

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：16K19477

研究課題名(和文) 腎尿細管間質の線維化を抑制する新規microRNAの同定および機能解明

研究課題名(英文) Functional analysis of novel microRNA inhibiting tubulointerstitial fibrosis.

研究代表者

三村 維真理 (Mimura, Imari)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00727084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒストン修飾酵素H3K27me3の阻害薬であるDznep(3-deazaneplanocin A)を慢性腎障害モデルマウスに投与すると線維化の進行が抑制されることを見出した。高速シーケンサーにより網羅的にDznep投与および低酸素刺激により発現が変動する遺伝子群の中からTimp2(tissue inhibitor of metalloproteinase2)がDznep投与により発現が抑制されることを見出した。さらに、small RNA-seqの発現解析から低酸素によって発現が抑制されるmicroRNAを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎尿細管間質の線維化には慢性的な低酸素状態が病態の増悪に寄与するが、そのメカニズムを抑制する画期的な治療薬ははまだ開発されていない。本研究では、ヒストン修飾阻害薬を投与することで線維化を抑制する分子メカニズムをエピジェネティックな視点から明らかにした。ヒトに投与する際には、全身性の投与の場合、標的臓器以外への副作用や、標的となる腎臓までの薬剤デリバリーシステムの開発など、まだ問題点はあるものの、新規治療薬の開発につながる重要な研究である。

研究成果の概要(英文)：The main researcher of this project found that Dznep, which inhibits H3K27me3, repressed the tubulointerstitial fibrosis in chronic kidney disease models. Genome-wide analysis using next generation sequencing revealed that Timp2 (tissue inhibitor of metalloproteinase2) inhibited the fibrosis-associated genes under the hypoxic condition and Dznep administration. The researcher also identified the down-regulated microRNAs under hypoxia by analyzing the small RNA-seq.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：低酸素 エピジェネティクス 腎線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Dznep(3-deazaneplanocin A)はヒストン修飾メチル基転移酵素 Ezh2(enhancer of zeste homolog 2)を阻害することによりヒストン修飾の抑制マークである H3K27me3 マークを除去し、特定の遺伝子発現を亢進させる役割があると報告されているが、その詳細な作用メカニズム、特に in vivo における機序については明らかでない。研究代表者は、腎不全モデルの一つである虚血再灌流 (Ischemia /Reperfusion: I/R)障害モデルマウスに対して Dznep を投与する実験を行った。I/R モデルはマウスの片腎の腎門部を 30 分間だけクリップによって結紮し虚血状態に暴露することで、一過性の虚血状態から血流が一度に回復する過程で急性の尿細管障害を引き起こすモデルであり、その後も徐々に慢性的な腎臓の線維化が進行する。I/R モデル作成直後から 8 週間(計 11 回)経静脈的に Dznep を投与したところ、vehicle 投与群と比較して、Dznep 投与群の方が腎尿細管間質領域の線維化が軽減することを明らかにした。このことから、ヒストン修飾 H3K27me3 は線維化の抑制に重要な役割を果たす因子の発現を抑制しており、Dznep 投与によりその発現抑制を解除することで線維化の進行が抑制される可能性が推測された。

Dznep はヒストン抑制マークである H3K27me3 を外すことから、その直接の標的の発現を上昇させると考えられる。そこで申請者は、HK2 および RPTEC を用いて低酸素刺激と Dznep 投与時の microRNA を網羅的に解析した(small RNA-seq)。Dznep を投与すると発現が上昇するものは Dznep の直接の標的と考えられることから、Dznep の標的候補として、低酸素刺激により発現が低下し、さらに Dznep 投与すると発現が上昇する microRNA を絞ったところ、142 個の候補を同定した。TIMP2 の配列から microRNA の標的候補を検討した結果、142 個の中で 2 つの microRNA が TIMP2 を標的とする可能性が考えられた。

2. 研究の目的

上記の実験結果から虚血再灌流(IR)障害によって TIMP2 の発現が上昇し、MMP(matrix metalloprotease)群の発現が抑制されることで Collagen などが分解されなくなり尿細管間質の線維化が進行する。しかし、Dznep を投与することによりその標的候補の新規 microRNA の発現が上昇し、TIMP2 の発現が抑制される。それに伴い、MMP 群は発現が増加し、Collagen が分解されるようになり、線維化は軽減する。この仮説を検証するため、以下の実験をおこなった。

3. 研究の方法

研究代表者は、マウス皮質尿細管細胞 (mouse cortical tubular cells: MCT) およびヒト近位尿細管細胞株 (HK2: human kidney cell-2) を用いて、Dznep の標的候補である 2 つの microRNAs の役割を調べた。また、虚血再灌流障害腎モデルを用いて、マウスの障害腎においてこれらの microRNA の発現が Dznep によってどのように変化するかを調べた。

4. 研究成果

MCT 細胞に標的候補の microRNAs の mimic を投与すると、TIMP2 の発現は有意に低下した(図 1) 。qPCR による定量をおこなったが、再現性をもって、TIMP2 の発現量は低下することを確認できた。

