

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 4 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09708

研究課題名(和文) 老化腎障害を調節するmicroRNAの同定-新規遺伝子治療法・バイオマーカー開発

研究課題名(英文) The profiling miRNA in aging renal impairment

研究代表者

森下 義幸 (Morishita, Yoshiyuki)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：30570494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：老化促進マウス腎臓で発現変化するマイクロRNA(miRNA)をスクリーニング選出し、老化腎障害患者の血清で有意低下するmiRNA(miRNA-142-3p)と有意上昇するmiRNA(miRNA-503-3p)を発見した。さらに人工合成したmiRNA-503-3p抑制薬投与で老化腎障害マウスで見られる腎線維化抑制効果が認められた。miRNA-142-3pには腎線維化抑制効果は認めなかった。本研究結果からmiRNA-142-3pは老化腎障害の診断薬、miRNA-503-3pは老化腎障害の診断薬・新規遺伝子治療薬となることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、加齢による生理的な腎機能低下と認識されていた高齢者の腎機能低下が、末期腎不全、心血管疾患リスクを増大させ生命予後を悪化させることが分かってきた。しかし老化腎障害を調節する分子は未だ十分解明されていないため、老化腎障害の診断・治療薬は確立されていない。本研究でmiRNA-142-3pは老化腎障害のバイオマーカー、miRNA-503-3pは老化腎障害のバイオマーカーおよび新規遺伝子治療薬となることが明らかになった。本研究結果を発展応用すれば、高齢者の腎機能低下抑制、透析導入回避につながり、高齢者の生活の質改善、国民健康福祉への貢献、医療費削減の点で極めて意義深い。

研究成果の概要(英文)：The initial profiling of senescence-associated mice screened miRNAs whose expression was different from control mice. Among them, serum levels of miRNA-142-3p were decreased and those of miRNA-503-3p were increased in patients with age-dependent renal impairment compared with age-matched population who have regular renal function. Furthermore, miRNA-503-3p-inhibitor significantly inhibited renal fibrosis which was observed in senescence-associated mice in vivo. However, miRNA-142-3p-mimic did not show these treatment effects. These results suggest that miRNA-142-3p and miRNA-503-3p are useful as novel diagnostic biomarkers, and miRNA-503-3p may be a therapeutic target for age-dependent renal impairment.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：老化腎障害 診断薬 治療薬 マイクロRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦の慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease: CKD) 患者は1,300 万人以上に達し、新たな「国民病」として注目されている (日本腎臓学会, 2015)。CKDは検尿異常または糸球体濾過率低下 (60ml/min/1.73m²以下) の3ヶ月以上継続により定義される。CKDは進行すると末期腎不全に至り透析などの腎代替療法が必要となる。腎機能は加齢とともに低下することが知られている。加齢による糸球体濾過率低下速度は年間0.36ml/min/1.73m²であり、平均糸球体濾過率は60歳で80ml/min/1.73m²、80歳では60ml/min/1.73m²となる (Clin Exp Nephrol 2009; 13: 621-630)。このため高齢者ではCKDが非常に多くなり、70歳代では約30%、80歳代では約45%がCKDである (日本腎臓学会, CKD診療ガイド2012)。また青壮年期に糖尿病性腎症、慢性糸球体腎炎、腎硬化症などの腎疾患がある症例では加齢による腎機能低下速度がより大きくなる (Hypertens Res 2008; 31: 433-441)。従来、このような高齢者の腎機能低下は「加齢による生理的な腎機能低下」と認識されてきた。ところが近年、高齢者の加齢による腎機能低下が、末期腎不全、心血管疾患のリスクを増大させ生命予後を悪化させることが分かってきた (Kidney Int 2011; 80: 17-28)。実際に新規透析導入になる末期腎不全患者のうち65歳以上の高齢者が約68%と大部分を占めている (日本透析医学会, 我が国の慢性透析療法の現状 2018)。加齢による腎臓の変化は腎重量と腎体積の減少で表される腎萎縮であり、80歳以上の腎臓重量は40歳未満に比べて32%減少し、組織学的には糸球体硬化、間質線維化、尿細管萎縮、細動脈硬化が認められる (Gerontologia 1971; 17: 87-97, Kidney Int 2008; 74: 710-720)。しかし重要なことは全ての高齢者で加齢による腎機能低下が認められるわけではなく高齢者の腎機能は3つのカテゴリーに分かれることである。加齢に伴い急速に腎機能が低下する群、腎機能が緩やかに低下する群、全く腎機能が低下しない群である (J Am Geriatr Soc 1985; 33: 278-285)。これらの事実から以下の2つが示唆される、1) 同年齢の高齢者でも老化腎障害が進行する例としない例があり、高齢者腎構造的変化は一律的な「加齢による生理的な腎機能低下」よりも個別的な「老化による腎障害 (老化腎障害)」であること、2) 老化腎障害は全ての高齢者に宿命的に生じるわけではなく、その進展に何らかの調節分子が働いている可能性があること。しかしながら老化腎障害に関与調節する分子は未だ全く解明されていない。これらのことから老化腎障害調節分子を同定し、新規治療法およびバイオマーカー開発につなげることができれば高齢者腎機能保持、高齢腎疾患合併患者の腎予後改善、高齢者の透析導入回避につながり、健康な高齢者を増加させることから高齢者予後改善、生活の質改善、国民健康福祉、医療費削減の点で極めて意義深い。

