

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08303

研究課題名(和文)急性・慢性腎障害後の腎線維化に対するMicroRNA-21を用いた新規治療薬開発

研究課題名(英文)Development of a new therapeutic drug using MicroRNA-21 for renal fibrosis after acute / chronic renal injury

研究代表者

川崎 幸彦 (Kawasaki, Yukihiko)

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：00305369

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)：LPSと志賀毒素を用いHUSモデルマウスを作製し、投与後6時間と72時間のマウス腎臓からtotal RNAを抽出しマイクロアレイにて解析した。LPS/Stx2投与後、血小板減少と腎機能低下が認められた。マイクロアレイによる遺伝子発現解析では、コントロールと比較してTNF receptor-1/2, iNOS, およびIL-6シグナル伝達経路の活性化がみられた。一方、LPS/Stx2投与72時間後では遠位ネフロンに存在するトランスポーターやレセプター遺伝子の発現低下を認めた。生理および分子学的所見からHUSモデルマウスの遠位尿細管2および結合集合管および皮質集合管の主細胞損傷が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により、生理および分子学的所見からHUSモデルマウスの遠位尿細管2および結合集合管および皮質集合管の主細胞損傷が明らかになった。間質障害は明らかな腎線維化の主要要因であるため、今後、これらの障害に関与する分子メカニズムをさらに検討し、これら分子メカニズムに対応するmicroRNAを同定し、同定されたmicroRNAをHUSモデルマウスに用いることで硬化性病変や線維化への抑制効果が示されれば、ヒトの急性・慢性腎障害後の線維化を制御可能な新規治療薬開発として期待される研究になり得ると思われる。

研究成果の概要(英文)：HUS model mice were prepared using LPS and Shiga toxin, and total RNA was extracted from the mouse kidneys 6 hours and 72 hours after administration and analyzed by microarray. After administration of LPS / Stx2, thrombocytopenia and decreased renal function were observed. Gene expression analysis by microarray showed activation of the TNF receptor-1 / 2, iNOS, and IL-6 signaling pathways compared to controls. On the other hand, 72 hours after LPS / Stx2 administration, decreased expression of transporter and receptor genes present in the distal nephron was observed. Physiological and molecular findings revealed chief cell damage to the distal tubule 2 and the connecting and cortical collecting ducts of HUS model mice.

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：HUS LPS ベロ毒素 MicroRNA マイクロアレイ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 組織の線維化は脳を除くほぼ全身の主要な臓器に生じ、線維化を起こした臓器は最終的に機能不全に陥る。急性・慢性腎障害においても、腎線維化は急性腎障害の瘢痕形成や慢性腎臓病の進行に関与しており、腎線維化の進行によって将来末期腎不全に移行する症例も多く、一度生じた線維化は不可逆的であるため、腎臓機能が徐々に廃絶する。

したがって、腎線維化の機序を解明し、腎障害後の硬化性病変への進展や線維化を阻止することが腎機能低下の予防に重要とされる。しかしながら、現在の腎炎に対する治療、ステロイド薬や免疫抑制薬や RAS 阻害薬などの多剤併用療法では、未だ腎線維化や硬化性病変を十分に阻止可能な治療薬は未だ開発されておらず、これら線維化を阻止する新たな治療法が期待されている。

(2) 近年、発生、細胞増殖、代謝など様々な生命現象を制御する miRNA、特に臓器の線維化に強く関与する miR-21 が報告されるようになった。このようなことから、急性・慢性腎障害における腎線維化形成病態に対して miR-21 が強く関与するのではないかと、また、miR-21 の阻害薬が腎線維化の新規治療薬の開発になり得るのではないかとという仮説をたて実験を行った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、急性・慢性腎障害の発症・進展過程における miR-21 の役割とその新規治療薬としての可能性を明らかにすることである。そのために、本研究では、正常マウスや miR-21 ノックアウトマウスに溶血性尿毒症症候群 (HUS) を惹起することで、miR-21 の発症病態、硬化性病変や線維化進展における役割を検討し、さらに、その促進剤や阻害薬を投与し miR-21 の病態への影響を検討することを予定している。さらに、ヒトの急性、慢性腎障害時の経時的血清、尿、腎生検組織を用いて miR-21 の解析を行い、その機能を分析する。miR-21 が HUS に影響を与えることがない場合、病態に関与すると考えられる新たな miRNA を同定する。

