

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592419

研究課題名(和文) 妊娠高血圧症候群に伴う蛋白尿発症に関わるマイクロRNAの同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of microRNAs involved in the onset of proteinuria accompanied with pregnancy-induced hypertension

研究代表者

石橋 幸 (ISHIBASHI, OSAMU)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・准教授

研究者番号：70293214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、妊娠高血圧症候群に伴う蛋白尿発現の分子メカニズムの解明を目指して実施された。まず、腎臓における血液濾過機能の主役を担う糸球体ポドサイト(糸球体上皮細胞)の初代培養を行い、これをエンドセリン-1で処理して細胞傷害を誘導することにより、上記蛋白尿のin vitro病態モデルを確立した。さらに、次世代シーケンス技術、および定量的PCRに基づくマイクロRNAアレイシステムを活用し、ポドサイト障害に伴い発現が変動する遺伝子転写産物について、ノンコーディングRNAも含めてゲノムワイドな探索を行った。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted in order to elucidate the molecular mechanism of proteinuria onset accompanied with pregnancy-induced hypertension (PIH). Primary podocytes (glomerular epithelial cells) were treated with endothelin-1 to induce cellular injury to the cells, whereby an in vitro pathological model reflecting the PIH-related proteinuria was established. Further, transcripts (including non-coding RNAs) dysregulated in accordance with the podocyte injury were explored in a genome-wide fashion by means of next-generation sequencing and PCR-based microRNA array system.

研究分野：産婦人科学・分子生物学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：妊娠高血圧症候群 ポドサイト マイクロRNA 次世代シーケンス 蛋白尿

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群 (pregnancy-induced hypertension, 以下 PIH) は高血圧を主体とする妊娠合併症であり、多くの場合蛋白尿を伴う。PIH の症状は分娩により軽快することから、何らかの胎盤機能不全が病態に関係していると考えられている。その本質的な原因はいまだに不明であるが、最近の研究により、絨毛細胞の脱落膜への浸潤とらせん動脈内皮細胞の置換、免疫学的要因、凝固系のバランスなどが複雑に絡みあって病態が構築されたと考えられている。

通常、PIH の管理は通常血圧コントロールに主眼を置いて行われている。これに対し、蛋白尿に関しては積極的な治療は行われていないが、PIH に伴う蛋白尿は出産後も比較的長期に持続すること、および蛋白尿自体が腎機能低下を増悪させることが示唆されており、その治療は今後の重要課題であると考えられる。しかしながら、PIH における蛋白尿出現メカニズムに関する研究はきわめて少ないのが現状である。そのなかで、近年、PIH 妊婦の血清が、糸球体血管内皮からのエンドセリン-1 (ET-1) 分泌を亢進し、その結果腎糸球体のポドサイト (糸球体上皮細胞) により合成された nephrin (ポドサイトの突起間に存在する血漿濾過スリット構成蛋白質) が切断されることが報告された。

一方、21-25 塩基からなる内在性 1 本鎖低分子 RNA である miRNA が、様々な病態生理に関与することが明らかになり、注目を集めている。miRNA は、それと部分的に相補的な配列を有するメッセンジャーRNA (mRNA) を標的として結合し、様々な遺伝子の転写後発現調節に関与している。興味深いことに、miRNA の生合成に必須な酵素である Dicer をポドサイト特異的に欠損させたマウスは、蛋白尿を発症し、生後数週で死に至ることが示された。ただし、具体的にどの miRNA が如何なるメカニズムでポドサイトの機能発現に関わるかについては不明な点も多い。したがって、このような miRNA、およびそれらが標的とする腎機能に関わる遺伝子を同定することは、蛋白尿に対する新規治療法開発や創薬に結びつく可能性を秘めていると考えられる。

2. 研究の目的

以上の知見をふまえ、本研究においては、「エンドセリン等の血管内皮由来因子が、ポドサイトにおける miRNA の発現を制御し、それらが標的とする血漿濾過関連蛋白質 (nephrin, podocin など) の発現に影響を与えることにより蛋白尿が出現する」

という仮説を立て、その検証を進める。具体的には、まず、Mundel らによって作製されたポドサイト細胞株などを用いて、ET-1 により発現が変動する遺伝子を網羅的解析により同定する。

