

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08197

研究課題名(和文)慢性腎臓病進展におけるDicerの役割解明と新規治療標的の探索

研究課題名(英文)The role of Dicer in the progression of chronic kidney disease and search for new therapeutic targets

研究代表者

中川 直樹 (Naoki, Nakagawa)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10451460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、新たな国民病として注目されている「慢性腎臓病(Chronic kidney disease: CKD)」の病態進展機序および新たな治療標的を探索することを目的とし、腎臓のメサンギウム細胞、血管平滑筋、血管周細胞、間質線維芽細胞などに発現している PDGFR 陽性細胞の Dicer の役割に注目し、CKD病態進展における細胞障害メカニズムを解明することによって、新規バイオマーカーおよび新規治療標的を探索した。PDGFR 陽性細胞特異的 Dicer欠損マウスを用いた検討により、腎間質線維化の進展に、miR-9-5-p/Pdgfrb系等が関与していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新たな国民病として注目されている「慢性腎臓病(Chronic kidney disease: CKD)」の新たな治療標的の候補因子が抽出されてきており、国民の健康寿命延伸、QOL維持向上に寄与し得る社会的意義の高い研究成果が得られている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to explore the pathogenic mechanism and and new therapeutic targets of "Chronic kidney disease (CKD)", which is attracting attention as a new national disease. By focusing on the role of Dicer, which is an RNase that processes precursor of microRNAs, in PDGFR -positive cells and elucidating the mechanism of cytotoxicity in the progression of CKD, we searched for new biomarkers and new therapeutic targets. Studies using PDGFR -positive cell-specific Dicer-deficient mice revealed that the miR-9-5-p/Pdgfrb system is involved as a key target in the progression of renal interstitial fibrosis.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：慢性腎臓病 線維化 microRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性腎臓病 (chronic kidney disease : CKD) は、透析予備群となるだけでなく、心血管病の危険因子でもある。国内外の多くの研究グループが、CKD の進展機序を明らかにする研究に取り組んでいるが、腎臓病進展を抑制する創薬は十分ではない。

申請者は、アルポート症候群マウスにおける抗 microRNA-21 オリゴ核酸の治療効果を明らかにし【Gomez IG, Nakagawa N, et al. J Clin Invest. 125:141-56, 2015】、腎発生過程における間質前駆細胞の Dicer および microRNA の役割を解明してきた【Nakagawa N, et al. Kidney Int. 87:1125, 2015】。microRNA をプロセッシングする Dicer は、CKD の進展においても重要な役割を果たしていることが想定されるが、その役割は不明である。

(2) PDGFR $\beta$  は腎臓ではメサンギウム細胞、血管平滑筋、血管周細胞、間質線維芽細胞に発現しており、CKD の進展において、糸球体硬化や間質の線維化に関与している。本研究では、PDGFR $\beta$  陽性細胞における Dicer に注目し、PDGFR $\beta$ -CreER マウスと Dicer floxed マウスを掛け合わせることで、PDGFR $\beta$  陽性細胞特異的 Dicer ノックアウトマウスを作成し、CKD モデルにおけるフェノタイプを検証する。さらにコントロールと比し変容する microRNA をスクリーニングすることで、新規バイオマーカーおよび新規治療標的を探索する。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究は、腎臓のメサンギウム細胞、血管平滑筋、血管周細胞、間質線維芽細胞などに発現している PDGFR $\beta$  の Dicer の役割に注目し、CKD を「PDGFR $\beta$  陽性細胞における Dicer-microRNAs 異常病」として捉え、その細胞障害メカニズムを解明することによって、新規バイオマーカーおよび新規治療標的を探索することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) PDGFR $\beta$  陽性細胞特異的 tdtomato マウスの作成および評価

