

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08644

研究課題名(和文)腎臓病に伴う副甲状腺腫瘍化における機能性RNAの機能解析

研究課題名(英文) Analysis of functional RNA in parathyroid tumorigenesis associated with kidney disease

研究代表者

金井 厳太 (Kanai, Genta)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：00535221

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)：慢性腎臓病において発症する二次性副甲状腺機能亢進症は、心血管疾患の合併によって生命予後を脅かす重大な疾患である。カルシウム受容体とビタミンD受容体発現低下は、副甲状腺ホルモン産生と細胞増殖を誘導することが知られているが、その作用機序には不明な点が多い。microRNAが副甲状腺の細胞機能に影響を与えていることから、本研究では機能性RNAとそのターゲット候補を同定し、副甲状腺結節内における局在を調査する。副甲状腺から回収したRNAの網羅的解析によって得た機能性RNAを候補として、副甲状腺細胞での発現を測定し分析する。機能性RNAとその標的分子との関連を評価することで、作用機序を明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では副甲状腺細胞腫瘍化における細胞増殖の機序の一端を明らかにした。この結果はこれまで不明であった二次性副甲状腺機能亢進症の進展に関与する新たな分子制御機構の解明の一助になると考える。また副甲状腺に関連したmicroRNAを対象とするバイオマーカーの開発はこれまで行われておらず、本研究の応用によって新たな診断方法の開発が期待される。この研究の成果によって二次性副甲状腺機能亢進症の根本治療における論理的な支柱を形成し治療戦略の基礎が確立されるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Secondary hyperparathyroidism, which develops in the context of chronic kidney disease, is associated with poor prognosis due to the presence of cardiovascular complications. The downregulation of calcium-sensing receptors and vitamin D receptors is known to stimulate the production of parathyroid hormone and cell proliferation, yet many aspects of the underlying mechanisms remain unclear. In this study, we aimed to consider microRNAs that impact the function of parathyroid cells, with the objective of identifying functional RNAs and their target sequences, as well as investigating their localization within parathyroid nodules. We conducted comprehensive RNA analysis of parathyroid tumors and analyzed whether the obtained functional RNAs exhibit altered expression in parathyroid cells under certain conditions. By evaluating the relationship between functional RNAs and their target sequences, we anticipate gaining insights into the mechanisms of action.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：副甲状腺機能亢進症 microRNA 次世代シーケンサー 慢性腎臓病

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD) において必発する二次性副甲状腺機能亢進症 (SHPT) は、心血管疾患の合併によって生命予後を脅かす重大な疾患である。副甲状腺におけるカルシウム受容体 (CASR) 作動薬の登場により、今日では透析下における SHPT の治療は手術による根治療法から薬物療法に大きく変化したが、この薬物治療は SHPT を根治せず、透析患者のような慢性疾患においては生涯投与する必要があり医療費増大の一因となっている。SHPT の発症における原因には低カルシウム、ビタミン D 欠乏やリン酸による刺激が考えられているが、それらの制御をもって発症を抑え腫瘍化の進展を完全に抑制することは困難であり、臨床ではしばしば治療抵抗性を獲得した難治性 SHPT に陥る。これは、SHPT 発症メカニズムがいまだ不明なため、根本的に腫瘍化を抑制する方法がないためである。このような腫瘍化に関連する有用なバイオマーカーがないことも、難治性 SHPT の発症や進展予測を困難にしている。SHPT では CASR やビタミン D 受容体 (VDR) の発現が低下することで、それらの反応性の喪失により PTH 分泌調節機構を破綻させ副甲状腺腫瘍化を誘導する【Ho C et al. Nat Genet. 1995 Dec;11(4):389-94.】。SHPT にみられる副甲状腺過形成では、びまん性増殖を経て結節性増殖をきたすことが特徴であり、副甲状腺腫瘍化において結節内のモノクローナル増殖が認められており、結節ごとの遺伝子変異が示唆されている【Tominaga Y et al. World J Surg. 1996 Sep;20(7):744-50.】。重度の SHPT では CDKN1A(p21)、CDKN1B(p27) 発現低下にみられる細胞周期亢進が報告されており【Tokumoto M et al. Kidney Int. 2002 Oct;62(4):1196-207.】。TGF およびその受容体である EGFR 発現の増強が腎疾患に伴う副甲状腺過形成の原因として知られている。低カルシウムや高いリン酸の刺激によって TGF および EGFR の発現が亢進する一方、ビタミン D はサイクリン依存性キナーゼを阻害する p21 の発現を増加させることで、リン酸による分裂促進シグナルを防ぐ作用を持つ【Arcidiacono MV et al. J Am Soc Nephrol. 2008 Feb;19(2):310-20.】。SHPT では副甲状腺サイズの増大に伴って VDR や CASR の発現低下が認められることから、これらの分子が腫瘍化に関連することが示唆されている【Arcidiacono MV et al. J Am Soc Nephrol. 2008 Oct;19(10):1919-28.】。

