

令和 2 年 5 月 4 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09601

研究課題名(和文) 糸球体上皮細胞障害におけるmiR-143の役割の解明

研究課題名(英文) Involvement of hsa-miR-143 in podocyte injury by TGF-beta

研究代表者

坂入 徹 (Sakairi, Toru)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20455976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：TGF-βは、腎臓の糸球体上皮細胞を障害し腎臓病の発症に寄与している。一方、microRNAは、特定のターゲット遺伝子の発現を抑制する働きがある。

申請者らは、TGF-βを作用させた培養糸球体上皮細胞において、microRNAのhsa-miR-143が上昇すること、また、hsa-miR-143が細胞の正常機能に必要な転写因子のWT1の発現を抑制することを見出した。また、hsa-miR-143はTGF-βのシグナル伝達分子のSmad2/3/4の活性を部分的に上昇させた。以上より、hsa-miR-143は、TGF-βの作用を増幅することによって糸球体上皮細胞障害に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性腎症や巣状糸球体硬化症といった難治性の腎臓病の進行にTGF-βが関与していることは以前から知られているが、そのメカニズムは十分には解明されていない。本研究により、TGF-βが、hsa-miR-143の上昇を介して糸球体上皮細胞を障害し、これらの腎臓病を惹起することが示唆された。将来、尿中のhsa-miR-143の測定を行い、これらの腎臓病で上昇することが証明されれば、診断や病勢マーカーとして使用できる可能性がある。更に、miR-143のアンチセンスの導入や、何らかの薬剤によって腎臓内のhsa-miR-143の上昇を抑制することが、将来これらの腎臓病の治療となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：TGF-beta contributes to podocyte injury in FSGS and diabetic nephropathy. MicroRNAs are small non-coding RNAs that repress translation of target mRNAs. We sought to identify miRNAs involved in podocyte injury induced by TGF-beta. For discovery, we performed miRNA profiling of the cultured human podocytes treated with TGF-beta1 using a miRNA microarray. Among miRNAs, hsa-miR-143 had the largest increase. We next performed quantitative RT-PCR, and validated the increase in hsa-miR-143 by TGF-beta. We next assessed the function of hsa-miR-143, using lentiviral expression. TGF-beta1 increased expression of COL1A1 mRNA and decreased that of WT1 mRNA and protein. Ectopic expression of hsa-miR-143 also increased expression of COL1A1 mRNA and decreased expression of WT1 mRNA and protein. In conclusion, TGF-beta1 induced hsa-miR-143 expression in cultured human podocytes and up-regulated hsa-miR-143 may mediate the induction of COL1A1 and the repression of WT1 by TGF-beta1.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：micro-RNA hsa-miR-143 糸球体上皮細胞 TGF-β 巣状糸球体硬化症 糖尿病性腎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国における慢性透析患者は約33万人に達し、それにかかる膨大な医療費は大きな社会的問題となっている。しかしながら糖尿病性腎症を含めた腎疾患の進行を阻止する治療法は限られており、新たな治療法の開発が急務である。

TGF- β を作用させた糸球体上皮細胞では、アポトーシスが誘導されること (Schiffer M, et al. J Clin Invest. 2001) や、ミトコンドリア機能異常が起こること (Abe Y, et al. Am J Physiol Renal Physiol. 2013) が報告されている。また、糖尿病性腎臓病や巣状分節性糸球体硬化症患者の糸球体上皮細胞では TGF- β の発現が増強しており (Kim JH, et al. Kidney Int 2003. Umezono T, et al. J Nephrol 2006)、TGF- β は、糸球体上皮細胞における autocrine/paracrine 因子としてこれらの疾患の発症と進行に関与していると考えられている。

WT1 は糸球体上皮細胞に発現している転写因子で、WT1 の遺伝子変異により巣状分節性糸球体硬化症やびまん性メサンギウム硬化症などの遺伝性糸球体疾患を発症することから、糸球体上皮細胞の分化や正常機能維持に必要な分子と考えられている。研究代表者らは、培養細胞とモデルマウスを用いて、TGF- β が WT1 を低下させることにより糸球体上皮細胞障害を惹起する可能性があることを報告した。

microRNA は、転写後遺伝子発現調節を担う small non-coding RNA で、ターゲット遺伝子の mRNA の 3' UTR に結合することで、真核生物では主に mRNA から蛋白への翻訳を阻害する。近年、主に悪性腫瘍や発生・分化における microRNA の発現や役割についての知見が集積し、悪性腫瘍の診断ツールとして実用化しつつある。一方で、腎疾患、特に糖尿病性腎臓病においても、microRNA の関与を示す報告があるが (Dewanjee S, et al. Biochem Pharmacol 2018)、まだ充分とはいえない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、TGF- β による糸球体上皮細胞障害に microRNA がどのように関与しているかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

