

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08727

研究課題名(和文) ノンコーディングRNAとエクソソーム機能解析から腎臓病の新規治療法を開発する

研究課題名(英文) Developing new therapeutic methods for kidney disease from non-coding RNA and exosome function analysis

研究代表者

堀野 太郎 (Horino, Taro)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・准教授

研究者番号：90448382

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)：ヒト・モデルマウスでそれぞれ健常群と疾患群の腎臓内・血中・尿中miRNA/lncRNAを網羅的に解析してバイオマーカー候補miRNA/lncRNAを選抜した。疾患群としてIgA腎症、ループス腎炎、ANCA関連血管炎で、バイオマーカー候補miRNA/lncRNAと腎機能・病理組織の変化の相関関係を解析し、miRNA/lncRNAが制御する病態を評価した。miRNAの下流の因子やlncRNAが病態を制御する機序を解析した。ヒト・動物にて対象のmiRNA/lncRNAが診断バイオマーカーとしての有効性を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はエクソソームによる細胞間輸送システムやantagomiR/lncRNAを利用した新規治療法の開発の基盤となる研究であり、今まで明らかでなかったmiRNA/lncRNAやエクソソーム細胞間情報伝達機構による腎臓病の発生機序の詳細な解明につながることや、腎臓病学の領域だけではなく様々な分野の次世代バイオマーカーや新規治療法の開発に応用することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Biomarker candidate miRNAs/lncRNAs were selected by comprehensively analyzing kidney, blood, and urine miRNA/lncRNAs in healthy and diseased groups in humans and model mice. In IgA nephropathy, lupus nephritis, and ANCA-associated vasculitis, we analyzed the correlation between biomarker candidate miRNA/lncRNA and changes in renal function and histopathology, and evaluated the pathology controlled by miRNA/lncRNA. We analyzed the mechanisms by which miRNA downstream factors and lncRNAs regulate pathology. We investigated the efficacy of target miRNA/lncRNA as a diagnostic biomarker in humans and animals.

研究分野：腎臓病

キーワード：ノンコーディングRNA エクソソーム microRNA long non-coding RNA

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

現在、透析を必要とする末期腎不全患者数は、世界中で 20 年前の 5 倍の 210 万人超で、うち 1/7 を我が国が占め、さらに今後も増加することが予想される。腎臓病臨床において、末期腎不全を未然に防ぎ透析患者数を抑制することは最重要課題であり、そのためには原疾患の慢性腎臓病 (CKD)、急性腎障害 (AKI) を早期に診断、治療することが必要不可欠である。

従来の腎障害早期診断バイオマーカーは、病態形成後の状態を反映するのみで腎病理像を反映してはならず腎病理診断には腎針生検が必要である。腎病理診断による組織重症度の違いで治療方針や腎長期予後が大きく異なるが、腎針生検は高侵襲な検査で患者の負担が大きく頻回な再検査は困難で、片腎など検査適応外の症例も存在するため診断・治療の遅延が起こりうる。したがって、腎針生検に代わる低侵襲で、適時に腎病理変化を診断し適切な治療介入を可能とする指標が切望される。

最新の大規模なゲノムやトランスクリプトームの解析プロジェクト (ENCODE, FANTOM) によって、ヒトゲノムの約 8 割が機能をもち、7 割以上が転写されているという驚異の知見が明らかとされた。

蛋白質をコードする message RNA (mRNA) はその一部にすぎず、転写産物のほとんどを ncRNA が占める。発癌・代謝などのほぼすべての病態生理を ncRNA がエピジェネティックかつダイナミックに調節を行っている。腎臓病においても他の多くの疾患同様で ncRNA は生理学的、内分泌学的、および免疫学的な機序を介して病態を形成し、さらに病態を複雑にしている ncRNA 相互のクロストーク (ncRNA ネットワーク) は未だ未知な領域であり、その解明は将来の重要な研究分野となり得る。

### 2. 研究の目的

本研究では最近注目されている miRNA と lncRNA を安定状態で輸送する担体であるエクソソームや IncRNA を活用することで、病態形成以前に CKD や AKI の発症を予測することができ、腎病理組織診断をも可能とする次世代診断法を確立する。腎疾患において ncRNA ネットワークを詳細に解析して病態を明らかにすると同時に、ncRNA 測定による新規検査法の確立・臨床応用と各 ncRNA 検査と病態のパネル化を行う。また、miRNA の siRNA とエクソソーム細胞間輸送系の応用や miRNA sponge を利用したまったく新規の腎臓病治療法を開発する。

### 3. 研究の方法

1) 腎臓内・尿中 miRNA プロファイル作成し、特異的な miRNA を選出する。(平成 31 年度)