申請者はこれまでにヒト副甲状腺細胞培養系を作成し機能性 RNA を用いて PTH 産生分泌を抑制することで、副甲状腺における PTH 分泌調節機構の一端に機能性 RNA が関与していることを報告した【Kanai G et al. Kidney Int. 2009 Mar;75(5):490-8.】。機能性 RNA を代表する miRNA は 18-26 塩基の non-coding RNA で、mRNA に結合することにより細胞増殖、アポトーシス、代謝などに関連する多くの遺伝子やタンパク質の発現を制御している。miRNA は正常組織と腫瘍組織では発現量や種類が異なり、血液や尿などに分泌される miRNA は新たなバイオマーカーとして期待されている。しかし、CKD に伴う SHPT での miRNA の役割は不明な点が多く、これまで十分な検討が行われていない。近年、副甲状腺における Dicer knockout モデルによって CASR を介した PTH 分泌機構に miRNA が関与していることが明らかとなった【Shilo V et al. FASEB J. 2015 Sep;29(9):3964-76.】。CKD に伴う SHPT では機能性 RNA が PTH 産生分泌および細胞周期調節に寄与する可能性が高いが、そのメカニズムについては不明な点が多く残されている。副甲状腺で miRNA と細胞周期との関連を示した報告は未だ存在せず、SHPT における結節内のモノクローナル増殖の背景にある機能性 RNA の役割に注目し本研究を立案するに至った。本研究の目的は、これまでに SHPT 患者の副甲状腺から回収した RNA の網羅的解析によって得た機能性 RNA のデータベースを用い、副甲状腺機能を制御する miRNA とその機能を明らかにし、副甲状腺内の結節毎の発現の違いや、CKD に伴う SHPT の細胞周期に関わる分子における機能性 RNA の作用についてモデル動物を用いて検証することである。また、血中の機能性 RNA の発現量を測定することで、SHPT の発症や進展予測に有効な治療抵抗性を示すバイオマーカーとなり得るのではないかとこの着想を得て、その有用性を検証するための基盤研究を行うことを計画した。

2. 研究の目的

本研究では副甲状腺細胞における分泌制御と細胞増殖にかかわる分子に対してこれまでに検討されていない機能性 RNA の作用を明らかにする。これにより SHPT 進展に関与する新たな分子制御機構の解明が期待される。また副甲状腺に関連した miRNA を対象とするバイオマーカーの開発はこれまで行われておらず、本研究の創造性・独創性を高めている。この研究の成果によって、SHPT の根本治療における論理的な支柱を形成し治療戦略の基礎が確立されるものと考えている。

(1) データベースから選別した低分子 RNA の中から PTH 産生制御活性や脱顆粒制御活性をもつ機能性 RNA とそのターゲット候補を同定し、副甲状腺結節内における局在を調査するこれまでに SHPT 患者の副甲状腺から回収した RNA の網羅的解析によって得た機能性 RNA のデータベースの中で CASR や VDR への結合が予測される miRNA を候補として、副甲状腺細胞での発現を測定し分析する。miRNA とその標的分子との関連を評価することで、副甲状腺細胞における miRNA の機能を明らかにし、in situ hybridization (ISH) を行い結節内の局在を明らかにする。

(2) 副甲状腺細胞増殖に制御活性のある miRNA とその標的 mRNA を同定し、高リン環境における miRNA 発現の差異を分析し、動物モデルで長期的な miRNA 効果の持続を確認する上記のデータベースの中で CDKN1A や CDKN1B への結合が予測される miRNA を候補として、副甲状腺細胞での発

現を測定し分析する。アデニン腎不全モデルラットを用いて、高リン環境における副甲状腺の遺伝子発現解析を行い、miRNA とその標的分子との関連を評価することで細胞周期における miRNA の機能を明らかにする。マウスゼノグラフトで miRNA の長期的な効果を評価する。

(3) 組織・体液中の機能性 RNA が疾患バイオマーカーとなるかを明らかにする

Real-time PCR (qPCR) を用いて、先に同定した miRNA の発現を組織切片上にて確認する。血液・尿中に含まれるエクソソームから miRNA を抽出し、摘出組織における miRNA 発現と比較する。CKD の病期毎あるいは副甲状腺摘出術前後で機能性 RNA の発現を比較することでバイオマーカーとしての有用性を評価する。

