

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08220

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症におけるmicroRNAによるRAGEシグナルをターゲットとする治療

研究課題名(英文) Treatment targeting RAGE signal by microRNA in diabetic nephropathy

研究代表者

萩原 晋二 (Hagiwara, Shinji)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70445568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：最終糖化産物(AGE)は、AGE受容体(RAGE)を介して線維化を促進し糖尿病性腎症進展に大きく関与している。我々は糖尿病性腎症において腎保護作用が示されているRAGEノックアウトマウスのメサンギウム細胞において高発現していたmiR-199aに注目した。マウスメサンギウム細胞でmiR-199aの過剰発現によりPAI-1の発現が減少し、発現抑制によりPAI-1の発現が上昇した。また、TGF- $\beta$ 刺激によりmiRNA-199aの発現量は減少したことからmiR-199aはメサンギウム細胞では抗線維化作用が示唆された。データベースからPAI-1がmiRNA-199aのターゲット遺伝子であると推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

miRNAは細胞シグナルを調整するメディエーターであり、腎障害が出現する以前にそのプロファイルに変化が認められるため、そのプロファイルの解析により早期に腎障害を予測できる可能性がある。また糖尿病性腎症の線維化に関連するmiRNAを解析することで、早期診断およびmiRNAを用いた新しい治療法を開発することは、末期腎不全に対する腎代替療法の医療費削減にも有用であると考えられる。

申請者からこれまで糖尿病性腎症に対して腎保護作用が示されているRAGE KOマウスにおいて過剰発現したmiRNAを同定しており、着目したmiRNAの糖尿病性腎症における影響を検証することは非常に興味深いと考えている。

研究成果の概要(英文)：Advanced glycation end product (AGE) promotes fibrosis via AGE receptor (RAGE) and is greatly involved in the development of diabetic nephropathy. We focused on miR-199a, which was highly expressed in the mesangial cells extracted from RAGE knockout mouse that was shown to be protected against diabetic nephropathy. Overexpression of miR-199a in mouse mesangial cells decreased PAI-1 expression, and knocking down of miR-199a increased PAI-1 expression. In addition, TGF- $\beta$  stimulation reduced the expression of miRNA-199a. As a result of comparing the expression levels of fibrotic markers, it was suggested that miR-199a has an antifibrotic effect in mesangial cells. It has been predicted that PAI-1 is the target gene for miRNA-199a from the database (TargetScan) and will be confirmed using the 3'UTR reporter assay in the future.

研究分野：糖尿病性腎症

キーワード：糖尿病性腎症 miRNA RAGE PAI-1

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病において最終糖化産物(AGE)は、AGE 受容体(RAGE)を介して炎症や線維化を促進し腎症進展に大きく関与している。一方で、microRNA (miRNA)は特定の生物学的経路のシグナル伝達において様々なレベルの標的遺伝子の発現を調節し、細胞機能に変化を与えることで疾患に影響を与えることが可能である。ここ数年で糖尿病性腎症に関するmiRNAはいくつか報告されており、治療法としての可能性についても注目されている。これまで、申請者らはmiRNA-214と腎線維化の関連についての研究を行い、その抗線維化作用について報告してきた。一方で、miR-214と同じclusterであるmiRNA-199aと糖尿病性腎症に関連する論文は報告されていない。また、現時点で腎症に関連するmiRNAを使用した治療法は確立されておらず、本研究でmiRNAによる腎線維化改善効果が証明できれば、今後糖尿病性腎症の新たな治療戦略となり得る。

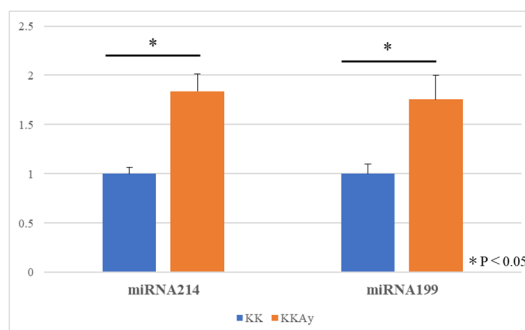
### 2. 研究の目的

miRNAは細胞シグナルを調整するメディエーターであり、障害が出現する以前にそのプロファイルに変化が認められるため、そのプロファイルの解析により早期に腎障害を予測できる可能性がある。また糖尿病性腎症の線維化に関連するmiRNAを解析し、糖尿病性腎症の早期診断およびmiRNAを用いた新しい治療法の開発は、今後の医療に有用と考えられる。これまで申請者らは、糖尿病性腎症の腎保護作用が示されているRAGEノックアウト(KO)マウスにおいてmiRNA-214/miR-199aが過剰発現していることを見出した。本研究ではmiRNA-214およびmiR-199aを用いて糖尿病性腎症に対する改善効果を検証する事を目的とする。