(2) 近年、疾患調節分子として **microRNA (miRNA)** が注目されている (**Nature 2003; 425: 244-245**)。miRNA は細胞に内在する、**21-25** 塩基長のタンパク質を作らない **non-coding small RNA** で標的 **messenger RNA** の発現を調節している。miRNA は癌、炎症、線維化など様々な病態を調節していて、血液、尿中にも安定して存在していること、疾患早期から発現変化していること、人とマウスなどの実験動物でほぼ同じ塩基配列であり機能解析研究に利便性があることなどから、治療標的および疾患特異的診断バイオマーカーとしての有用性が報告され、すでに癌や炎症疾患分野で一部臨床応用が検討されている (**Inflamm Bowel Dis. 2015; 21: 1926-1934, Gene 2015; 10: 138-144, Breast 2015; 24: 364-369, Cancer Biol Ther 2015; 16: 1042-1046**)。近年、老化で多くの miRNA の発現が変化すること、いくつかの miRNA が老化進展に関与する可能性があることが報告されている (**Nature, 2013; 495: 107-110, J Cell Sci 2012; 125: 7-17, 遺 Biol Sex Differ 2015; 6: 1**)。しかし老化腎障害を調整し治療標的およびバイオマーカーとして有用な miRNA は未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究ではこれらの一連の研究を基に老化腎障害を発症する老化促進マウス (senescence-accelerated mouse prone1; SAMP1) を用いた動物研究で老化腎障害調整する miRNA を網羅的解析により同定し、老化腎障害で認められた腎病態のモデルマウスに miRNA の inhibitor または mimic の効果を生体内で解析し、老化腎障害の新規遺伝子治療法を開発する。また同定した miRNA 発現を老化腎障害患者の血清で測定し、老化腎障害のない高齢者および健康な若年者と比較し、老化腎障害の新規バイオマーカーとなる miRNA を同定する。

3. 研究の方法

(1) 老化腎障害を調節する miRNA 候補選出

老化腎障害で発現変化する miRNA の網羅的解析を目的として老化腎障害モデルマウス (SAMP1 マウス) を用いた。SAMP1 マウスは正常な成長過程のあと、早期から老化徴候が出現し、その後急速に進展する特徴を持つ。SAMP1 マウスは 50 週齢の解析で腎は表面不均整に

萎縮し、病理組織で糸球体硬化、尿管間質線維化、尿管萎縮、細動脈硬化のヒトの老化腎障害と同じ腎組織変化を示した (**Japanese Journal of Nephrology 1998; 30: 1063-1065**)。若年 (8 週齢) **SAMP1** マウスおよび正常老化を示す **SAMR** マウス [若年 (8 週齢) と高齢 (50 週齢)] をコントロール群とした。 **SAMR** マウスは 8 週齢、50 週齢ともに腎組織は正常であった。まず **SAMP1** マウス (50 週齢) とコントロール群の腎臓より **miRNA** をスピカラムで精製した。次に **SAMP1** マウス (50 週齢) とコントロール群で腎臓の **miRNA** 発現変化をマイクロアレイ法により網羅的に比較解析し 50 週齢の **SAMP1** マウスでコントロール群に比較して 2 倍以上発現上昇または低下している **miRNA** を選出した。次に **quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)** 法によりマイクロアレイ法で選出された **miRNA** の発現変化を確証した。

(2) 老化腎障害の新規バイオマーカーとなる **miRNA** の同定

まず老化腎障害患者とコントロール群 (腎機能低下のない高齢者) の選定目的で、65 歳以上の糖尿病性腎症、慢性糸球体腎炎、腎硬化症などの明らかな腎疾患のない高齢者で推定糸球体濾過率 (eGFR creatinine および eGFR cystatin-C) が 60ml/min/1.73m² 未満に低下している患者を老化腎障害群として選出し、糸球体濾過率 (eGFR creatinine および eGFR cystatin-C) が 60ml/min/1.73m² 以上で腎機能低下のない 65 歳以上の高齢者をコントロール群とした。次に両群間患者の血清を用いて動物実験で同定した老化腎障害の腎で変化する **miRNA** の発現変化を qRT-PCR 法により比較検討し、老化腎障害の新規バイオマーカーとなる **miRNA** を同定した。

