1 expression and induced cell death in cultured podocyte. Our study suggests the possibility that MALAT1, as a downstream signal of LL37/P2X7R, may contribute to cell death in kidney diseases.

研究分野：腎循環病態学

キーワード：慢性腎臓病 長鎖ncRNA

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD) は、我が国において成人の 8 人に 1 人、すなわち 1330 万人が罹患しており、新たな国民病として位置づけられている。今後、超高齢社会を迎えるにあたり、患者数は急増すると推測される。しかしながら、CKD の病態は複雑であり、有用なバイオマーカーや治療標的が不十分であるのが現状である。

近年、創薬ターゲットやバイオマーカーとして miRNA をはじめとした noncoding RNA (ncRNA) に期待が高まっている。Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1) は哺乳類間で高度に保存された、核内構造体スペックルに発現する長鎖 ncRNA (lncRNA) であり、がん細胞の転移などの細胞運動性や血管新生の制御に関与することが報告されている。しかし、腎疾患病態への関与やその機能は不明であった。

2. 研究の目的

CKD の病態形成における MALAT1 の関与を検討する。さらに、腎疾患治療標的としての可能性を追究するため、腎臓における MALAT1 のシグナル関連や機能を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

動物実験は、大阪大学薬学研究科動物実験委員会の承認のもとに行った。

腎病態モデルマウスとして、マウス一側尿管結紮 (UUO) モデル及び老齢モデルを用いた。UUO は、吸入麻酔下、C57Bl/6 マウスの背部より皮膚を切開し、左腎側の尿管を結紮することで作製した。老齢モデルは、12 ヶ月齢以上として用いた。

マウス腎臓細胞は、マウスから腎臓を採材後、liberase (collagenase/II, neutral protease) 処理により単離、培養した。2 度の継代後、実験に用いた。その他、培養細胞として、ラット腎臓細胞株 (NRK49F)、マウスポドサイト細胞株を用いて、腎臓細胞と MALAT1 との関連性を評価した。

4. 研究成果

(1) CKD 病態における MALAT1 の発現変動の検討

CKD 病態と MALAT1 の関連性を探るべく、マウス腎臓線維症モデルである UUO モデルを作製した。UUO 後、1、3、7、14 日後に腎臓を採材し、RNA を精製、DNaseI 処理後、MALAT1 の mRNA 発現量を real time PCR 法を用いて解析した。その結果、UUO 後、経時的に腎臓中の MALAT1 発現が上昇することが明らかとなった (図 1A)。他方、加齢は CKD のリスクファクターであり、加齢により腎機能は低下することが知られている。そこで加齢腎における MALAT1 の発現についても評価した。その結果、若齢 (2 ヶ月齢) のマウス腎と比べて、

加齢 (12 ヶ月) のマウス腎において、MALAT1 の発現が顕著に上昇することが明らかとなった (図 1B)。

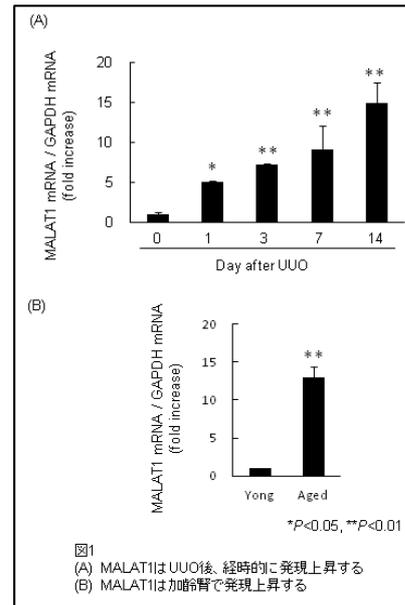


図1 (A) MALAT1はUUO後、経時的に発現上昇する (B) MALAT1は加齢腎で発現上昇する

(2) MALAT1 の発現上昇メカニズム及び重症度との相関

次に、MALAT1 の発現上昇メカニズムや UUO モデルの病態形成における MALAT1 の関与を評価するため、P2X7R に着目した。P2X7R はイオンチャネル型 ATP 感受性プリン受容体であり、P2X7R KO マウスでは UUO による線維化や炎症に対して抵抗性を示すことが報告されている (Kidney Int. 2006; 70: 1599-1606)。そこで、P2X7R KO マウスに UUO 手術を施し、7 日目に MALAT1 発現を解析した。その結果、P2X7R KO マウスにおいて MALAT1 の有意な発現低下が認められた。よって、MALAT1 は P2X7R の下流で発現制御を受けている可能性が示唆された。さらに、P2X7R KO マウスでは、UUO 後の炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$ ) の発現抑制が認められ、MALAT1 と炎症との関連性が認められた。

