

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16101

研究課題名(和文)超短鎖型核酸投与による腎線維症の治療

研究課題名(英文)Treatment of renal fibrosis by short miRNA mimic

研究代表者

齋藤 優 (Saito, Suguru)

東京医科大学・医学部・臨床研究医

研究者番号：30793385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではin vivoでのmiR-29bによる腎線維症抑制を目的とした、Micro RNAのデリバリーツールとしてAAV(アデノ随伴ウイルス)を使用した。AAVは非病原性で、近年ではヒト遺伝子治療の臨床試験でも使用されている。AAVには1-11までのセロタイプが存在しており、各セロタイプは異なる組織親和性を有している。腎臓へ効率的に遺伝子導入可能なセロタイプを検証したところ、AAV6の遺伝子導入効率が最も高いことが判明した。miR-29b高発現AAV6ベクターを作成し、腎線維症モデルマウスである、UUOマウスに投与し、腎線維症抑制の検討を行った。結果、腎間質線維化の抑制を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎間質線維化は糖尿病、高血圧など様々な病態が原因とされており、一度起きた線維化は不可逆的である。一般に慢性腎臓病の初期は糸球体病変であり、これに対しては様々な治療法が存在するが、その後進行が進み、間質線維化が病態の中心になると、人工透析導入の大きな原因となっている。そのため腎間質線維化の抑制を治療目標とすることで、将来的に人工透析導入数の減少を目指すことが可能であると考えられる。本研究の成果により、腎線維症の治療法としてmiRNA補充療法を実用化するための可能性を見い出せたと考えられる。またAAVは臨床応用可能なウイルスベクターであり、腎臓への遺伝子治療においても意義ある成果を残せたと考える。

研究成果の概要(英文)：Renal fibrosis is a common feature of CKD, which has no available specific treatment. Previous studies showed that miR-29b inhibits renal fibrosis in mice models. However, an efficient method of kidney-targeted miRNA delivery has yet to be established. Recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors have great potential for clinical application. The distinct AAV serotypes exhibit different tissue tropisms. For kidney-targeted gene delivery, the most suitable AAV serotype has yet to be established. We found that rAAV6 vector is the most suitable for targeting kidney cells regardless of animal species in vitro and rAAV6 is the most suitable vector for kidney-targeted in vivo gene delivery in mice. Intra-renal pelvic injection of rAAV vectors can transduce genes into kidney TECs. Furthermore, rAAV6-mediated miR-29b delivery attenuated renal fibrosis in UUO model by suppressing Snail1 expression.

研究分野：腎臓内科学分野

キーワード：腎線維症 AAV micro RNA miR-29b

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎間質線維化は腎炎、糖尿病、尿管閉塞など様々な病態が発症原因とされており、一度起きた線維化は不可逆的である。一般に慢性腎臓病の初期は糸球体病変であり、これに対しては様々な治療法が存在するが、その後進行が進み、間質線維化が病態の中心となる時期に入ると、腎機能低下速度が上昇し、人工透析導入の大きな原因となっている。そのため腎間質線維化の抑制を治療目標とすることで、将来的に人工透析導入数の減少を目指すことが可能であると考えられる。

2. 研究の目的

疾患に関与する遺伝子を直接標的にすることが可能な核酸医薬は、次世代の分子標的治療薬として期待されており、中でも microRNA-29b(miR-29b)は抗線維化作用を有することが報告されている。そこで本研究では microRNA-29b による腎線維症の抑制を目指した。TGF- β は腎間質線維化の主要なメディエーターであり、その刺激により細胞外マトリックスの蓄積を促進する。近年、腎臓病における TGF- β シグナルと microRNA(miRNA)発現との関係性が注目されている。中でも miR-29 ファミリーは TGF- β シグナルを阻害することで、細胞外マトリックスの蓄積・上皮間葉転換を抑制し、腎臓を線維化から守る働きを持つことが知られている。miR-29 は腎臓・肺・心臓に豊富に存在するが、線維化が起こるとその発現量は低下する。miRNA 補充療法は、線維化の過程で発現が低下した線維化抑制性の miRNA を外から補充することで、その miRNA が標的にする複数の線維化に関与する遺伝子を抑制するという戦略に基づいた革新的な治療法である。TGF- β は線維化において中心的な役割を果たしているが、その他の機能は多岐に渡り、個体発生や組織再構築、創傷治癒、炎症・免疫など幅広い領域で重要な役割を担っている。そのため、TGF- β を治療の直接標的にすることは出来ない。miR-29b は TGF- β を直接の標的とはせず、その下流の遺伝子を標的にすることでコラーゲンなどの細胞外マトリックス発現を抑制する。microRNA をはじめとする核酸医薬はそのデリバリーツールが確立されておらず、本研究では AAV(アデノ随伴ウイルス)に着目した。AAV は非病原性で、近年ではヒト遺伝子治療の臨床治験でも使用されている。AAV には 1-11 までのセロタイプが存在しており、各セロタイプは異なる組織親和性を有している。そこで本研究では腎臓に最も効率的に遺伝子導入可能な AAV のセロタイプを検証した。また miR-29b 発現 AAV ベクター投与による腎線維症抑制の検討も行った。