PDGFR $\beta$  遺伝子のプロモーター制御下で Cre リコンビナーゼを発現するマウス (PDGFR $\beta$ -CreER マウス : Jackson laboratory より購入) と、Rosa26-tdtomato マウス (既に購入・繁殖済み) を交配し、PDGFR $\beta$ ; Rosa26-tdtomato マウスを作成し、tdtomato がメサンギウム細胞、血管平滑筋、血管周細胞、間質線維芽細胞などの PDGFR $\beta$  陽性細胞特異的に発現していることを抗 PDGFR $\beta$  抗体を用いた免疫組織染色で確認する。さらに、尿管結紮モデル・虚血再灌流モデルを作成し、PDGFR $\beta$  陽性細胞の系譜追跡を行った (図 1)。

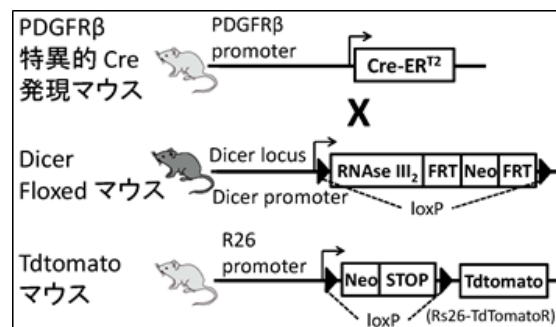


図 1 PDGFR $\beta$  特異的 Dicer 遺伝子改変マウスの作成

(2) PDGFR $\beta$  陽性細胞特異的 Dicer 欠損マウスの作成および Phenotype の評価

PDGFR $\beta$ -CreER マウスと、Dicer をコンディショナルに欠損するマウス (Jackson laboratory より購入) を交配し、PDGFR $\beta$  陽性細胞特異的に Dicer を欠損させたマウス (PDGFR $\beta$ ; Dicer floxed) を作成し (図 1)、病態形成前の Phenotype を生理学的、生化学的、病理学的に評価した。

(3) PDGFR $\beta$ ; Dicer floxed マウスを用いた CKD モデルでの Phenotype の評価

PDGFR $\beta$ ; Dicer floxed マウスを用いて、CKD モデルにおける PDGFR $\beta$  陽性細胞の Dicer が病態形成における役割を明らかにする。タモキシフェン投与 (モデル作成 1 週間前より 2mg/日を 5 日間、連日投与) により、病態形成前と同様、生理学的、生化学的、病理学的に詳細に評価する。一側尿管結紮 (UUO) 後 7 日目のコントロールマウス腎および PDGFR $\beta$ ; Dicer floxed マウス腎 microRNA および mRNA の網羅的マイクロアレイ解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 2018 年度および 2019 年度は本学動物実験施設の改修工事により、また 2020 年度には本学動物実験施設が本格運用したものの、新型コロナウイルス感染症の流行拡大による施設内の入場制限があり、当初の予定より進行が大幅に遅れた。2020 年度には SPF 環境下での PDGFR-CreER マウスおよび PDGFR $\beta$ -CreER;tdtomato マウス、PDGFR $\beta$ -CreER;Dicer1-floxed マウスの交配・繁殖が順調に進捗し、

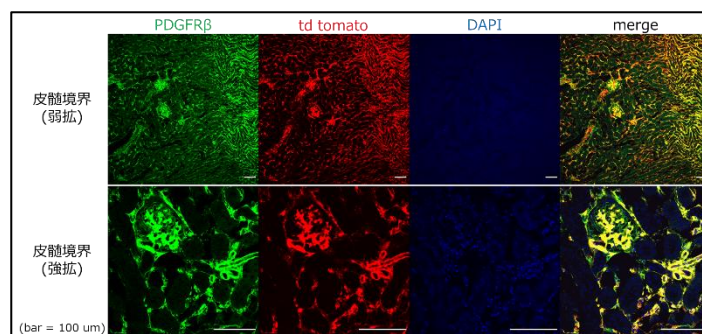


図 2 PDGFR $\beta$  特異的 tdtomato マウスの作成

PDGFR $\beta$ -CreER;tdtomato マウスによる PDGFR $\beta$  陽性細胞の系譜を確認した (図 2)。抗 PDGFR $\beta$  抗体との Merge 率は高く、PDGFR $\beta$ -Cre が正しく作動していることを確認できた。

