

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461618

研究課題名(和文) マイクロRNAに着目した多発性嚢胞腎病態生理に基づく疾患特異的治療の開発

研究課題名(英文) Development of disease specific therapy based on microRNA in polycystic kidney disease

研究代表者

中西 浩一 (Nakanishi, Koichi)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50336880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、多発性嚢胞腎の複数の基本的病態生理におけるマイクロRNA (miRNA) の関与とその機序を解明し、それらを修飾することによる病態生理に基づいた疾患特異的治療開発のための基礎的知見の獲得、およびそのヒトへの応用のためのモデル動物を用いた治療研究による効果の確認である。

CPKマウスにおいて、腎のmiRNAマイクロアレイにより病態に関与すると推定されたmiRNAを同定した。これらのmiRNAの生物学的意義を確認するとともに、血液、尿などにおける発現も検討し、疾患活動性の評価における有用性を検討し、バイオマーカーとしての意義も模索した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate contribution of microRNA (miRNA) in multiple basic pathophysiology of polycystic kidney disease and to confirm the effect of the disease specific therapy based on the modifying miRNA by treatment studies using the model animal for application to the human.

In a CPK mouse, we identified miRNA estimated to be involved in clinical condition by the miRNA microarrays of the kidney.

We confirmed biologic significance of these miRNA and examined the manifestation in blood and urine.

We examined a utility of the mRNAs in the evaluation of the disease activity and explored the significance of them as the biomarker.

研究分野：小児腎臓病

キーワード：多発性嚢胞腎 マイクロRNA 疾患特異的治療

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究の全体構想

私どもは、多発性嚢胞腎 (PKD) において嚢胞を形成する尿細管上皮細胞では脱分化がみられ、上皮間葉移行 (EMT) により間葉系の形質を獲得し発症に関与することを報告し、また、その病態に TGF- β ・Smad3 系の疾患特異的異常が関与することを明らかにしてきた。その結果、尿細管上皮細胞は、増殖 (過形成)・細胞周期異常、分泌 (正常では吸収が主である) 細胞外基質異常・線維化を起こし、そのため嚢胞形成・腎不全にいたる。研究開始当初、PKD における EMT ならびにそこから引き起こされるこれらの基本病態における miRNA の関与およびその機序は不明であった。本研究では miRNA が PKD の基本病態に関与しているという仮説により、その解明を大きな目的とした。

2. 研究の目的

miRNA とは、細胞内に存在する長さ 20 から 25 塩基の RNA であり、他の遺伝子の発現を調節する。哺乳類において、miRNA は細胞の発生、分化、増殖、がん化およびアポトーシスなどの細胞機能の根幹に関与していることが知られている。miRNA は約 1,000 種類以上存在し、様々な遺伝子発現様式を介して最終的に細胞機能の発現に関与している。

PKD の原因遺伝子産物は、一次繊毛を中心とした細胞のセンサー機能を担う部位に主に存在しており、その破綻により発症するがその機序の詳細は不明である。センサー機能の破綻に陥った尿細管上皮細胞は間葉系の形質を獲得し (上皮間葉移行、EMT)、種々の病的表現形を呈する。

そこで、本研究の具体的な目的は、PKD の病的尿細管上皮における異常な表現型の中でも、特に 1) 細胞分化の異常・上皮間葉移行 (EMT)、2) 増殖・細胞周期異常、3) 線維化の基本病態における miRNA の関与とその機序を明らかにすることである。

3. 研究の方法

日齢 21 の *cpk* と対照の腎髄質部ホモジネートを用いて miRNA マイクロアレイを行った。miRNA マイクロアレイで増減のある miRNA を同定し、その miRNA と関連分子につき、腎と尿における発現を検討した。

4. 研究成果

日齢 21 の腎のマイクロアレイで 22 個 (増加群 4、減少群 18) の miRNA が 4 倍以上の変化を認め、病態への関与を考慮し miR-378a-3p に着目した。real-time PCR では *cpk* は対照と比較して日齢 14 で 20.0%に ($p < 0.01$) 日齢 21 で 11.0%に減少を認めた

($p < 0.01$)。また、miR-378a-3p に制御される ADAMTS1 mRNA は、*cpk* において日齢 14 で 1.4 倍に ($p = 0.01$) 日齢 21 で 3.5 倍に増加していた ($p < 0.01$)。ADAMTS1 タンパクは日齢 14 で 2.7 倍に ($p = 0.02$) 日齢 21 で 2.4 倍に ($p = 0.02$) 増加していた。免疫染色では、嚢胞性尿細管上皮に ADAMTS1 の強発現が確認された。尿中の miR-378a-3p は、日齢 14 で対照と比較して 15% ($p < 0.01$)、日齢 21 で 1.7% ($p < 0.01$) に減少を認め、*cpk* の日齢 21 は日齢 14 と比較して 21.9%に減少していた ($p < 0.01$)。

