

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05634

研究課題名(和文) 伴侶動物の尿中エクソソーム由来マイクロRNAの解析：革新的腎障害マーカーへの応用

研究課題名(英文) Urinary exosome-derived microRNAs in companion animals: application for kidney injury markers

研究代表者

市居 修 (Osamu, Ichii)

北海道大学・獣医学研究院・准教授

研究者番号：60547769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,600,000円

研究成果の概要(和文)：伴侶動物およびヒト共に腎臓病の増加は深刻である。腎臓は再生しにくく、早期診断は腎臓病対策の要である。本研究では、獣医学における非侵襲的Liquid biopsyを実現すべく、そのマーカー候補を動物の尿中エクソソーム由来マイクロRNAから探索した。網羅的RNA発現解析ならびに病態解析から、miR-26aを糸球体傷害マーカー候補として同定した。また、miR-26aは動物種横断的に糸球体に発現し、汎動物学的マーカーとしての可能性も示された。一方、臨床応用に向け、複数のmiRNAマーカー候補、腎機能との相関、病態早期における動態、尿細管間質障害との関連性等を明らかにすることを今後の課題として見出した。

研究成果の概要(英文)：The patients with kidney disease are increasing in both companion animals and human. Early diagnosis is a crucial therapeutic strategy for non-regenerative kidney. In this study, we tried to find the biomarker candidates from urinary exosome-derived microRNA to develop the non-invasive "Liquid Biopsy". In the comprehensive expression analysis and pathological analysis of animals, we identified miR-26a as a candidate for renal glomerular injury marker. Further, several animal species commonly expressed miR-26a in their glomeruli, indicating a possibility of animal species-crossing biomarker. Further, for the application of miRNA to clinical area, we need to clarify further miRNA marker candidates, their correlations with renal function, their dynamics at early disease stage, and their pathological relations with tubulointerstitial lesions.

研究分野：獣医学、腎泌尿器学、分子形態学

キーワード：腎臓 エクソソーム microRNA バイオマーカー Liquid Biopsy 汎動物学 尿 イヌ・ネコ

1. 研究開始当初の背景

背景：伴侶動物で増加する悪性疾患

慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease: CKD) は、日本国民の 8 人に 1 人が罹患する新たな国民病であり、1) 明らかな腎障害の存在、2) 腎機能の低下のいずれか、または両方が慢性的に持続する病態である。伴侶動物の高齢化を背景に獣医学臨床でも CKD 罹患率は急増しており、イヌおよびネコの死亡要因の上位を占める。さらに CKD は、他の疾患、特に循環器疾患のリスクを増加させる悪性の基礎疾患である。CKD 動物は保存療法を生涯必要とし、動物・オーナーの負担は計り知れない。

背景：獣医学における CKD 対策の遅延・診断ツール不足の原因

唯一の CKD 対策は早期発見と迅速な腎臓保護療法の導入にあるが、“動物種差”が獣医学の CKD 研究および新規診療法開発の障壁となっている。つまり、ヒトでは尿中アルブミンを代表とするバイオマーカー蛋白が CKD 診断に応用されているが、獣医学では蛋白構造の種差が研究・臨床応用を困難にし、実験動物を用いた研究でもその検出は高価かつ煩雑なキットに頼る。

加えて、CKD の病態はイヌとネコで異なることが臨床的に知られている。つまり、獣医学に求められる CKD 対策とは、動物種に合ったテーラーメイドの研究と診療法の実施であるが、現在の獣医学には“動物を傷つけず、早期に腎臓の傷害部位、その程度を診断するツール”が絶対的に不足している。

背景：獣医療に応用すべき革新的なバイオマーカー

本研究の基軸たる概念として、“腎臓の細胞が放出し、かつ尿中で検出できるバイオマーカーは、腎局所病変の存在ならびに腎病理型の非侵襲的予測に有用である”ことを掲げる。