さらに、本解析によって同定された miRNA および遺伝子の発現変動に関して、PIH モデルマウスを用いて、*in vivo* での検証を行う。さらに、以上の解析により仮説が証明された場合、同マウス miRNA の機能・発現制御による蛋白尿治療の可能性についても追及する。

3. 研究の方法

当初は、前述の如く Mundel らが樹立したポドサイト細胞株を用いて実験を行う予定であったが、樹立者と連絡が取れず、当細胞の譲渡を受けることが不可能となった。したがって、代替的に、Endlich らによって樹立されたマウス腎臓由来ポドサイト細胞株 E11 (Cell Line Service 社より購入) を使用することにした。しかし、可能な限り多くの条件にて培養を試みたものの、本細胞にはポドサイトの代表的マーカーである podocin や nephrin の遺伝子発現が全く認められなかったため、ポドサイトとしての形質は欠失していると判断せざるを得なかった。そこで我々は細胞株を用いる実験を断念し、既報の方法 (Katsuya et al. *Kidney Int.* 69, 2006) に基づいてラット腎臓由来ポドサイトの初代培養を行い、実験に供することにした。以下にその方法を簡単に記す。なお、本実験を行うにあたって、大阪府立大学の動物実験委員会の承認を得た。また、動物の管理と実験手順は、本委員会の指針に従って行った。

(1) ラット腎糸球体ポドサイトの初代培養

Wistar 系雄性ラット (7-8 週齢, 日本 SLC) を麻酔下において開腹し、腹部大動脈より鉄粉 (和光純薬) を含む PBS を注入し腎臓を灌流した。腎臓を摘出後、皮質を冷 HBSS 中で細切し、collagenase A と DNase I を含む HBSS 中で回転混和しながら消化した (37°C、1 時間)。得られた糸球体浮遊液を 100 μ m のセルストレーナー (BD Falcon) に通し、通過した糸球体を PBS で洗浄後、適量の PBS に再懸濁した。これを磁気分離装置 MPC-1 (Dyna) 内で 2 分間静置後、上清を除去した。同様にして PBS の添加と上清の除去を繰り返し、検鏡により尿細管の混入が殆ど認められなくなるまで糸球体を洗浄した。その後、70 μ m のセルストレーナーに通し、PBS で洗浄後、セルストレーナー上の糸球体を 5% ウシ胎仔血清 (FBS), 1% Penicillin Strepimycin, 0.01%

insulin transferrin selenium を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12/1:1 を用いて回収し、コラーゲンコート済デッシュ上に播種した。5% CO₂ を含む 37 °C の大気下において 3 日間培養した後、生着した糸球体から増殖した細胞を初代培養ポドサイトとしてその後の実験に供した。

(2) 初代培養ポドサイトの形質の確認

上記操作により得られた細胞がポドサイトの形質を有することを確認するため、免疫蛍光染色法および定量的 RT-PCR 法によってポドサイトマーカーの検出を試みた。

①免疫蛍光染色

糸球体の周囲に生育した細胞をトリプシン処理によって回収し、30 μm セルストレイナーを用いて糸球体を除去した後、コラーゲンコート済カバースリップへ播種した。2% パラホルムアルデヒドにて 10 分間固定し、PBS で洗浄後、0.1% Triton-X 100 を用いて 5 分間の透過処理を行った。1% BSA による 1 時間のブロッキングの後、1 次抗体反応と 2 次抗体反応をそれぞれ 1 時間および 30 分間行った (いずれも室温)。その後 DAPI による核染色を 5 分間行った。観察は、共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 (CarlZeiss) を用いて行った。以下に用いた抗体を示す。

・1 次抗体

Rabbit anti-Podocin polyclonal antibody (IBL) (100 倍希釈)

Rabbit anti-WT-1 polyclonal antibody (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) (100 倍希釈)

・2 次抗体

Alexa Fluor 488[®] goat anti-rabbit IgG (life technologies) (200 倍希釈)

②定量的 RT-PCR

上記と同様にして調整した初代培養ポドサイトをコラーゲンコート済プレートへ播種した。翌日、5% FBS 含有培地もしくは無血清培地に培地交換、さらに 24 時間培養後 RNA Purification Micro Kit (NORGEN) を用いて RNA の抽出・精製を行い、ポドサイトマーカー遺伝子である podocin と nephrin の遺伝子発現を定量的 RT-PCR により解析した。この際の反応には、Power SYBR[®] Green RNA-to-Ct 1-Step Kit (Applied Biosystems) を用いた。