不死化ヒト培養糸球体上皮細胞 (Dr. Moin Saleem より提供) に 5ng/mL の TGF- β 1 を作用させ、24 時間後に microRNA を含んだ RNA を抽出し、microRNA microarray により microRNA のプロファイリングを行った。

microRNA microarray の結果で有意に上昇していた hsa-miR-143 に着目し、定量的 PCR 法によって、時間依存的な上昇を確認した。

レンチウイルスベクターを用いて不死化培養糸球体上皮細胞に hsa-miR-143 を強制発現させ、細胞内の mRNA や蛋白の変化を測定しすることで、hsa-miR-143 上昇の機能的意義を調べた。

4. 研究成果

TGF- β 1 を作用させた不死化ヒト培養糸球体上皮細胞で microRNA microarray を行ったところ、有意な上昇あるいは減少を示す microRNA が複数同定された (図1)。この中で、最も変化率が高く、上昇を示した hsa-miR-143 に着目し解析を進めることとした。

次に、TGF- β 1 を作用させた不死化ヒト培養糸球体上皮細胞を用いて hsa-miR-143 の定量的 PCR 法を行ったところ、時間依存性の有意な上昇が観察された (図2)。このことにより microarray の結果が確認された。

続いて、TGF- β 1 による hsa-miR-143 上昇の機能的な意義を調べるため、レンチウイルスベクターを用いて hsa-miR-143 を強制発現させた糸球体上皮細胞を用いて、転写因子 WT1 の定量的 PCR とウエスタンブロット、および、型コラーゲンの定量的 PCR を行った。その結果、hsa-miR-143 を強制発現した糸球体上皮細胞においては、コントロールの糸球体上皮細胞と比べ、WT1 の mRNA と蛋白が減少し、型コラーゲンの mRNA が増加することが分かった (図3)。これは糸球体上皮細胞に TGF- β 1 を作用させた時と同じ方向の変化であることから、hsa-miR-143 が TGF- β 1 の作用を仲介している可能性が示された。

続いて、hsa-miR-143 が、TGF- β 受容体の下流でシグナル伝

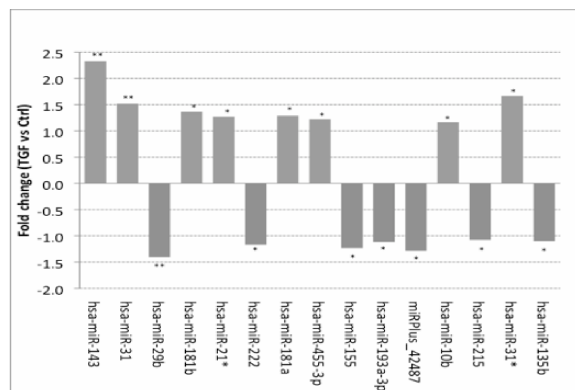


図1. TGF- β を作用させた培養糸球体上皮細胞の microRNA プロファイル (マイクロアレイ)

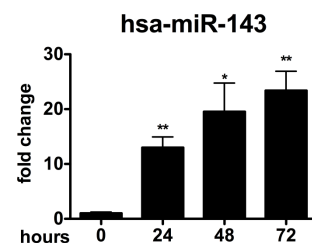


図2. 定量的 RT-PCR. TGF- β は miR143 の発現を上昇させる。

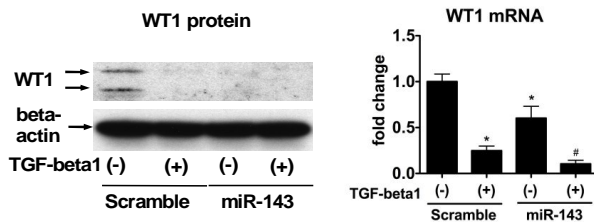


図3. miR-143の強発現により糸球体上皮細胞におけるWT1の発現が低下する。

達を担う Smad2/3/4 複合体の転写活性に影響を与えるかどうかを調べるために、hsa-miR-143 を強制発現させた糸球体上皮細胞を用いて、Smad-binding element のルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、hsa-miR-143 を強制発現させた糸球体上皮細胞では、コントロールの糸球体上皮細胞と比べ、Smad-binding element から誘発されるルシフェラーゼ活性の上昇が高かった。以上より、hsa-miR-143 は部分的に Smad の転写活性を上昇させることが示された (図 4)。

我々の研究により、TGF- β 1 が hsa-miR-143 を上昇させること、hsa-miR-143 が Smad2/3/4 複合体の転写活性を増強させ、WT1 の低下や Ⅲ型コラーゲンの上昇を引き起こすことが示された。hsa-miR-143 が、TGF- β 1 による糸球体上皮細胞障害に寄与していることが示唆された。

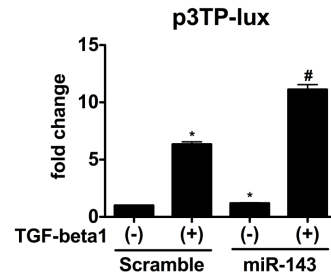


図4. miR-143の強発現により Smadの転写活性が増強する (ルシフェラーゼアッセイ)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|