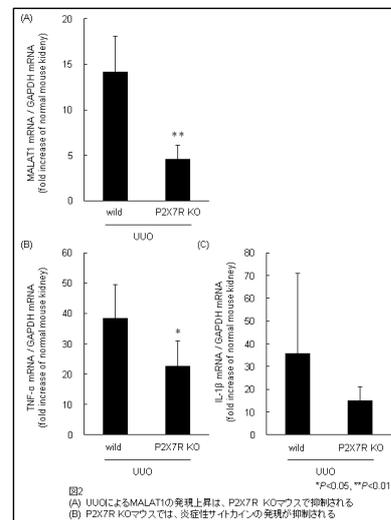


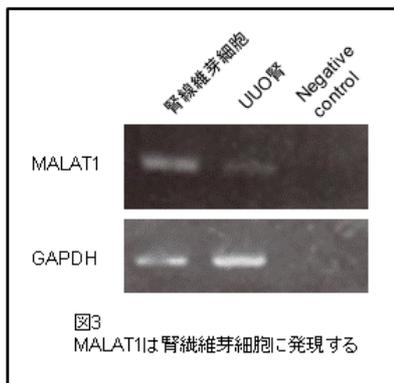
図2 (A) UUOによるMALAT1の発現上昇は、P2X7R KOマウスで抑制される (B) P2X7R KOマウスでは、炎症性サイトカインの発現が抑制される

### (3) MALAT1 の発現局在

MALAT1 の発現局在を検討するべく、正常マウス及び UUO 後 7 日の腎臓切片を用いて、in situ hybridization を行った。その結果、MALAT1 は正常腎及び線維化腎においてユビキタスに発現していた。そのため、UUO 時の腎病態形成に關与する MALAT1 発現細胞を同定することはできなかった。

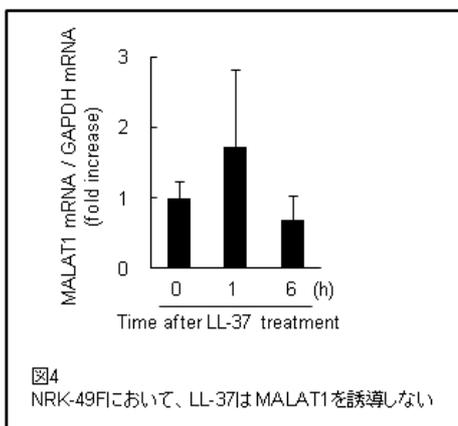
### (4) 腎線維芽細胞における MALAT1

UUO では顕著な線維化を中心とした組織傷害が惹起される。そこで、線維化に中心的役割を担う腎間質の線維芽細胞に着目し、検討を行った。C57Bl/6 マウスの腎臓を採材し、liberase 処理により初代線維芽細胞を単離、培養した。二度の継代以降、QIAzol を用い細胞を回収し、RNA を精製した。PCR 法により MALAT1 の発現を検討したところ、腎線維芽細胞において MALAT1 が発現することが明らかとなった。



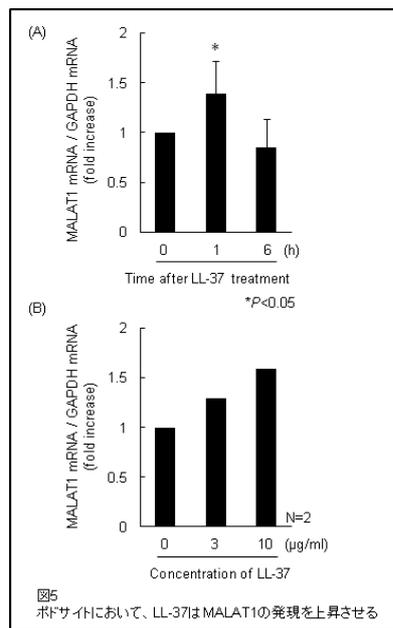
本検討で単離した、マウス初代培養腎線維芽細胞は、その増殖速度が遅く、また継代毎に形質の安定性に懸念があったため、その後の線維芽細胞を用いた検討においては、スループットの観点からラット腎線維芽細胞株 NRK-49F を用いた。