(3) ET-1 によるポドサイトへの障害誘導

上記と同様にして、初代培養ポドサイトをコラーゲンコート済プレートへ播種し、翌日、終濃度 100 nM の ET-1 (ペプチド研究所)、も

しくはコントロールとして同量の溶媒 (0.1% 酢酸) を含む無血清培養液へ交換した。24-48 時間後、上記と同様にして RNA を抽出・精製した。ET-1 処理によるポドサイト障害の有無を評価するため、経時的に細胞形態を観測すると同時に、ポドサイトの障害マーカーの 1 つと考えられている matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) の遺伝子発現変化について定量的 RT-PCR によって検討した。定量的 RT-PCR の条件は上記と同様にして行った。

(4) 大規模遺伝子発現解析

上記 (3) において、24 時間の ET-1 処理により 2 倍以上の MMP-9 遺伝子発現上昇が認められたポドサイトから抽出した RNA サンプルについて、以下の包括的遺伝子発現解析を行った。

①RNA-seq によるゲノムワイド発現解析

次世代シーケンサー HiSeq2500 (Illumina) を用いて RNA-seq 解析を実施した。本研究では、poly-A 末端を持たないノンコーディング RNA (蛋白質をコードしない RNA) の同定や発現解析も考慮し、リボゾーム RNA 以外のすべての遺伝子転写産物を解析対象とするため、RiboZero-Gold kit (Illumina) を用いて cDNA ライブラリーの作製を行った。なお、cDNA ライブラリーの作製、および次世代シーケンサーを用いた解析は、基礎生物学研究所 (岡崎市) にて実施した。

②定量的 PCR に基づく miRNA アレイ解析

TaqMan MicroRNA Array (Applied Biosystems) を用いて、miRNA の発現変動について定量的かつ網羅的に解析した。PCR 反応および増幅産物の検出は定量的 PCR システム ABI7900 (Applied Biosystems) を用いて実施した。

4. 研究成果

(1) ラット腎糸球体ポドサイトの初代培養

分離したラット糸球体を播種した後、培養 2 日目から糸球体周囲に細胞が確認され始め、培養 3 日目には格子状に重なりあうポドサイト様の細胞が確認された (図 1)。

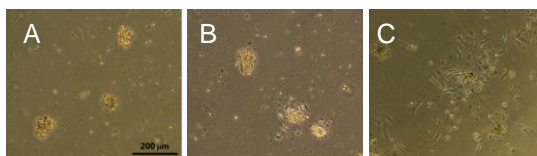


図 1 単離した糸球体とポドサイト

分離した糸球体の周囲からポドサイトが outgrowth している様子。(A)培養 1 日目、(B)同 2 日目、(C)同 3 日目。

(2) 初代培養ポドサイトの形質の確認

免疫蛍光染色の結果、Podocin は本細胞の辺縁部に、WT-1 は核に蛍光が確認された(図 2)。

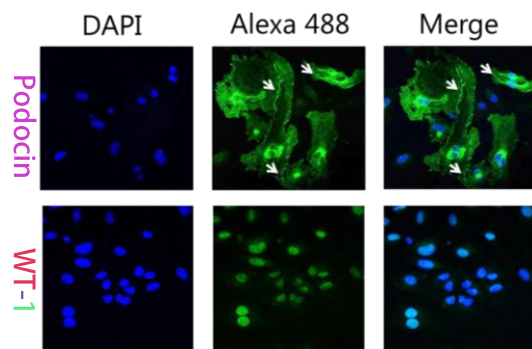


図 2 初代培養ポドサイトにおけるポドサイトマーカー蛋白質の発現と局在

Podocin と WT-1 について、それぞれ細胞の辺縁部(矢印) および核への局在が確認された。

これらの蛍光はそれぞれ既知の局在と一致していたため、得られた細胞はポドサイトとしての性質を有していることが示唆された。

次に、FBS 含有もしくは非含有条件下で培養した初代培養ポドサイトにおけるポドサイトマーカー遺伝子の発現量を解析した(図 3)。糸球体から outgrowth した細胞を剥離・播種し 1 日後に生着した時点(0 時間)で、引き続き 5%FBS 含有培地で 24 時間培養を続けた場合には、ポドサイトの代表的マーカーである nephrin, podocin とともに、遺伝子発現量の著しい低下が認められた。一方、FBS 非含有培地で培養を 24 時間継続した場合には、これらの発現の低下は認められず、むしろ 0 時間と比べてやや上昇していた(図 3)。このことから、本細胞を FBS 含有培地下において培養した場合は、ポドサイトとしての形質が急激に失われることが示唆された。したがって、以後の ET-1 の効果を調べる実験では、FBS 非含有培地を用いることにした。