これまで報告者は CKD に罹患したマウス、イヌ、ネコを解析し、特定の腎構成細胞の傷害を示し、かつ尿中に出現するバイオマーカー候補蛋白・mRNA 等を発見・報告してきた(市居ら: *Lab Invest* 2010; *Histol Histopathol* 2011; 木村・市居ら: *PLoS One* 2011)。一方、これら蛋白・mRNA の臨床応用には構造の不安定性と動物種差に問題点を抱える。

そこで報告者は、次世代バイオマーカーとしてマイクロ RNA (miRNA) に着目した。miRNA は短鎖の RNA (18-25bp) であり、標的 mRNA と結合し、転写後調節因子として機能する。以下に、獣医腎泌尿器学への臨床応用における miRNA の生物学的利点を示す。

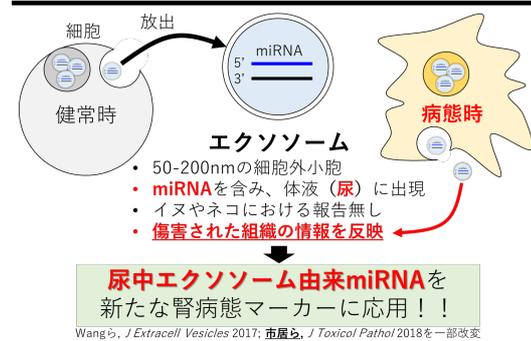
セントラルドグマの上流に位置するため、mRNA や蛋白よりも発現制御に動物種差が少なく、塩基配列も動物種間で高度に保存されている

短鎖の核酸であるため、構造が安定してお

り、尿中でも分解されにくい

本研究では、伴侶動物の CKD 進行に關与する miRNA を世界に先駆けて同定し、革新的な尿中バイオマーカーに応用する。

尿中の小さなカプセル“エクソソーム”



2. 研究の目的

近年、体液中の miRNA はエクソソームと呼ばれる小胞 (約 50-200 nm) に含まれていることがわかった。そこで本研究では、伴侶動物の尿中エクソソームに由来する CKD バイオマーカー miRNA を同定し、その miRNA が制御する分子病態の詳細を解明後、バイオマーカー miRNA の尿中検出を基礎とする CKD の早期診断法・非侵襲的病理診断法を確立する。研究期間内に以下の項目を明らかにする。

CKD 初期のイヌおよびネコの尿中で変動するエクソソーム由来 miRNA を同定する。同定した miRNA の尿中動態と CKD 病理の相関を明らかにする。

同定した miRNA が制御する腎臓内の局所病変を明らかにする。

以上により、臨床展開への基盤を完成させ、獣医療に miRNA による CKD 診断法を導入する

3. 研究の方法

CKD 罹患動物の尿中エクソソーム由来 miRNA を解析し、診断ツールとしての特性を明らかにする。

CKD 罹患時に変動する miRNA の同定：網羅的発現解析によって、CKD 初期のイヌ・ネコの“尿で変動する miRNA”をバイオマーカー候補として選抜する。

候補 miRNA の変動が意味する病理学的意義の解明：CKD に罹患した動物の腎臓および尿で候補 miRNA が変動するとき、腎臓の病理像および機能に起こる変化を精査し、候補 miRNA が“どのようなバイオマーカーとなるのか”を明らかにする。

具体的な方法として、下記の通りに実施した。

方法 1. 尿中エクソソームの観察

北海道大学動物医療センターならびに民間動物病院の協力を得て、イヌおよびネコの尿を採取した。市販のキットを用いて尿からエクソソームを精製し、エクソソームマーカー TSG101 のウエスタンブロッティング解析を行った。また、走査型電子顕微鏡による形態

観察を行った。

方法2 . 尿中エクソソーム由来 miRNA の発現解析

上記動物病院に来院したイヌとネコから腎機能データ(血中 BUN・血中クレアチニン(CRE))を得た。これらの値を基に腎機能正常個体(健常群)と腎機能悪化個体(腎臓病群)に分けた。方法1で収集した尿を用い、市販の抽出キットで尿中エクソソーム由来 RNA を精製し、次世代シーケンス解析を行った。また、マーカー候補となる miRNA については TaqMan PCR 法で定量的に解析し、各個体の腎機能データとの相関を解析した。