(2) PDGFR $\beta$ -CreER;Dicer floxed を用いた UUO モデルを作成 (結紮後 4 日目:UUO d4、7 日目:UUO d7) し、組織学的な解析を進めた (図 3)。PDGFR $\beta$ -CreER;Dicer floxed マウスでは、コントロールマウスに比し、腎間質線維化 (Picro-Sirius red 染色: PSR) が有意に増悪し (図 4)、PDGFR $\beta$  陽性領域も有意に高値を認めた (図 5)。

一方、炎症細胞浸潤 (F4/80 染色) に両群間で有意差は認めなかった。

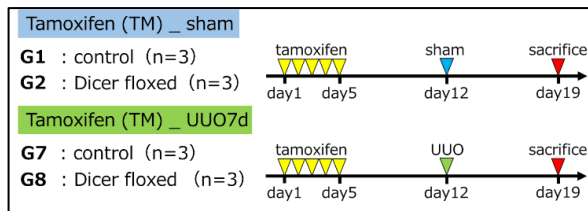


図 3 Tamoxifen 投与と UUO モデル作成スケジュール

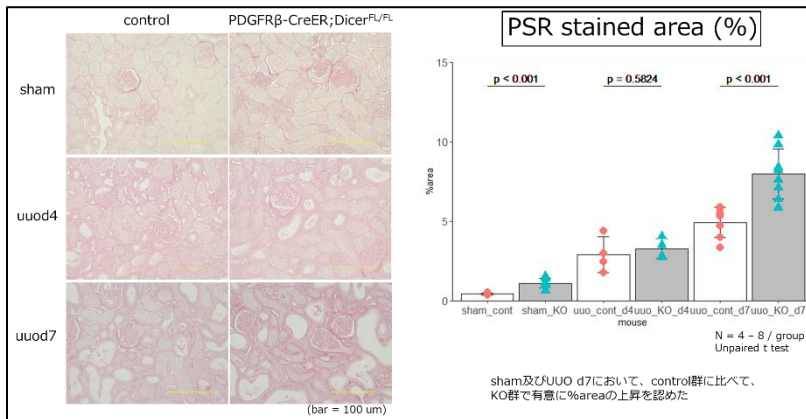


図 4 PDGFR $\beta$  特異的 Dicer floxed マウスは腎間質線維化が増悪する

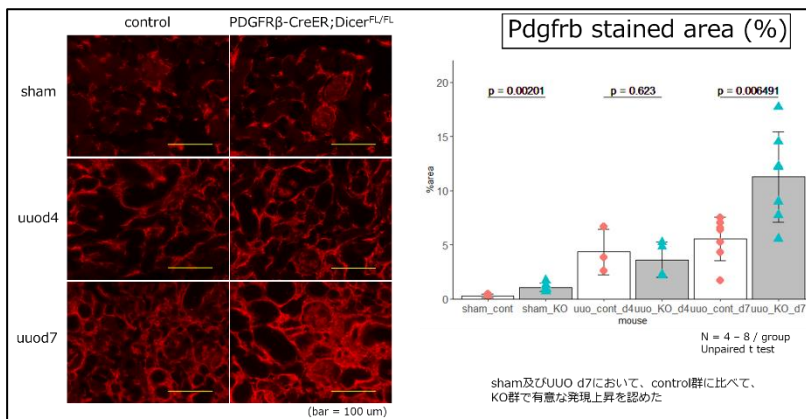


図 5 PDGFR $\beta$  特異的 Dicer floxed マウスは間質の PDGFR $\beta$  陽性領域が増大する

(3) 次にコントロールマウスおよび PDGFR $\beta$ -CreER;Dicer floxed マウスでの UUO 病態進展における標的因子を検索するため、mRNA アレイおよび miRNA アレイを行った。Sham では、コントロールマウスと PDGFR $\beta$ -CreER;Dicer floxed マウス間に有意に変化を認めた mRNA および miRNA は認めなかったが、UUO d7 においては、コントロールマウスに比し、PDGFR $\beta$ -CreER;Dicer floxed マウスでは発現上昇 mRNA は 298 個、発現低下 mRNA は 171 個認め (図 6)、発現上昇 miRNA は 8 個、発現低下 miRNA は 14 個認めた (図 7)。