上述の通り、P2X7R により、MALAT1 の発現が制御されている可能性がある。そこで、NRK-49F 細胞に、P2X7R のリガンドとされる抗菌ペプチド LL-37 (10 $\mu$ g/ml) を添加し、1、6 時間後における MALAT1 の発現を解析した。その結果、NRK-49F において、LL-37 は MALAT1 の発現を誘導しなかった。



### (5) ポドサイトにおける MALAT1

UUO では、ネフロン全体に傷害が及ぶこと、また加齢腎では糸球体肥大が認められたことから、次に、ポドサイトに着目し、検討を行った。ポドサイトとは、糸球体での血液濾過において、最終濾過障壁として知られている細胞である。そこで、マウスポドサイト細胞株を培養し、LL-37 (10 $\mu$ g/ml) を添加し、1、6 時間後における MALAT1 の発現を解析した。その結果、LL-37 添加 1 時間後において、MALAT1 の有意な発現上昇が認められた (図 5)。また、LL-37 を 0、3、10 $\mu$ g/ml の濃度で添加した際、濃度依存的に MALAT1 の発現が上昇した。



次に、ポドサイトにおける LL-37/MALAT1 シグナルの病態生理学的意義を検討した。ポドサイトに 10 $\mu$ g/ml の LL-37 を添加したところ、添加後 6 時間において、顕著な細胞死が認められた。そこで、MALAT1 との関連が報告されつつある ER ストレスやアポトーシスなどの細胞死関連因子の発現を検討した。LL-37 (10 $\mu$ g/ml) 添加により、Beclin1、GRP78、Bcl-2、Bcl-xL の発現が上昇傾向にあった。なお、P2X7R KO マウスで認められた炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ) の発現変動は、LL-37 を添加したポドサイトでは認められなかった。

今後は、LL-37/P2X7R の下流因子としての MALAT1 の機能を、siRNA や shRNA 発現レンチウイルスを用いて明らかにする予定である。なお、申請者は、ポドサイト細胞において shRNA 発現レンチウイルスを用いた発現抑制系の構築に成功している。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計 3件)

(1) Enomoto D, Matsumoto K, Yamashita T, Kobayashi A, Maeda M, Nakayama H, Obana M, Fujio Y. ROR  $\alpha$ -expressing cells attenuate cardiac remodeling after myocardial infarction. PLoS One. 12(8):e0183584, 2017.

(2) Miyawaki A, Obana M, Mitsuhara Y, Orimoto A, Nakayasu Y, Yamashita T, Fukada SI, Maeda M, Nakayama H, Fujio Y. Adult murine cardiomyocytes exhibit regenerative activity with cell cycle reentry through STAT3 in the healing process of myocarditis. Scientific Reports. 7(1):1407, 2017.

(3) Miyawaki A, Mitsuhara Y, Orimoto A, Nakayasu Y, Tsunoda S, Obana M, Maeda M, Nakayama H, Yoshioka Y, Tsutsumi Y, Fujio Y. Moesin is activated in cardiomyocytes in experimental autoimmune myocarditis and mediates cytoskeletal reorganization with protrusion formation. American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology. 311(2):H476-86, 2016. 査読有

〔学会発表〕(計 1件)

守沖 瞳、尾花理徳、山本彩葉、金本聡自、前田真貴子、今泉和則、中山博之、藤尾慈  
腎線維化病態における転写因子 OASIS の役割 第 132 回 日本薬理学会近畿部会  
2017 年 11 月 24 日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)  
の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

研究代表者 尾花 理徳

(OBANA, Masanori)

大阪大学薬学研究科・助教

研究者番号: 50745883

(2) 研究分担者: 該当なし

(3) 連携研究者: 該当なし

(4) 研究協力者: 該当なし