3. 研究の方法

1)腎臓へ高効率で感染する AAV ベクターのセロタイプを検討した。セロタイプ 1 から 9 の GFP 発現 AAV ベクターを尿管上皮細胞株および、腎線維芽細胞株へ感染後、フローサイトメトリーで解析した。結果、AAV2/6 の感染効率が高かった。同様にマウス腎臓へ経腎盂的にセロタイプ 1 から 9 の GFP 発現 AAV ベクターを投与した。結果、AAV6 の感染効率が高かった。2) miRNA-29b 高発現 AAV ベクター作製のため、miRNA-29b 前駆体の二次構造を検討した。結果、miRNA-29b 高発現 AAV ベクターの作成に成功した。同ベクターの腎臓細胞への感染により type1 collagen, Snail1 mRNA 発現量の有意なノックダウンを認めた。3)miR-29b 高発現 AAV ベクターの経腎盂的投与による腎線維症抑制の検討を行った。腎線維症モデルマウスとして片側尿管結紮を行う UUO モデルを使用した。

4. 研究成果

本研究では感染部位特定のため GFP 発現 AAV ベクターを投与した。結果、経腎盂的投与により AAV6 ベクターは広範囲に尿管上皮細胞へ感染することが分かった(図1)。

続いて本研究では miR-29b 高発現 AAV ベクター作製のため、miRNA-29b 前駆体の二次構造を検討した。(図2)で示すように4種類のベクターを作成し、それぞれにおける miR-29b 発現効率、標的遺伝子のノックダウン効率を評価した。まず1つ目が通常の precursor 体、2つ目が miR-29b-precursor 体のループ構造を miR-30 のループ構造に変更したものである。このループ構造は先行研究でより安定性が高く、より Dicer によるプロセッシングが促進される構造であると報告されている。続いて3つ目は primary 体、4つ目は primary 体をタンデムに配列したベクターである。

これら4種類のベクターを尿管上皮細胞に感染させた後、miR-29b の発現および標的遺伝子である Col1a1, Snail1 のノックダウン効率を RT-qPCR で評価した(図3)。結果、miR-30 のループ構造を有するベクターにおいて miR-29b の発現が高く、Col1a1, Snail1 のノックダウン効率も高いことが分かった。以上より本研究

図1

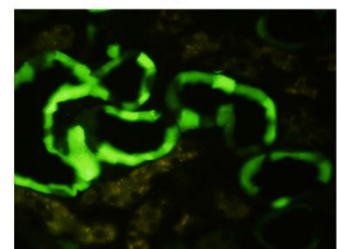
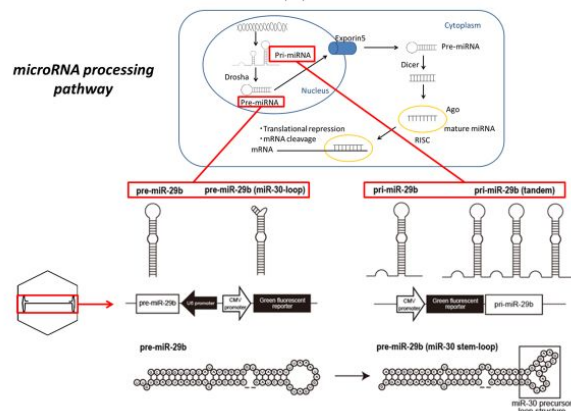
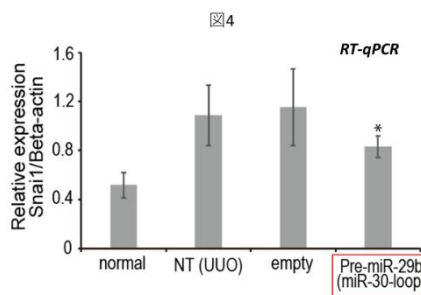
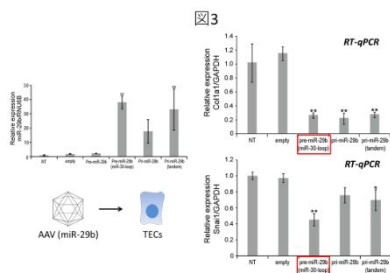