(3) 老化腎障害を調整する **miRNA** を標的とした新規遺伝子治療法への応用

また同定した老化腎障害バイオマーカー・**miRNA** の新規遺伝子治療法への応用として老化腎障害バイオマーカー・**miRNA** の mimic (センス鎖: 過剰発現用) および inhibitor (アンチセンス鎖: 発現抑制用) の人工核酸を作成し、non-viral vector であるポリエチレンイミン (polyethylenimine: PEI) ナノパーティクル (nanoparticles: Ns) と混合体 (miRNA-mimic-PEI-NPs) を形成させ、老化腎障害で認められた病態の一つである尿管間質線維化への効果を、片側尿管結紮法 (unilateral ureteral obstruction; UUO) により作成した、腎線維化モデルマウスで検証した。

miRNA-mimic-PEI-NPs または miRNA-inhibitor-PEI-NPs を UUO マウスに UUO 術施行前日 1 回を含む合計 4 回 (1 回あたり miRNA-mimic または inhibitor: 5nmol) を、尾静脈より投与し (miRNA-PEI-NPs 投与群) し UUO 術後 8 日にマウスを解剖して腎線維化への影響を検討した。Sham 手術マウス (Sham 群)、未治療 UUO マウス (UUO マウス群)、control-miRNA-PEI-NPs を投与した UUO マウス (control-miRNA-PEI-NPs 投与群) をコントロール群とした。

4. 研究成果

(1) 老化腎障害を調節する **miRNA** 候補選出

50 週例の **SAMP1** マウス 4 匹とコントロール群 4 匹ずつ (8 週齢 **SAMP1** マウス、8 週齢 **SAMR** マウス、50 週齢高齢 **SAMR** マウス、) の腎臓で 1,882 種類の **miRNA** の発現変化をマイクロアレイ法で網羅的に解析し、50 週齢 **SAMP1** マウスのみで 2 倍以上有意に上昇している **miRNA** 16 種類を同定した。そのうちヒトでも発現が確認されている 10 種類の **miRNA** を、老化腎障害を調節する **miRNA** 候補として選出した。

(2) 老化腎障害の新規バイオマーカーとなる **miRNA** の同定

これらの合計 10 種類の **miRNA** の血清での発現変化を qRT-PCR 法を用いて老化腎障害群 (30 例) コントロール群 (30 例) で比較検討したところ、老化腎障害群の血清で有意低下する 1 種類の **miRNA** (miRNA-142-3p) ($p < 0.01$)、老化腎障害で有意上昇する 1 種類の **miRNA** (miRNA-503-3p) ($p < 0.05$) を同定した。本結果から miRNA-142-3p および miRNA-503-3p は老化腎障害のバイオマーカーとなることが示唆された。

(3) 老化腎障害を調整する **miRNA** を標的とした新規遺伝子治療法への応用

老化腎障害でのバイオマーカーとなる miRNA-142-3p と miRNA-503-3p において老化腎障害患者で低下していた miRNA-142-3p は補充のため mimic (miRNA-142-3p-mimic)、上昇していた miRNA-503-3p は抑制のため inhibitor (miRNA-503-3p-inhibitor) を人工的に作成した。miRNA-142-3p-mimic および miRNA-503-3p-inhibitor の老化腎障害での効果を検証するため、老化腎障害マウス (50 週齢 **SAMP1** マウス) の腎病理変化で認められた間質尿管線維化への効果を検討した。miRNA-503-3p-inhibitor-PEI-NP 投与群では、UUO マウス群、control-miRNA-PEI-NPs 投与群に比較して有意に尿管間質の線維化が組織学的に抑制されており、尿管間質線維化マーカー (Fibronectin-1, Collagen type I alpha 2) 発現上昇も抑制されていた。miRNA-142-3p-mimic-PEI-NP 投与群では UUO マウス群、尿管間質線維化改善効果は認められなかった。

以上の結果から miRNA-142-3p は老化腎障害のバイオマーカー、miRNA-503-3p は老化腎障害のバイオマーカーおよび新規遺伝子治療薬となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Yanai K, Ishii H, Aomatsu A, Ishibashi K, Morishita Y. | 4. 巻 145 |
| 2. 論文標題 MicroRNAs in peritoneal fibrosis: a systematic review. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Discov Med | 6. 最初と最後の頁 271-280 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 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 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Yanai K, Kaneko S, Ishii H, Aomatsu A, Ito K, Hirai K, Ookawara S, Ishibashi K Morishita Y | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 MicroRNAs in sarcopenia: a systematic review | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Front Med (Lausanne). | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmed.2020.00180 | 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0件

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|