図1.miR-XによりTimp2は抑制される

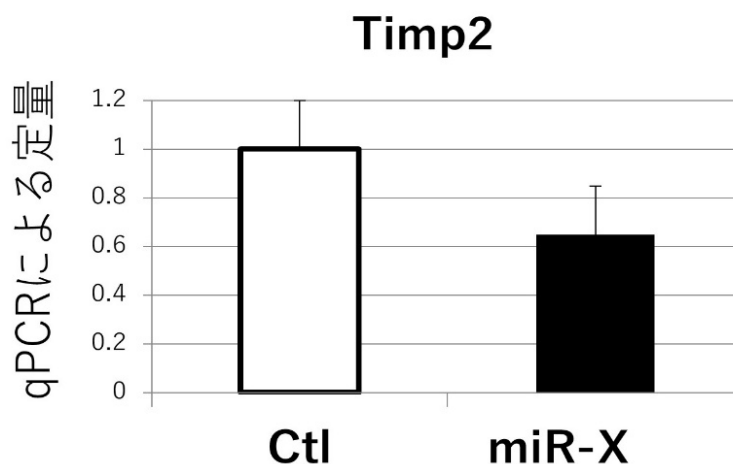
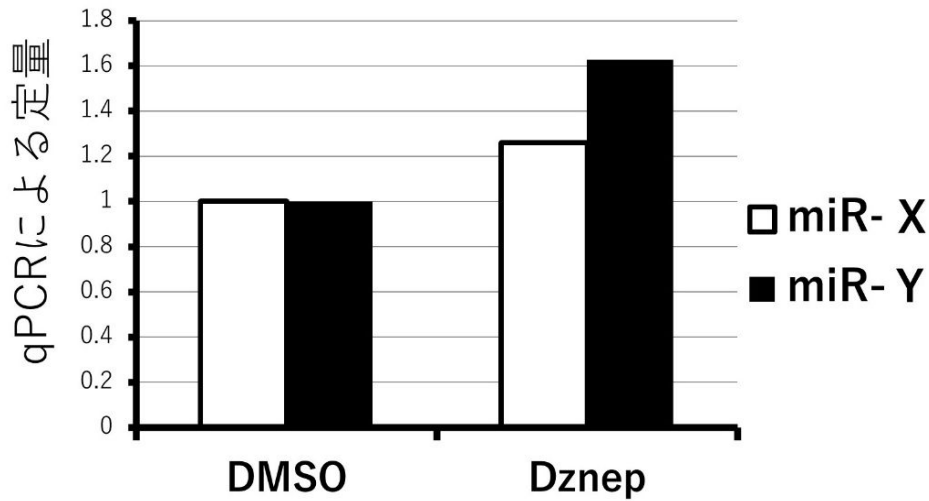


図2.虚血再灌流(IR)モデルマウスにDznepを投与するとmiR-X, miR-Yの発現は上昇する



さらに、研究代表者は、*in vivo* の実験として、虚血再灌流モデルマウスを作成し、経静脈的にDznepを投与すると、Dznepの標的候補である2つのmicroRNAsの発現は上昇することを確認した(図2)。すなわち、慢性腎不全病態モデルにおいて、Dznepの標的候補であるmiR-XおよびmiR-Yは発現が上昇しており、TIMP2に結合してその発現を抑制している可能性が考えられた。これらのmicroRNAsが*in vitro*のモデルであるHK2細胞においても同様な効果をもたらすのか、またXとYではどちらが病態にとってより大きく寄与しているのかについて、現在検討を進めているところである。

5. 今後の見通し

研究代表者は、引き続き上記の実験を継続し、Dznepが標的とするmicroRNAsがどのように腎尿細管間質の線維化を軽減しているか、エピジェネティックな分子メカニズムを明らかにしたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hirakawa Y, Mizukami K, Yoshihara T, Takahashi I, Khulan P, Honda T, Mimura I, Tanaka T, Tobita S, Nangaku M.	4. 巻 93
2. 論文標題 Intravital phosphorescence lifetime imaging of the renal cortex accurately measures renal hypoxia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 1483-1489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2018.01.015.	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 該当する
1. 著者名 Mimura I, Nangaku M.	4. 巻 94
2. 論文標題 The Lasker Prize award 2018: histones "tail" the story.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 1032-1034
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2018.10.005.	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 -
1. 著者名 Mimura I	4. 巻 95
2. 論文標題 Kidney aging: an irresistible slope.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 492-494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2018.11.036.	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 -
1. 著者名 Hirakawa Y, Miura R, Sasaki Y, Yoshida Y, Mimura I, Katsura M, Shintani-Domoto Y, Ogawa M, Hayashi A, Nangaku M.	4. 巻 58
2. 論文標題 Nutcracker Syndrome with the Superimposition of Thin Basement Membrane Syndrome.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 411-414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.1433-18.	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 -

1. 著者名 Mimura I, Hirakawa Y, Kanki Y, Nakaki R, Suzuki Y, Tanaka T, Aburatani H, Nangaku M	4. 巻 8
2. 論文標題 Genome-wide analysis revealed that Dznep reduces tubulointerstitial fibrosis via down-regulation of pro-fibrotic genes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3779
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-22180-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 2件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 三村 維真理
2. 発表標題 低酸素下におけるエピジェネティックな遺伝子発現制御とその機能解明
3. 学会等名 日本生化学大会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三村 維真理、平川 陽亮、神吉 康晴、田中 哲洋、鈴木 穰、油谷 浩幸、南学 正臣
2. 発表標題 ヒストン修飾阻害薬Dznepによる腎尿細管間質線維化抑制のメカニズムの解明
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三村 維真理
2. 発表標題 Identification of novel epigenetic factors in chronic kidney diseases.
3. 学会等名 Hypoxia Research Meeting 2018(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mimura I, Hirakawa Y, Kanki Y, Suzuki Y, Aburatani H, Tetsuhiro Tanaka, Nangaku M.
2. 発表標題 Dznep reduces tubulointerstitial fibrosis via decrease of TIMP2.
3. 学会等名 International Society of Nephrology Frontiers 2018. (国際学会)
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