図2



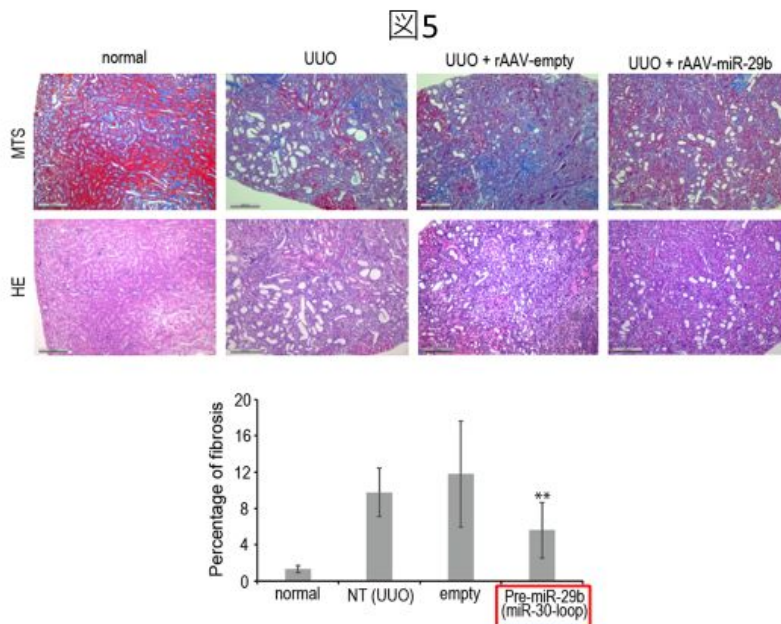
において miR-29b 高発現 AAV ベクターの作成に成功した .



先行研究において尿管上皮細胞における Snai1 発現をノックダウンすることで、腎間質線維化が抑制されることが報告されている . 従って miR-29b 高発現 AAV ベクターの尿管上皮細胞への感染により腎間質線維化が抑制されることが予想される .

続いて本研究では UUO 作成 3 日後に AAV ベクターを投与し ,10 日目に RT-qPCR で Snai1 発現を評価した , 結果 , miR-29 発現 AAV ベクター投与群では Snai1 mRNA 発現がノックダウンされることが分かった (図 4) .

続いて AAV ベクター投与後の腎間質線維化を , マッソントリクローム染色で評価した (図 5) . 一番左側が何も処置をしていない normal 群 2 つ目が UUO のみを施した UUO 群 , 3 つ目が UUO マウスに空の AAV ベクターを投与したコントロール群 , 一番右が UUO マウスに miR-29b 発現 AAV ベクターを投与した群である . 下のグラフではマッソントリクローム染色における間質線維化の面積率を示している . 結果 , UUO 群 , コントロール群と比較して



miR-29b 発現 AAV ベクター投与群では有意に腎間質線維化が抑制されることが分かった . 以上から miR-29 発現 AAV ベクターの尿管上皮細胞への感染により Snai1 発現が抑制され , 結果 , 腎間質線維化が改善することが示唆された .

本研究の成果により AAV6 ベクターの腎遺伝子治療への可能性 , micro RNA 補充療法の臨床応用の可能性が示されたと考える .

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saito Suguru, Ohno Shin-ichiro, Harada Yuichirou, Oikawa Keiki, Fujita Koji, Mineo Shouchirou, Gondo Asako, Kanno Yoshihiko, Kuroda Masahiko	4. 巻 12
2. 論文標題 rAAV6-mediated miR-29b delivery suppresses renal fibrosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 1345-1356
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10157-019-01783-w	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 -

〔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 Suguru Saito
2. 発表標題 rAAV6-mediated miR-29b delivery suppresses renal fibrosis
3. 学会等名 American Society of Nephrology Kidney Week（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤 優
2. 発表標題 AAV-mediated miR-29b delivery suppress renal fibrosis
3. 学会等名 第9回RNAi研究会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 齋藤 優
2. 発表標題 AAV6ベクターを介したmiR-29b補充療法による腎線維化の抑制
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----