3. 研究の方法

1) 急性腎不全のモデルである HUS マウスを使用し、その発症病態や炎症進展過程、回復期あるいは硬化性病変への進展時などにおける経時的な血清中、尿中、腎組織中の miR-21 の発現度と miR-21 が制御する 84 種類の mRNA を搭載した Mouse miR-21 target PCR Array を用いて mRNA 発現解析を行い、検尿所見や組織障害度、 α -SMA、コラーゲンやマクロファージ浸潤との関連性を評価する。また、miR-21 の病態への関与を明らかにするために miR-21 ノックアウトマウスに HUS モデルマウスを作製し腎障害度や腎機能を比較検討する。

2) 病態の進行や線維化に関連する新たな microRNA を同定するために、HUS モデルマウスの発症病態に関与する詳細な分子メカニズムをマイクロアレイにて解析した。LPS とベロ毒素を用いて HUS マウスモデルを作成後 6 時間と 72 時間のマウスから腎臓の total RNA を抽出しマイクロアレイにて、HUS 発症病態に特異的な分子を特定した。

4. 研究成果

1) 溶血性尿毒症症候群モデルマウスにおいてコントロール群と比較して腎障害発症 72 時間後の miR-21 発現量の増加が認められたが、実際に、miR-21 ノックアウトマウスに溶血性尿毒症症候群モデルマウスを作製し、miR-21 ノックアウトマウスとコントロール群の腎障害度を病理学的に比較すると糸球体係蹄の拡大、メサンギオリーシス、メサンギウム増殖性病変に関して両群間に差は認められず、腎病理組織学的所見や腎機能に差はなかった。

2) LPS/Stx2 投与後、血小板減少と腎機能低下が認められた。一方、投与後 72 時間で尿浸透圧と尿中 K の低下を認めた。マイクロアレイによる遺伝子発現解析では、LPS/Stx2 投与 6 及び 72 時間後の腎臓から抽出した total RNA は、コントロールと比較して発現変化した遺伝子がそれぞれ 1212 および 1016 個同定された。これらを Ingenuity pathway analysis で解析すると TNF receptor-1/2, iNOS, および IL-6 シグナル伝達経路の活性化が明らかになった。

一方、LPS/Stx2 投与 72 時間後では遠位ネフロンに存在するトランスポーターやレセプター遺伝子の発現低下を認めた。特に、遠位尿細管 2/結合尿細管および皮質集合管の主細胞の関連遺伝子が、遠位尿細管および皮質集合管間在細胞の遺伝子よりも大幅に発現が低下していた。蛍光抗体法による二重染色にて Stx 受容体である globotriosylceramide (Gb3) の局在を確認したところ、Gb3 は皮質集合管 1 に存在する Pvalb や間在細胞に存在する Slc4a1 と共同在しなかったが、皮質集合管 1 と皮質集合管 2 の両方に特異的に存在する Slc12a3 と主細胞の Aqp2 と共同在を示した。