方法3 . 腎組織内 miRNA の発現解析

上記動物病院に来院した症例において、腎生検や剖検実施個体から腎組織を収集した。腎組織のパラフィン切片を作成し、レーザーマイクロダイセクション(LMD)法で糸球体と尿細管間質を切り出した。各組織の miRNA 発現を TaqMan PCR 法で定量し、個体の腎機能データや腎病理スコアとの相関を解析した。

方法4 . 尿細管間質障害モデルの解析

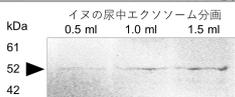
方法1-3を遂行するに当たって生じた問題を解決すべく、方法4を計画した。

ネコは尿細管間質病変を主体とする腎病変を呈するが、これまでその病変を模倣する有用な自然発症モデル動物は確立されておらず、それは miRNA 研究の進行において大きな課題となった。報告者らは新たな腎臓病モデル動物としてコットンラット(*Sigmodon hispidus*)に着目し、その病理像を解析した。

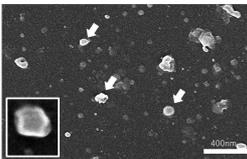
4 . 研究成果

成果1 . 動物の尿に出現するエクソソーム

エクソソームマーカー TSG101 の検出



イヌ尿中エクソソームの電子顕微鏡像



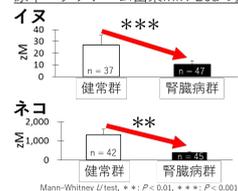
左図のように、動物の尿中にもエクソソームが出現することを明らかにした。また、電子顕微鏡解析によってその形態を明らかにした。形態はやや不整形であり、尿や保存方法による影響が考えられた。

成果2 . バイオマーカー候補の選抜

- 尿中エクソソーム由来 miRNA 発現
 - イヌとネコの腎臓でも発現
 - リード数が100以上
 - 群間の発現差が2倍以上
 - 病態関連エビデンス
- 腎臓内 miRNA 発現

miR-26a, miR-146a, miR-21a, miR-486a, miR-10a, miR-10b

尿中エクソソーム由来 miR-26a の量



腎機能数値との相関

種別	血中尿素窒素 (BUN)	血中クレアチニン (CRE)
イヌ (n=84)	-0.385***	-0.425***
ネコ (n=87)	-0.257*	-0.204*

過去に明らかにしたのイヌとネコの腎臓内 miRNA 発現データ(市居ら, *Res Vet Sci* 2014)

ならびに今回の尿中エクソソーム由来 miRNA の次世代シーケンス解析結果(リード数や健常群と腎臓病群の差異等)から包括的に判断し、miR-26a, miR-146a, miR-21a, miR-486a, miR-10a および miR-10b をバイオマーカー候補として選抜した。

特に、イヌおよびネコ共に腎臓病群の尿中エクソソーム由来“miR-26a”の量は健常群のそれよりも有意に低下し、その値は腎機能数値(BUN, CRE)と負の相関を示した(左下図、未公表データを含む)。また、両パラメーターの相関において、イヌがネコよりも強い相関を示す傾向にあったが、両種ともに尿中エクソソーム由来 miR-26a と腎機能数値(BUN, CRE)の相関はやや弱い傾向にあった。

成果3 . バイオマーカー候補の腎臓内発現



マウスにおいて、miR-26a は糸球体を構成する足細胞(ポドサイト)に発現し、その細胞傷害の進行と共に発現が減少することをすでに明らかにしている(市居ら, *PLoS One* 2014)。この報告と同様、イヌやネコの腎臓においても miR-26a は尿細管間質よりも糸球体に強く発現していた。また、イヌの糸球体内 miR-26a 発現量は腎機能数値(BUN, CRE)や糸球体病理傷害スコアと有意な負の相関を示した(上図)。一方で、イヌの尿細管間質内 miR-26a 発現量と腎病態スコアの間には有意な相関は認められなかった。