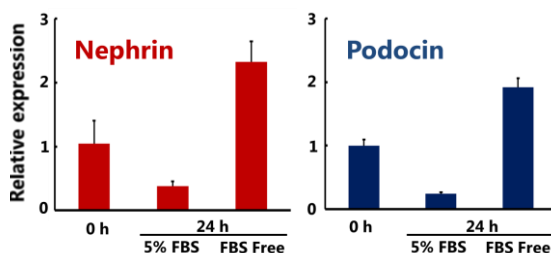


図 3 初代培養ポドサイトにおけるポドサイトマーカーの遺伝子発現

FBS 含有培地で長時間培養することにより、初代培養ポドサイトにおけるポドサイトマーカー遺伝子の発現が顕著に低下した。なお、各遺伝子の発現は GAPDH を内部標準として補正し、いずれの実験においてもコントロールの発現量を 1 としたときの相対発現量として示している。

(3) ET-1 によるポドサイトへの障害誘導

初代培養ポドサイトを 100nM ET-1 存在下に

て培養した際の形態変化を経時的に観察したが、少なくとも 5 日間程度までにコントロールとの差異は認められなかった。そこで、ポドサイトが障害を受けた際に発現が上昇することが報告されている MMP-9 を細胞傷害の指標とし、その遺伝子発現を定量的 RT-PCR によって解析した。その結果、初代培養ポドサイトを ET-1 存在下にて 24 時間培養することにより MMP-9 遺伝子の発現量が著明に上昇することが示された(図 4)。また、ET-1 存在下で 48 時間培養した場合にも MMP-9 の発現上昇は認められたが、その程度は 24 時間処理に比べて低かった(データ非掲載)。これは、長時間培養することにより、ポドサイトの形質が失われていくことや、コントロール(ET-1 非添加)細胞においても細胞傷害が徐々に進行することなどに起因すると推察される。そこで、以降の実験では、ET-1 による処理をいずれも 24 時間行うこととした。

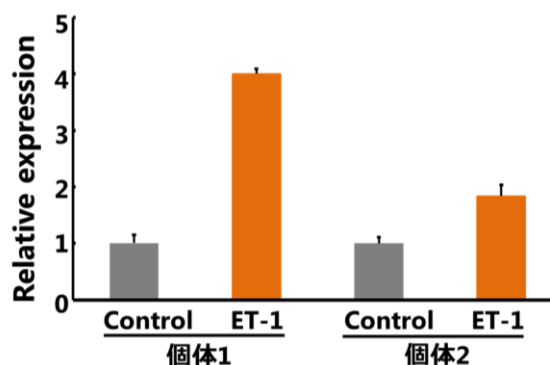


図 4 初代培養ポドサイトの ET-1 処理による MMP-9 遺伝子発現変化

初代培養ポドサイトを ET-1 存在下で 24 時間培養することにより、本細胞における傷害の指標として考えられている MMP-9 の遺伝子発現の上昇が認められた。なお、MMP-9 の遺伝子発現は GAPDH を内部標準として補正し、いずれの実験においてもコントロールの発現量を 1 としたときの相対発現量として示している。

(4) 大規模遺伝子発現解析

上述の如く ET-1 存在下、および非存在下(コントロール)で培養した初代培養ポドサイトについて、RNA-seq による発現解析を行った。その結果、いずれのサンプルについても、発現量の指標となる Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads (RPKM) 値が高い遺伝子として、機能未知遺伝子産物

(Ensembl ID ENSRNO T00000071231) を筆頭に、いくつかの興味深い遺伝子がヒットした。現在、ET-1 による変動遺伝子候補を選別すべく、さらなるデータ解析を進めている。

