

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17748

研究課題名(和文) microRNA/HMGB1シグナリングに着目した溶血性尿毒症症候群の治療法開発

研究課題名(英文) Development of therapy for hemolytic uremic syndrome with a focus on microRNA/high mobility group box-1 signaling

研究代表者

前田 亮 (Ryo, Maeda)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60792025

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)：典型的溶血性尿毒症症候群(HUS)は未だ特異的な治療法が確立されていない。我々はStx2とLPSを投与し作成するHUSモデルマウスにおいてHMGB1シグナリングに関わる標的マイクロRNA(miRNA)の発現変化をアレイ解析で確認し、miR-21の関連mRNAであるDUSP8に着目した。健常群に比べHUSモデルマウスの腎臓でDUSP8の発現が上昇していた。in vitroで近位尿細管(TKPTS)と集合管細胞(M-1)にStx2とLPSを投与したが、いずれの細胞も明らかな変化を認めなかった。不死化細胞を用いた影響も考えられたため、マウス由来の尿細管プライマリーセルで再検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HUSモデルマウスとmiRNAとの関与を検討した報告は少ない。本研究ではmiRNAのmiR-21に関連するmRNAのDUSP8がHUSの病態に関与している可能性が示唆された。さらなる検証を進めることでHUSとmiR-21やDUSP8との関連を明らかにでき、病態が解明されることで未だ特異的治療法のないHUSの治療法が確立しうるため、本研究の学術的意義は高い。

研究成果の概要(英文)：Typical (Shiga toxin-producing Escherichia coli-associated) hemolytic uremic syndrome (HUS) is the leading cause of acute kidney injury in children, and no specific treatment methods have been established. In HUS-model mice treated with Shiga toxin 2 (Stx2) and lipopolysaccharide (LPS), we conducted array analyses to identify changes in the expression of target microRNAs involved in high mobility group box-1 signaling. We focused on dual Specificity Phosphatase 8 (DUSP8), a miR-21-related mRNA with a large magnitude fold-change. DUSP8 expression was higher in the kidneys of HUS-model mice than in the kidneys of healthy mice. Proximal convoluted tubule (TKPTS) and collecting duct cells (M-1) treated with Stx2 and LPS in vitro showed no appreciable changes. A possible reason is the use of immortalized cells. Thus, we will use primary mouse renal tubular cells in reexaminations.

研究分野：腎臓病学

キーワード：溶血性尿毒症症候群 HMGB1 miRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 典型的溶血性尿毒症症候群(HUS)は小児期に発症する急性腎障害の代表的疾患であり、未だ特異的な治療法が確立されていない。大腸菌感染に起因する HUS は微生物や自己由来の成分を認識し炎症応答を誘導する自然免疫との関連があり、我々は Stx と LPS で作成する HUS モデルマウスにおいて自然免疫の主要な分子である HMGB1 とそのシグナリングが病態に関与することを明らかにした。

(2) HMGB1 シグナリングのマイクロ RNA(miRNA)との関与についても検討すれば、HUS の病態解明がさらに進められると考えた。miRNA は 18-25 塩基長の一本鎖 RNA であり、一つの miRNA は複数のメッセンジャーRNA(mRNA)の翻訳や安定性を抑制することで、発生、細胞増殖、自然免疫など様々な生命現象を制御しているが、HUS と miRNA に関する報告は国内外で少なくさらなる病態解明と臨床応用に向けた研究が期待される。

(3) これまでに予備実験として HUS モデルマウスの腎組織を用いた約 700 種類の miRNA のアレイ解析を行った。HUS モデルマウス腎ではコントロール群に比し、約 50 種類の miRNA が発現変化していることを確認した。さらにその中で、既報や Target Scan から HMGB1 シグナリングに直接関与する標的 miRNA として miR-21 などを同定した。

### 2. 研究の目的

(1) 予備実験で得られた miRNA が治療標的となりうるか、野生型マウスと同一家系の miR-21 欠損 HUS モデルマウスで作成した HUS モデルマウスの生存率や組織免疫学的変化などを検討する。

(2) (1)で得られたマウスの血漿や腎検体を用いて標的 miRNA の発現変化や HMGB1 シグナリングの mRNA の発現変化について野生型 HUS モデルマウスと比較し miRNA の役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) HUS モデルマウスの作成

8 週齢の C57BL/6 マウスと同一家系の miR-21 欠損 HUS モデルマウスに LPS 300 µg/kg と Stx 225ng/kg を腹腔内に単回投与し HUS モデルマウスを作成する。

(2) 生存率の評価

倫理的エンドポイントも配慮し体重の推移や生存率を評価する。

(3) 検体の採取と評価

LPS と STx 投与後 3、6、12、24、48、72 時間後にそれぞれ鎮静下に採血・採尿を行い保存尿と血漿を採取する。得られた血液・尿検体で上述した miRNA の発現量の推移などを明らかにする。また開腹を行いリン酸緩衝生理食塩水で灌流脱血したのち両腎を摘出し、光学・電子顕微鏡用とウェスタンブロット用の検体を採取後し直ちに RNA 保存試薬に浸漬し液体窒素で凍結保存を行い、遺伝子発現の評価に用いる。腎組織を用いて組織学的重症度の評価、免疫染色で関連蛋白の発現部位を同定する。In situ hybridization で miRNA の局在の評価などを行う。また凍結検体で PCR 法やウェスタンブロット法により自然免疫に関わる因子の評価、miRNA とそれに関わる mRNA の遺伝子発現度を評価する。