CKD において、イヌはネコよりも糸球体傷害(ポドサイト傷害)を強く示す傾向にあるため(市居ら, *Histol Histopathol* 2011)、“腎臓内 miR-26a の動態”と“腎病態の種差”との関連性が考えられた。

成果4 . 尿細管間質障害マーカー候補の探索

前述のように、ネコでは尿細管間質病変が強く現れる傾向にあり、尿細管間質障害マーカー miRNA の同定は重要である。成果2で選抜したマーカー miRNA において、miR-21a および miR-146a は尿細管間質病変の形成に関与する(市居ら, *Kidney Int* 2012; Chau ら *Sci Transl Med* 2012)。一方、本研究で収集したネコの腎組織では、すでに重度の線維化が進行しており、尿細管間質病変とこれらのバイオマーカー miRNA 候補の病理学的相関の解析は困難であった。

そこで報告者らは、モデル動物の利用を考え、コットンラットを新たな尿細管間質病変モデルとして見出した。本動物はリンパ球浸潤を伴う尿細管間質病変と腎性貧血を加齢性に発症し、その病態はエストロゲンに増悪されることを明らかにした。

現在、本モデル動物を用い、尿細管間質病変と miRNA の関連性を継続して解析している。

【まとめと今後の展望】

本研究によって、動物(イヌ、ネコ)の尿中にもエクソソームが出現し、その中に含まれる特定の miRNA は腎組織傷害を知らせる“Liquid Biopsy マーカー”になる可能性を見出した。特に、miR-26a は動物種横断的に糸球体に強く発現しており、糸球体傷害を知らせる“汎動物学的マーカー”になり得る。一方、尿中エクソソーム由来 miRNA 量と腎機能数値(BUN、CRE)の相関は低い傾向にあり、臨床応用のためには他の腎機能指標(尿中アルブミン値)との相関解析や、病態早期における動態解析によって、尿中エクソソーム由来 miRNA のバイオマーカーとしての有用性・病態意義を今後明らかにする必要がある。また、尿細管間質障害マーカー miRNA の検証を進め、複数の miRNA マーカーを用いた腎臓病の Liquid Biopsy パネル診断を実現したい。

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7件)

1. Ichii O(計9名、1番目). Close pathological correlations between chronic kidney disease and reproductive organ-associated abnormalities in female cotton rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2018. 243(5):418-427. doi: 10.1177/1535370218758250. 査読有.
2. Ichii O and Hotino T. MicroRNAs associated with the development of kidney diseases in humans and animals. *J Toxicol Pathol*. 2018. 31(1):23-34. doi: 10.1293/tox.2017-0051. 査読有.
3. Ichii O(計8名、1番目). Hydronephrosis with ureteritis developed in C57BL/6N mice carrying the congenic region derived from MRL/MpJ-type chromosome 11. *Autoimmunity*. 2017. 50(2):114-124. doi: 10.1080/08916934.2016.1261831. 査読有.
4. Ichii O(計8名、1番目). IL-36 Regulates Tubulointerstitial Inflammation in the Mouse Kidney. *Front Immunol*. 2017. 8:1346. doi: 10.3389/fimmu.2017.01346. 査読有.
5. Ichii O(計15名、1番目). Urinary exosome-derived microRNAs reflecting the changes of renal function and histopathology in dogs. *Sci Rep*. 2017. 7:40340. doi: 10.1038/srep40340. 査読有.
6. Masum MA, Ichii O(計5名、2番目) Local CD34-positive capillaries decrease in mouse models of kidney disease associating with the severity of glomerular and tubulointerstitial lesions. *BMC Nephrol*. 2017. 18(1):280. doi: 10.1186/s12882-017-0694-3. 査読有.
7. Ichii O(計12名、1番目). Female cotton rats (*Sigmodon hispidus*) develop chronic anemia with renal inflammation and cystic changes. *Histochem Cell Biol*. 2016. 146(3):351-362. doi: 10.1007/s00418-016-1438-3. 査読有.