私どもは *cpk* マウスの嚢胞上皮細胞が直腸癌類似の病態生理を有することを報告してきた。近年、癌の病態に miR-378a-3p とその標的分子で腫瘍促進因子である ADAMTS1 の関与が報告されている。miR-378a-3p が抑制され ADAMTS1 が上昇すると、細胞の腫瘍性増殖や細胞外基質の変化が起こる。*cpk* において経時的に miR-378a-3p が減少し、ADAMTS1 が上昇し、これらが *cpk* の病態に関与することが示唆された。PKD において、miR-378a-3p/ADAMTS1 が疾患特異的治療の標的やバイオマーカーとなる可能性がある。

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 12 件)

1. 中西浩一 : 多発性嚢胞腎 小児腎臓病-新たな針路 小児内科 49: 542-545, 2017
2. Shima Y, Nakanishi K, Sato M, Hama T, Mukaiyama H, Togawa H, Tanaka R, Nozu K, Sako M, Iijima K, Suzuki H, Yoshikawa N. IgA nephropathy with presentation of nephrotic syndrome at onset in children. *Pediatr Nephrol*. 2017 Mar;32(3):457-465.
3. 中西浩一 : マイクロ RNA に着目した多発性嚢胞腎疾患特異的治療の開発. 別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患 5(4): 148-151, 2016
4. 中西浩一 : ARPKD の診療指針 腎と透析 80(6):835-840, 2016
5. Higa A, Shima Y, Hama T, Sato M, Mukaiyama H, Togawa H, Tanaka R, Nozu K, Sako M, Iijima K, Nakanishi K, Yoshikawa N. Long-term outcome of childhood IgA nephropathy with minimal proteinuria. *Pediatr Nephrol* 30: 2121-2127, 2015
6. Kamei K, Nakanishi K, Ito S, Ishikura K, Hataya H, Honda M, Nozu K, Iijima K, Shima Y, Yoshikawa N; for the

- Japanese Pediatric IgA Nephropathy Treatment Group. Risk factors for persistent proteinuria after a 2-year combination therapy for severe childhood IgA nephropathy. *Pediatr Nephrol.* 2015 Jun;30(6):961-7.
7. 中西浩一、吉川徳茂:小児期発症のADPKDとARPKD. *腎臓内科・泌尿器科* 1: 212-218, 2015
 8. Hama T, Nakanishi K, Shima Y, Sato M, Mukaiyama H, Togawa H, Hamahira K, Tanaka R, Kaito H, Nozu K, Iijima K, Yoshikawa N. Renal biopsy criterion in idiopathic nephrotic syndrome with microscopic hematuria at onset. *Pediatr Nephrol.* 2015 Mar;30(3):445-50.
 9. Yoshikawa N, Nakanishi K, Sako M, S Oba M, Mori R, Ota E, Ishikura K, Hataya H, Honda M, Ito S, Shima Y, Kaito H, Nozu K, Nakamura H, Igarashi T, Ohashi Y, Iijima K; for the Japanese Study Group of Kidney Disease in Children. A multicenter randomized trial indicates initial prednisolone treatment for childhood nephrotic syndrome for two-months is not inferior to six-months treatment. *Kidney Int.* 2015 Jan;87(1):225-32.
 10. Shima Y, Nakanishi K, Hama T, Sato M, Mukaiyama H, Togawa H, Tanaka R, Kaito H, Nozu K, Iijima K, Yoshikawa N. Biopsy timing and Oxford classification variables in Childhood/Adolescent IgA nephropathy. *Pediatr Nephrol.* 30: 293-299, 2014.
 11. 中西浩一、吉川徳茂 多発性嚢胞腎: 診断と治療に関する最新の知見 特集: 日常診療で遭遇する小児腎泌尿器疾患とトピックス III. 尿管疾患・嚢胞性腎疾患 小児科診療 77:6:757-762,2014
 12. 中西浩一、吉川徳茂: 広く嚢胞性腎疾患を捉える 常染色体劣性多発性嚢胞腎 (ARPKD). *腎と透析* 77: 753-758, 2014
- [学会発表](計 10 件)
1. Hama T, Nakanishi K, Mukaiyama H, Togawa H, Sato M, Shima Y, Miyajima M, Nozu K, Nagao S, Takahashi H, Iijima K, Yoshikawa N. Smad3 gene deletion ameliorates cyst formation and interstitial fibrosis in cpk mouse, a model of ARPKD. 47th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, Philadelphia, USA, 2014/11/13-16. *JASN* 2014; 25: 414A
 2. 浜武継、中西浩一、向山弘展、戸川寛子、佐藤匡、島友子、宮嶋正康、野津寛大、高橋久英、長尾枝澄香、飯島一誠、吉川徳茂: cpk マウス ARPKD モデルにおける病的 Smad3 リン酸化 第 49 回日本小児腎臓病学会 (秋田 2014.6.5)
 3. 浜武継、中西浩一、向山弘展、戸川寛子、佐藤匡、島友子、宮嶋正康、野津寛大、高橋久英、長尾枝澄香、飯島一誠、吉川徳茂: cpkマウスにおける病的Smad3リン酸化 第23回発達腎研究会 (東京 2014.8.31)
 4. 浜武継、中西浩一、向山弘展、戸川寛子、佐藤匡、島友子、宮嶋正康、野津寛大、高橋久英、長尾枝澄香、飯島一誠、吉川徳茂: cpkマウスにおける嚢胞形成に対するsmad3ノックアウトの効果 第22回嚢胞性腎疾患研究会 (東京 2014.9.20)
 5. Sato M, Nakanishi K, Hama T, Mukaiyama H, Togawa H, Shima Y, Miyajima M, Nozu K, Nagao S, Takahashi H, Iijima K, Yoshikawa N. Dysregulation of miR-378a-3p and ADAMTS1 gene in cpk mice, a model of ARPKD. 48th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, November 5-8,2015, San Diego, USA
 6. 佐藤匡, 中西浩一, 浜武継, 向山弘展, 戸川寛子, 島友子, 宮嶋正康, 野津寛大, 長尾枝澄香, 高橋久英, 飯島一誠, 吉川徳茂. cpk マウスにおける嚢胞形成に対する smad3 ノックアウトの効果. 日本小児腎臓病学会学術集会第 50 回記念大会 (2015 年 6 月神戸)