3. 研究の方法

副甲状腺腫瘍化における機能性 RNA の同定と機能解析 SHPT 患者から摘出した副甲状腺腫より次世代シーケンサー (NGS) によって取得した機能性 RNA データベースを用いて、同一個体内の最大腺および最小腺で比較した配列を抽出した。それらを TargetScan によって 3' UTR 領域における相補配列を含む特性から標的 mRNA (CASR, VDR, PTH, CGA, LRP2, Klotho, FGFR1, CASP3, CCND1, CCND2, CDKN1A, CDKN1B, MKI67, TGFA, EGFR) に対する候補となる機能性 RNA を選別し、副甲状腺初代培養細胞を用いて *in vitro* にて機能検証を行った。これまでの実験から副甲状腺結節内の遺伝子発現パターンに差があることが示唆され、組織切片上で発現低下がある単結節部分と正常組織を含むびまん性結節部分をそれぞれ選択的に回収後、標的 mRNA および miRNA の結節毎の発現を qPCR にて解析した。また ISH にて結節毎の遺伝子発現局在を調査した。

前年度の研究結果から、候補となる miRNA を対象としてプローブをデザインし、組織・体液中の機能性 RNA の検出とその意義の解明のため SHPT 患者の摘出組織を用いて qPCR を行った。これらの発現結果と CASR、VDR、PTH の発現を比較し相関性を検討し、臨床病理学的因子との関連を解析するため、CKD 患者の血液から超遠心分離法により miRNA を含むエクソソームを分離し、RNA を抽出後 qPCR により組織中で確認された miRNA を検出した。今後、eGFR60 未満かつ 30 以上の軽症 CKD 患者、eGFR30 未満の重症 CKD 患者、SHPT 術前および術後での miRNA 発現量を比較することにより、体液中の miRNA が SHPT の発症や進展予測に有効な治療抵抗性を示すバイオマーカーとなり得るかを検討する予定である。

4. 研究成果

これまで、副甲状腺の miRNA 解析により、細胞機能を制御する miRNA の検討を行ってきた。その結果によれば、組織中の miRNA 発現量はいくつかの受容体の発現量と反比例することから、SHPT の進行過程において受容体の発現制御に関わる miRNA が受容体の発現低下と反比例して発現量が増幅すると推測され、腫瘍化や機能制御に関連する miRNA が SHPT の進展予測および治療抵抗性マーカーとしての機能を有する可能性が認められた。SHPT ではしばしば、4 腺の副甲状腺のうち 1 つが主病巣となり腺重量差が認められる。この最大腺においては結節内のモノクローナル増殖による遺伝子変異が原因と思われるため、NGS にて網羅的に発現解析を行ったところ、既知の機能を持つ miRNA の他に新たに 4 つの配列 (miR-486, miR-10, miR-127, miR-500) で有意差を認めた。また、本解析で用いた human miRNA database では今回検出された配列情報の 21.67% に既知の miRNA 情報を含んでおり、その他の noncoding RNA についても豊富な発現を認める 21 配列に有意差を認めた。このことから、SHPT の進行過程において受容体の発現制御に関わる miRNA が受容体の発現低下と反比例して発現量が増幅すると考え、組織内よりサンプリングした複数個所で定量 PCR を行った結果、局在毎に発現強度が異なることが明らかになった。これにより腫瘍化や機能制御に関連する miRNA が SHPT の進展予測および治療抵抗性マーカーとしての機能を有する可能性が示唆された。

この結果は、腫瘍化の進行した副甲状腺において遺伝子発現プロファイルが異なることを示唆しており、SHPT の進行過程において機能性 RNA の発現と受容体および細胞周期に関連する分子が同時に変化している可能性が考えられた。さらに、miRNA の網羅的解析においてひとつの副甲状腺内に存在する複数の結節毎の発現を比較したところ、発現プロファイルに差異を認めたことから SHPT の進行過程におけるモノクローナル増殖の背景に miRNA の関与があることを着想し、既知の miR-148 について *in situ hybridization* を行った結果、結節毎に発現強度が異なる傾向が認められた。ヒト副甲状腺細胞を用いた *in vitro* 実験では、腫瘍進展において抑制されているであろう miRNA が、その実験的な制御によっても細胞周期を亢進させるように遺伝子発現を変化させ得ることが明らかとなった。今後、副甲状腺腫瘍化の進展過程における結節内のモノクローナル増殖の解明には、シングルセルゲノミクスでの解析が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金井 徹太
2. 発表標題 二次性副甲状腺機能亢進症における遺伝子発現調節機序の解析
3. 学会等名 第68回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2023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	澤田 佳一郎 (Sawada Kaichirou) (10420952)	東海大学・医学部・客員講師 (32644)	
研究分担者	角田 隆俊 (Kakuta Takatoshi) (50276854)	東海大学・医学部・教授 (32644)	

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