[学会発表](計19件)

1. Osamu Ichii, Junpei Kimura, Tadashi Okamura, Taro Horino, Teppei Nakamura, Hayato Sasaki, Yaser Hosny Ali Elewa, Yasuhiro Kon. IL-1F6/IL-36 SIGNALING REGULATES RENAL INFLAMMATION. The 6th Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists (Asian AVA). 2017年10月15日マレーシア クチン.
2. 市居 修, 堀野 太郎, 大田 寛, 鈴木 崇史, 中村 鉄平, Yaser Hosny Ali Elewa, 昆 泰寛. Caspase3 欠損マウスからみる細胞死 - 自己免疫関連異常の新たなエビデンス. 第160回日本獣医学会. 2017年9月14日. 鹿児島県鹿児島市. 鹿児島大学.
3. Md. Abdul Masum, 市居 修, Yaser Hosny Ali Elewa, 中村 鉄平, 昆 泰寛. Pathological correlations between endothelial cells and podocytes in autoimmune-related injury of the mouse glomerulus. 第160回日本獣医学会. 2017年9月14日. 鹿児島県鹿児島市. 鹿児島大学.
4. Md. A. Masum, O. Ichii, Y. H. A. Elewa, T. Nakamura, Y. Kon, T. Loss of endothelial fenestration correlates with podocyte injury in the mouse model of membranoproliferative glomerulonephritis. The 5th Sapporo Summer Seminar for One Health (SaSSOH). 2017年9月14日. 北海道札幌市. 北海道大学.
5. 中村鉄平, 市居 修, 入江隆夫, 孝口裕一, 寸田祐嗣, 堀野太郎, 辰巳治, Yaser Hosny Ali Elewa, 昆 泰寛. 雌性コットンラット(*Sigmodon hispidus*)にみられる慢性腎臓病 - 子宮蓄膿症及び性ホルモンの関与 -. 第10回日本獣医腎泌尿器学会. 2017年8月20日. 千葉県浦安市. 東京ベイ舞浜ホテル.
6. 市居 修, 木村 純平, 岡村 匡史, 堀野 太郎, 中村 鉄平, 矢吹 映, 佐々木 隼人, Yaser Hosny Ali Elewa, 昆 泰寛. 尿細管間質病変に關与する IL-36 シグナリング. 第10回日本獣医腎泌尿器学会. 2017年8月20日. 千葉県浦安市. 東京ベイ舞浜ホテル.