7. Sato M, Nakanishi K, Hama T, Mukaiyama H, Togawa H, Yuko Shima¹, Miyajima M, Nozu K, Nagao S, Takahashi H, Iijima K Yoshikawa N, Suzuki H: Differential expressions of miR-378a-3p/ADAMTS1 in *cpk* mice, a model of ARPKD. 49th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, November 15-20, 2016, Chicago, USA
 8. 佐藤匡、中西浩一、浜武継、向山弘展、戸川寛子、島友子、宮嶋正康、野津寛大、長尾枝澄香、高橋久英、飯島一誠、吉川徳茂、鈴木啓之：cpk マウス ARPKD モデルにおける miR-378a-3p と ADAMTS1 . 第 51 回日本小児腎臓病学会学術集会(2016 年 7 月名古屋)
 9. 佐藤匡、中西浩一、浜武継、向山弘展、戸川寛子、島友子、宮嶋正康、野津寛大、長尾枝澄香、高橋久英、飯島一誠、吉川徳茂、鈴木啓之：cpk マウス ARPKD モデルにおける miR-378a-3p/ADAMTS1 . 第 25 回発達腎研究会(2016 年 8 月 27 日東京)
 10. 佐藤匡、中西浩一、浜武継、向山弘展、戸川寛子、島友子、宮嶋正康、野津寛大、長尾枝澄香、高橋久英、飯島一誠、吉川徳茂、鈴木啓之：cpk マウス ARPKD モデルにおける miR-378a-3p/ADAMTS1 . 第 24 回嚢胞性腎疾患研究会 (2016 年 10 月 6 日東京)
- 〔図書〕(計 7 件)
1. 中西浩一：第2部 ARPKD (常染色体劣性多発性嚢胞腎) 多発性嚢胞腎診療ガイド Q&A 改訂第2版 監修 松尾清一 編集 堀江重郎 診断と治療社 東京 pp127-149, 2015.2.10
 2. 中西浩一：多発性嚢胞腎. こどもの病気 遺伝について聞かれたら. 松原洋一、呉繁夫、佐合治彦編集、pp 108-109、診断と治療社、東京、2015
 3. 中西浩一、吉川徳茂：嚢胞性腎疾患. 「疾患からみる画像診断の進め方・読み方」小児科診療増刊号、pp 216-222、診断と治療社、東京、2015
 4. 中西浩一：嚢胞腎、腎嚢胞. 「今日の小児治療指針第16版」 水口雅、一橋光、崎山弘総編集、pp634-635、医学書院、東京、2015 2015/9/1
 5. 中西浩一、吉川徳茂：織毛病. 「小児疾患診療のための病態生理 2」 「小児内科」「小児外科」編集委員会共編 東京医学社 東京 pp479-485, 2015.11.30
 6. 中西浩一：第 13 章 多発性嚢胞腎 (PKD) 4. ARPKD の診断と治療 「腎と透析診療指針 2016」 腎と透析編集委員会編集 (腎と透析 80 増刊号) pp 425-427 2016/6/10
 7. 中西浩一：多発性嚢胞腎. 「遺伝学的検査・診断・遺伝カウンセリングの上手な進め方」 奥山虎之、山本俊至編 診断と治療社 東京 pp125-128, 2016.10.15
- 〔産業財産権〕
該当なし
- 〔その他〕
該当なし
- 6 . 研究組織
- (1)研究代表者
中西 浩一 (NAKANISHI, Koichi)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：5 0 3 3 6 8 8 0
 - (2)研究分担者
吉川 徳茂 (YOSHIKAWA, Norishige)
和歌山県立医科大学・医学部・臨床研究センター長
研究者番号：1 0 1 5 8 4 1 2
 - (3)連携研究者
島 友子 (SHIMA, Yuko)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：6 0 4 3 3 3 6 4
- 浜 武継 (HAMA, Taketsugu)
和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：00508020

佐藤 匡 (SATO, Masashi)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：30726716

(4)研究協力者

向山 弘展 (MUKAIYAMA, Hironobu)