結語：生理および分子学的所見から HUS モデルマウスの遠位尿細管および結合集合管および皮質集合管の主細胞損傷が明らかになった。間質障害は明らかな腎線維化の主要要因であるため、今後、これらの障害に関与する分子メカニズムをさらに検討することでこれらに関与する miRNA を同定し、同定した miRNA を用いることで腎線維化に対する新規治療薬開発を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kume Y, Go H, Maeda R, Suyama K, Mori T, Kawasaki Y, Hashimoto K, Hosoya M	4. 巻 54
2. 論文標題 Gene expression profile and injury sites in mice treated with Shiga toxin 2 and lipopolysaccharide as a Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Physiol Genomics	6. 最初と最後の頁 153-165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/physiolgenomics.00124.2021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kume Y, Kawasaki Y, Suyama K, Maeda R, Takahashi Y, Hoshino M, Suzuki S, Mitomo M, Nozawa R, Namai Y, Sakuma H, Kaneko M, Oda S, Murai H, Kanno S, Nagasawa K, Ito M, Suzuki H, Ohara S, Go H, Goto A, Hosoya M	4. 巻 253
2. 論文標題 Incidence and Relapse Triggers of Childhood Idiopathic Nephrotic Syndrome between 2006 and 2016: A Population-Based Study in Fukushima, Japan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tohoku J Exp Med	6. 最初と最後の頁 125-134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1620/tjem.253.125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hashimoto S, Nagai M, Ohira T, Fukuma S, Hosoya M, Yasumura S, Satoh H, Suzuki H, Sakai A, Ohtsuru A, Kawasaki Y, Takahashi A, Okazaki K, Kobashi G, Kamiya K, Yamashita S, Fukuhara SI, Ohto H	4. 巻 24
2. 論文標題 Influence of post-disaster evacuation on incidence of hyperuricemia in residents of Fukushima Prefecture: the Fukushima Health Management Survey.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Exp Nephrol	6. 最初と最後の頁 1025-1032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-020-01924-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawasaki Y, Nakano H, Hosoya M, Yasumura S, Ohira T, Satoh H, Suzuki H, Sakai A, Ohtsuru A, Takahashi A, Kobashi G, Kamiya K	4. 巻 62
2. 論文標題 Influence of post-disaster evacuation on childhood obesity and hyperlipidemia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatr Int	6. 最初と最後の頁 669-676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.14162	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakai A, Nakano H, Ohira T, Maeda M, Okazaki K, Takahashi A, Kawasaki Y, Satoh H, Ohtsuru A, Shimabukuro M, Kazama J, Hashimoto S, Hosoya M, Yasumura S, Yabe H, Ohto H, Kamiya K	4. 巻 99
2. 論文標題 Fukushima Health Management Survey. Relationship between the prevalence of polycythemia and factors observed in the mental health and lifestyle survey after the Great East Japan Earthquake.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medicine (Baltimore)	6. 最初と最後の頁 e18486
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000018486	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ono M, Tsugawa T, Nakata S, Kondo K, Tatsumi M, Tsutsumi H, Kawasaki Y.	4. 巻 62
2. 論文標題 Rotavirus genotype and Vesikari score of outpatients in Japan in the vaccine era.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatr Int	6. 最初と最後の頁 569-575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.14150	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawasaki Y, Nakano H, Hosoya M, Yasumura S, Ohira T, Satoh H, Suzuki H, Sakai A, Ohtsuru A, Takahashi A, Kobashi G, Kamiya K.	4. 巻 62
2. 論文標題 Influence of post-disaster evacuation on childhood obesity and hyperlipidemia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatr Int	6. 最初と最後の頁 669-676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.14162	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Go H, Maeda H, Miyazaki K, Maeda R, Kume Y, Namba F, Momoi N, HashimotoK, Otsuru S, Kawasaki Y, Hosoya M, Dennery PA.	4. 巻 318
2. 論文標題 Extracellular vesicle miRNA-21 is a potential biomarker for predicting chronic lung disease in premature infants.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 AmJ Physiol Lung Cell Mol Physiol	6. 最初と最後の頁 L845-L851
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajplung.00166.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanno S, Kume Y, Maeda R, Ono A, Suyama K, Kawasaki Y, Hosoya M	4. 巻 86
2. 論文標題 Ectopic expression of CLDN2 in podocytes is associated with childhood onset nephrotic syndrome.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatr Res	6. 最初と最後の頁 485-491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41390-019-0423-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maeda R, Kawasaki Y, Kume Y, Go H, Suyama K, Hosoya M	4. 巻 317
2. 論文標題 Involvement of high mobility group box 1 in the pathogenesis of severe hemolytic uremic syndrome in a murine model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Physiol Renal Physiol	6. 最初と最後の頁 F1420-F1429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajprenal.00263.2019	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計2件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 川崎幸彦
2. 発表標題 IgA腎症の発症病態からみた治療の進歩
3. 学会等名 第55回日本小児腎臓病学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川崎幸彦
2. 発表標題 慢性糸球体腎炎と溶血性尿毒症症候群の発症病態と制御
3. 学会等名 日本小児科学会北海道地方会第305回例会
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
研究分担者	郷 勇人 (Go Hayato) (30443857)	福島県立医科大学・医学部・講師 (21601)	
研究分担者	陶山 和秀 (Suyama Kazuhide) (90423798)	福島県立医科大学・医学部・講師 (21601)	
研究分担者	長岡 由修 (Nagaoka Yoshinobu) (50513967)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	
研究分担者	石井 玲 (Ishii Akira) (60783868)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	

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