7. **市居 修**. RNA から展開する腎臓病研究 ~ 獣医臨床へのアプローチ ~. 第13回日本獣医内科学アカデミー学術大会. 2017年2月17日. 神奈川県横浜市. パシフィコ横浜.
 8. **市居 修**. 腎臓病を知らせる microRNA - 病態マーカーとしての可能性と問題点 -. 第33回日本毒性病理学会学術集会. 2017年1月26日. 大阪府堺市. ビック・アイ.
 9. Masum Md. Abdul, Elewa YH, **Ichii O**, Kon Y. CD34-positive capillary decreased with the progression of kidney disease in mice. The 4th Sapporo Summer Seminar for One Health. 2016年9月20日. 北海道札幌市. 北海道大学.
 10. **市居 修**, 中村 鉄平, 矢吹 映, 堀野 太郎, 昆 泰寛. マウス遠位尿細管の嚢胞形成に關与する新規原因遺伝子座の役割. 第159回日本獣医学会学術集会. 2016年9月7日. 神奈川県藤沢市. 日本大学.
 11. Masum Md. Abdul, Ali Elewa Yaser Hosny, 中村 鉄平, **市居 修**, 昆 泰寛. CD34-positive capillary decreased with the progression of kidney disease in mouse models. 第159回日本獣医学会学術集会. 2016年9月7日. 神奈川県藤沢市. 日本大学.
 12. 中村 鉄平, **市居 修**, 入江 隆夫, 寸田 祐嗣, 孝口 裕一, 長崎 健一, 吉安 友二, 昆 泰寛. コットンラットにおけるインスリン抵抗性と脂肪蓄積との関連. 第159回日本獣医学会学術集会. 2016年9月6日. 神奈川県藤沢市. 日本大学.
 13. **市居 修**, 中村鉄平, 岡村匡史, 木村純平, 堀野太郎, 昆 泰寛. 遠位尿細管上皮細胞の形態機能を制御する IL-1F6/IL-36 . 日本解剖学会第62回東北・北海道連合支部学術集会. 2016年9月4日. 北海道帯広市. 帯広畜産大学.
 14. 中村 鉄平, 入江 隆夫, **市居 修**, 篠原 明男, 孝口 裕一, 越本 知大, 長崎 健一, 昆 泰寛. コットンラットの咽頭喉頭部, 甲状腺及びその周囲組織にみられる形態学的特徴. 日本解剖学会第62回東北・北海道連合支部学術集会. 2016年9月4日. 北海道帯広市. 帯広畜産大学.
 15. 中村 鉄平, **市居 修**, 入江 隆夫, 孝口 裕一, 寸田 祐嗣, 堀野 太郎, 昆 泰寛. 雌性コットンラット (*Sigmodon hispidus*) にみられる腎性貧血. 第9回日本獣医腎泌尿器学会学術集会. 2016年8月21日. 東京都千代田区. 連合会館.
 16. **市居 修**, 大田 寛, 堀野 太郎, 中村 鉄平, 細谷 実里奈, 溝口 達也, 森下 啓太郎, 中村 健介, 星野 有希, 高木 哲, 佐々木 東, 滝口 満喜, 佐藤 遼, 小山田 和央, 昆 泰寛. イヌの尿中 exosome に含まれるマイクロ RNA - 病態マーカーとしての可能性 -. 第9回日本獣医腎泌尿器学会学術集会. 2016年8月21日. 東京都千代田区. 連合会館.
 17. **市居 修**, 中村 鉄平, 堀野 太郎, 木村 純平, 岡村 匡史, 昆 泰寛. 遠位尿細管傷害を知らせるマーカー分子 “IL-1F6/IL-36a” の有用性. 第158回日本獣医学会学術集会. 2015年9月9日. 青森県十和田市. 北里大学.
 18. 中村 鉄平, 入江 隆夫, **市居 修**, 篠原 明男, 浦口 宏二, 越本 知大, 長崎 健一, 昆 泰寛. コットンラットの咽頭喉頭部, 甲状腺及びその周囲組織にみられる形態異常. 第158回日本獣医学会学術集会. 2015年9月8日. 青森県十和田市. 北里大学.
 19. **市居 修**, 大田 寛, 堀野 太郎, 中村 鉄平, 細谷 実里奈, 溝口 達也, 森下 啓太郎, 中村 健介, 佐々木 東, 滝口 満喜, 佐藤 遼, 小山田 和央, 昆 泰寛. 尿中 exosome 由来 microRNA の解析 - 動物種横断的腎障害マーカーになるか? -. 第8回日本獣医腎泌尿器学会学術集会. 2015年8月23日. 東京都千代田区. 連合会館.
- 〔図書〕(計2件)
1. **市居 修**(日本獣医解剖学会編), 学窓社, 獣医組織学第七版 第12章「腎臓」, 2017, 178-190.
 2. **市居 修**(日本獣医解剖学会編), 学窓社, 獣医組織学第七版 第19章「家禽の組織学・泌尿器」, 2017, 308-310.
- 〔産業財産権〕
- 出願状況(計0件)
取得状況(計0件)
- 〔その他〕
- 研究成果の照会
1. 北大・獣医・解剖学教室ホームページ (<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/anat/index.html>)
 2. 北海道大学大学院獣医学研究科・獣医学部ホームページ (<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/>)
 3. 北海道大学学術成果コレクション: HUSCAP(<http://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/index.jsp>)
 4. Researchmap(<https://researchmap.jp/read0140611>)
6. 研究組織
- (1)研究代表者
市居 修 (ICHI I OSAMU)
北海道大学・大学院獣医学研究院・准教授
研究者番号: 60547769