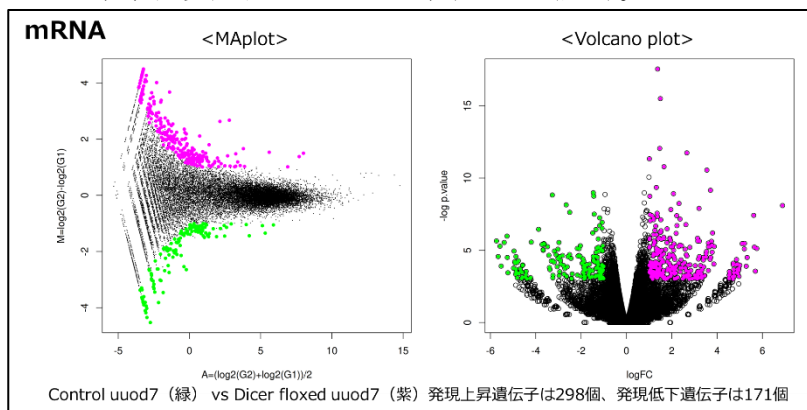


図 6 Control と PDGFR $\beta$  特異的 Dicer floxed マウスの UUO d7 の mRNA アレイ解析

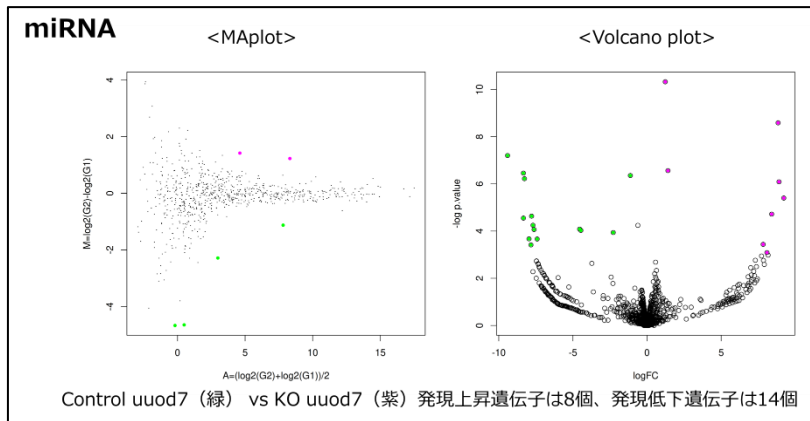


図7 ControlとPDGFRβ特異的Dicer floxedマウスのUUO d7のmiRNAアレイ解析

(4) 次にコントロールマウスおよびPDGFRβ-CreER;Dicer floxedマウスでの標的因子を検索するため、mRNAアレイおよびmiRNAアレイにおいてp値で上位/下位top20のmRNA(図8左)、miRNA(図8右)を抽出し、miR-9-5-p/*Pdgfrb*系等が病態形成に関与していることが示唆された。



図8 ControlとPDGFRβ特異的Dicer floxedマウスのUUO d7のmRNA(左)miRNAアレイ(右)ヒートマップ

今後さらに病態形成に関与している可能性の高いmiRNA/mRNAにつき解析を進める予定である。

(5) 最終的に現在進行中のin vivo、in vitroの解析を推進し、学会発表および論文化を進めていく予定である。

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1件

|                      |                 |
|----------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>中川 直樹      | 4. 発行年<br>2019年 |
| 2. 出版社<br>北隆館        | 5. 総ページ数<br>6   |
| 3. 書名<br>BIO Clinica |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|