一方、miRNA 発現解析に関しても、ET-1 処理による発現が著明に変化するいくつかの miRNA 候補を見出すことができた。現在このデータの再検証のための解析を行っており、ポドサイト障害と密接に関連する

miRNA の同定を目指している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Ishibashi, O., Inui, T. Dataset of microarray analysis to identify endoglin-dependent bone morphogenetic protein-2-responsive genes in the murine periodontal ligament cell line PDL-L2. *Genomics Data*, 2 巻, 24-26 頁, 2014 年. 査読有
- ② Takahashi, T., Zenno, S., Ishibashi, O., Takizawa, T., Saigo, K., Ui-Tei, K. Interactions between the non-seed region of siRNA and RNA-binding RLC/RISC proteins, Ago and TRBP, in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, 42 巻, 5256-5269 頁, 2014 年. 査読有
- ③ Ishibashi, O. BMP-2 desensitizes MC3T3-E1 osteoblastic cells to estrogen through transcriptional downregulation of estrogen receptor 1. *J. Bone Metab.*, 20 巻, 83-88 頁, 2013 年. 査読有
- ④ Ohkuchi, A.[†], Ishibashi, O.[†], Hirashima, C., Takahashi, K., Matsubara, S., Takizawa, T., Suzuki, M. (†共筆頭著者) Plasma level of hydroxysteroid (17-β) dehydrogenase 1 in the second trimester is an independent risk factor for predicting preeclampsia after adjusting for the effects of mean blood pressure, bilateral notching and plasma level of soluble fms-like tyrosine kinase 1/placental growth factor ratio. *Hypertens. Res.*, 35 巻, 1152-1158 頁, 2012 年. 査読有
- ⑤ Mase, Y., Ishibashi, O., Ishikawa, T., Takizawa, T., Kiguchi, T., Ohba, T., Katabuchi, H., Takeshita, T., Takizawa, T. MiR-21 is enriched in the RNA-induced silencing complex and targets COL4A1 in human granulosa cell lines. *Reprod. Sci.*, 19 巻, 1030-1040 頁, 2012 年. 査読有
- ⑥ Ishibashi, O.[†], Ohkuchi, A.[†], Ali, M.M., Kurashina, R., Luo, S-S., Ishikawa, T., Takizawa, T., Hirashima, C., Takahashi, K., Migita, M., Ishikawa, G., Yoneyama, K., Asakura, H., Izumi, A., Matsubara, S., Takeshita, T., Takizawa, T. (†共筆頭著者) Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 1 is dysregulated by mir-210 and mir-518c that are aberrantly expressed in preeclamptic placentas: A novel marker for predicting preeclampsia. *Hypertension*, 59 巻, 265-273 頁, 2012 年. 査読有
- ⑦ Ishibashi, O., Ali, M.M., Luo, S-S., Ohba, T., Katabuchi, H., Takeshita, T., Takizawa, T. Short RNA duplexes elicit apoptosis via the sequential activation of PKR, RIG-I, and

p38 in a cell type- and length-dependent manner. *Sci. Signal.*, 4 巻, ra74, 2011 年. 査読有

- ⑧ Shigehara, K., Yokomuro, S., Ishibashi, O., Mizuguchi, Y., Arima, Y., Kawahigashi, Y., Kanda, T., Akagi, I., Tajiri, T., Takizawa, T., Yoshida, H., Uchida, E. Real-time PCR-based microRNAome of human bile detects miR-9 as a potential diagnostic biomarker for biliary tract cancer. *PLoS ONE*, 6 巻, e23584, 2011 年. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 小谷康斗 他. マウス成熟破骨細胞の大規模トランスクリプトーム解析と遺伝子発現プロファイリング. 第 36 回日本分子生物学会. 2013 年 12 月 5 日. 神戸 (兵庫)
- ② 石橋 宰 他. マウス歯根膜細胞における BMP2 に対する endoglin 依存的応答遺伝子の探索. 第 86 回日本生化学会. 2013 年 9 月 13 日. 横浜 (神奈川)
- ③ アリ モハメド 他. エクソソーム microRNA を介した胎盤ーリンパ球間コミュニケーション: 培養細胞を用いたモデル解析. 第 27 回日本生殖免疫学会. 2011 年 12 月 3 日. 名古屋 (愛知)
- ④ 石橋 宰 他. 妊婦血漿中での HSD17B1 の検出と妊娠高血圧腎症発症例におけるその動態. 第 32 回日本妊娠高血圧学会. 2011 年 10 月 22 日. 金沢 (石川)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bioinfo.osakafu-u.ac.jp/~inuit/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石橋 宰 (ISHIBASHI, Osamu)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号: 70293214