### 4. 研究成果

(1) HUS における miRNA との関連を明らかにすべく fold change の大きかった miRNA より検討を開始した。同一家系で作成した miR-21 欠損マウスと野生型マウスで HUS モデルマウスを作製したところ、miR-21 欠損 HUS モデルマウスは野生型 HUS モデルマウスに比べ有意に体重減少率が改善し軽症化が得られた。

(2) mRNA の array 解析と miRNA を予測するデータベースでの検証を行い、miR-21 の関連 mRNA で、MAP キナーゼを調節し HMGB1 シグナリングにも関与することが考えられているある DUSP8 に着目した。DUSP8 の発現部位を同定するため、腎組織の免疫染色を施行した。免疫染色では尿細管に DUSP8 が強く発現しており、コントロールと比較すると LPS と Stx2 を投与したマウスの腎

臓でその発現は顕著であった(図1)。

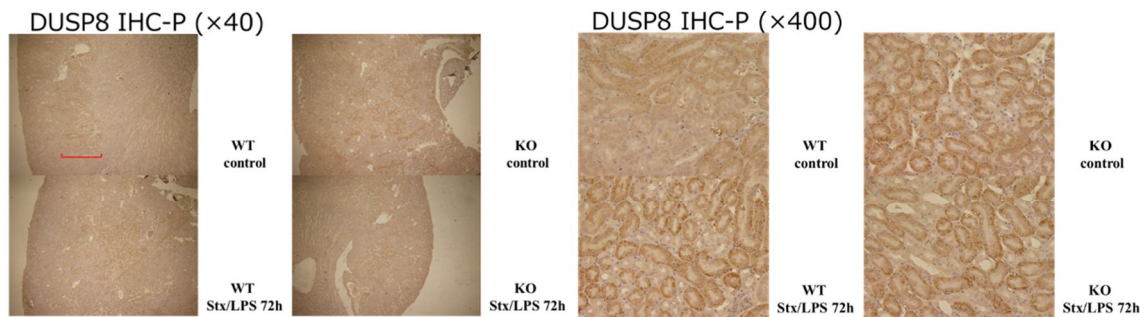


図1 皮質部の集合管および尿細管でのDUSP8の発現

(3) タンパクレベルでの DUSP8 の発現を調べるため、RIPA バッファーを用いて腎臓からタンパク質を抽出し、Western blotting を行った。生食を投与したコントロールと比較し、LPS と Stx2 を投与した HUS モデルマウスの腎臓において DUSP8 の発現が上昇していた(図2)。

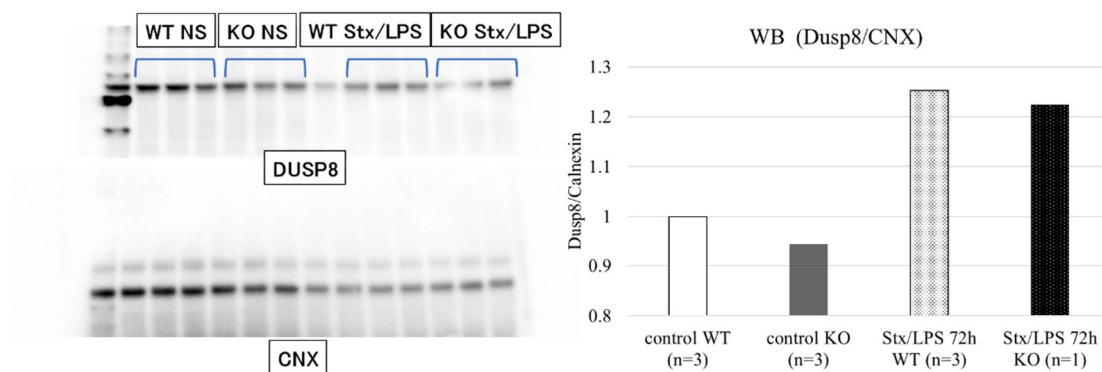


図2 DUSP8のWestern Blotting

(4) DUSP8 が腎臓、特に尿細管のどのようなパスウェイに関与しているかさらに詳細に調べるため、in vitro で近位尿細管 (TKPTS) と集合管細胞 (M-1) に Stx2 と LPS を投与する実験を行った。しかしながら、Stx2 と LPS の濃度を増加させても、いずれの細胞もアポトーシスなど明らかな変化を示さなかった。今回使用した細胞がいずれも不死化細胞であり、Stx のレセプターである Gb3 が不死化の過程で作用しなくなった可能性も考えられた。そのため、今後マウス由来の尿細管プライマリーセルを採取し、その細胞に LPS と Stx2 を投与し、その変化について分子学的な検討を継続して行いたいと考えている。

#### 引用文献

Maeda R, et al. AJP-Renal Physiol. 2019; 317: F1420-F1429

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 前田 亮
2. 発表標題 HUSモデルマウス腎におけるマイクロRNAプロファイル
3. 学会等名 第54回日本小児腎臓病学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田 亮
2. 発表標題 Involvement of high-mobility group box 1 in the pathogenesis of severe hemolytic uremic syndrome in a murine model
3. 学会等名 pediatric academic societies (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田 亮
2. 発表標題 Involvement of high-mobility group box 1 in the pathogenesis of severe hemolytic uremic syndrome in a murine model
3. 学会等名 International DAMPs and Alarmins Symposium (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
---------	---------