### 3. 研究の方法

*in vivo*においては、自然発症2型糖尿病モデルマウス(KK、KK-Ay/TaJcl)を用いて15週齢におけるmiRNAの発現量を比較したところ、右記のように最も糖尿病が重症化するKK-Ayマウスで有意差をもってmiR-214/199aの発現量が増加していた(図1)。そこで、KK-Ayマウスを用いて更に早期に線維化を惹起させるUUO(片側尿管結紮術)を行い、疑似miRNAの投与を行い生体内での効果を確認する。また、*in vitro*においては、標的miRNA-199aの過剰発現や発現抑制を行い線維化マーカーの比較を比較し、更にはデータベースを用いてmiRNA-199aのターゲット遺伝子を同定する。

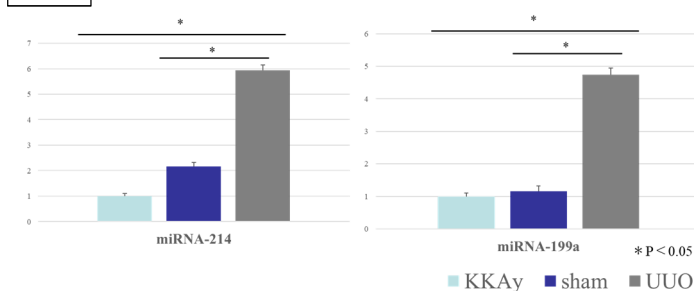
図1



### 4. 研究成果

これまでの研究で*in vitro*でmiR-214に抗線維化作用があることを示した。KK、KK-Ay/TaJcl 15週齢におけるmiRNAの発現量を比較したところ、最も糖尿病が重症化するKK-AyマウスにおいてmiRNA-214/199aが約2倍程度上昇していた。

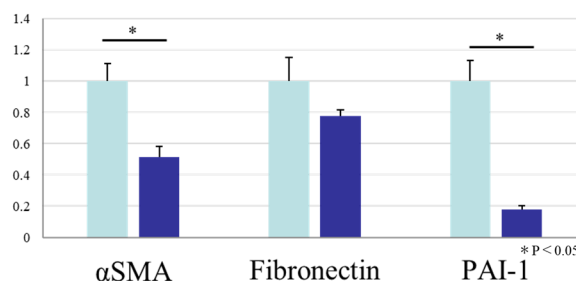
図2



更に、UUOを施行したところ、上記二つのmiRNAがコントロール群と比較して約5倍程度に上昇していることが示された(図2)。そこで、*in vivo*において疑似miRNA-214の投与を試みたが、腎臓への導入に難渋したために*in vitro*におけるmiRNA-199aと線維化の関与についての研究を進めた。

図3

### miR-199a Overexpression in MMC



マウスメサンギウム細胞で miR-199a の過剰発現により線維化関連遺伝子の  $\alpha$ SMA、PAI-1 はコントロールと比較して有意に減少し、発現抑制で PAI-1 は 1.2 倍の発現上昇が認められた(図 3,4)。また、TGF- $\beta$  の刺激により、miRNA-199a の発現は低下した(図 5)。以上の結果より miR-199a がメサンギウム細胞では、抗線維化作用を有する事が示唆された。データベース (TargetScan) において、PAI-1 が miRNA-199a のターゲット遺伝子であることが推定されるため、現在 3'UTR レポーターアッセイを用いて確認している。更に今後 miR-214 と miR-199a による腎線維化をターゲットとした糖尿病性腎症への有用性を検討する予定である。

図 4

miR-199a knockdown in MMC

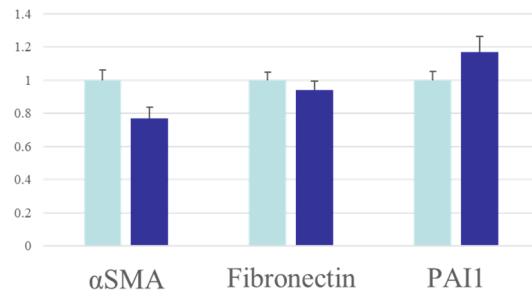
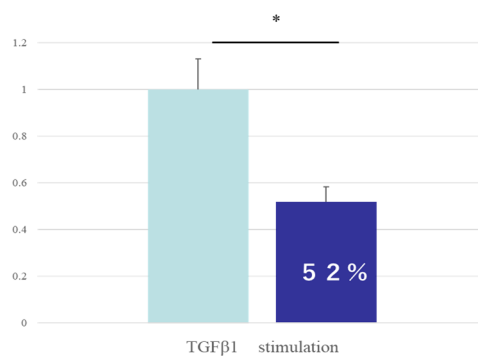


図 5

miR-199a expression levels under TGF $\beta$ 1 stimulation



\* P < 0.05

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakuma Hiroko, Hagiwara Shinji, Kantharidis Phillip, Gohda Tomohito, Suzuki Yusuke	4. 巻 11
2. 論文標題 Potential Targeting of Renal Fibrosis in Diabetic Kidney Disease Using MicroRNAs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2020.587689	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shinji Hagiwara, Yusuke Suzuki, Tomohito Gohda, Kazuhiko Funabiki, Mark Cooper, Phillip Kantharidis
2. 発表標題 THE EXPRESSION AND THE ROLE OF MICRORNA IN RAGE KNOCK OUT MOUSE MESANGIAL CELLS
3. 学会等名 World Congress of Nephrology 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------