(a) ヒトサンプルの解析：健常者ボランティア、腎疾患患者 (IgA 腎症、ループス腎炎、など) の血液 (血清、血漿)、尿サンプル、腎疾患患者の腎針生検組織をすでに回収しており、申請者の開発した方法で分離した血液、尿のエクソソームや腎組織サンプルから miRNA を精製してある。健常者群、各腎疾患患者群の miRNA/lncRNA を次世代シーケンサーで網羅的に解析する。  
(b) マウスサンプルの解析：コントロール群、急性腎障害モデル、およびループス腎炎モデルですでに回収した血液、尿、腎組織サンプルから作成した miRNA プロファイルにさらに解析を追加する。

本研究では、動物種を超えて腎臓内・血中・尿中に特異的な miRNA の特定を行い健常群と腎臓病群で有意な差を認めるバイオマーカー候補 miRNA の同定を行う。さらに、これまで不可能であった全尿中 miRNA の解析を可能とした申請者独自開発の測定法で検討を継続する。

2) 候補 miRNA の動態と腎機能・病理変化の相関を明らかにする。

申請者は、すでにモデルマウスで数種類の尿中エクソソーム内 miRNA と腎線維化重症度に極めて良好な相関があることを明らかにしている。バイオマーカー候補 miRNA を腎臓病患者・モデルマウスの腎組織・尿・血液検体より申請者の方法で精製測定する。腎組織は、組織染色法 (PAS、PAM、MT 染色、電子顕微鏡)、in-situ hybridization 法で候補 miRNA の発現部位・強度を評価する。腎機能 (血清 Crn、尿アルブミンなど)・腎病理変化と腎内・尿中 miRNA の経時的・空間的な変化を解析する。

本研究では、腎障害の早期診断と病理組織診断を可能とするバイオマーカーとして有望な miRNA を選定する。さらに、上記と別群の腎針生検組織・尿・血液検体を用いて候補 miRNA と腎機能・腎病理組織の相関を評価して選定した miRNA の有用性を明らかにする。

3) 腎機能・病理変化と miRNA の下流シグナル伝達 (mRNA・蛋白発現) の相関を明らかにする。

申請者は選定した miRNA の標的 mRNA を miRBase などのデータベースより選出する。回収した腎組織、尿・血液サンプル (特にエクソソーム) を用いて標的 mRNA と下流の蛋白発現を RT-qPCR、ウエスタンブロット法、免疫染色法で測定する。各病態で miRNA と下流の mRNA や蛋白発現の変化を評価する。また、採取した腎組織上で mRNA、蛋白の発現部位をそれぞれ in-situ hybridization、免疫染色法で同定、画像解析ソフト (Image J) で発現強度を解析する。これによりバイオマーカー候補 miRNA が腎機能・腎病理組織変化を起こさせる機序を明らかにする。また、バイオマーカーに利用可能なエクソソーム内情報伝達物質 (mRNA・蛋白 (トランスクリプシ

ンファクター))も同時に検討を行う。

4) antagomiR/lncRNA と antagomiR/lncRNA 封入エクソソームの作成・効果解析を行う。

(a) antagomiR/lncRNA の投与効果の解析：標的 miRNA に相補的な人工的 miRNA(antagomiR)は、標的 miRNA に結合し、その効果発現を抑制することで、標的 miRNA が疾患の治療効果が期待される。申請者は、すでに数種類の antagomiR が腎線維化を抑制することができることを preliminary な検討で発見している。バイオマーカー候補 miRNA に対する antagomiR/lncRNA を作成し急性腎障害モデル、ループス腎炎モデルに静脈内注射で投与する。血液・尿・組織(腎臓、肝臓、心臓)を採取、生化学検査、病理、miRNA・mRNA・蛋白発現を解析し antagomiR/lncRNA の治療効果を明らかにする。

(b) 安定発現細胞株の作成とエクソソーム分離精製：培養細胞に Lipofectamine™ で候補 miRNA の antisense miRNA 鎖(antagomiR)/lncRNA 発現ベクターの遺伝子導入を行い、発現を RT-qPCR で確認する。申請者の方法で antagomiR/lncRNA 安定発現細胞の培養上清からエクソソームを分離精製、antagomiR/lncRNA が内部に封入されていることを RT-qPCR で確認する。または、培養細胞の培養液上清より分離したエクソソームに人工合成 antagomiR/lncRNA を直接、エレクトロポレーションもしくはリポフェクションで導入して antagomiR/lncRNA 封入エクソソームを作成、以下の研究に使用する。

(c) 細胞間シグナル伝達：上述の antagomiR/lncRNA 封入エクソソームの懸濁液を作成し、別の培養細胞に添加して培養する。添加 1 日後に培地を交換、さらに培養後に細胞内で導入したシグナル伝達の活性化を RT-qPCR、ウエスタンブロット、免疫染色法を用いて評価検討する。

(d) in vivo シグナル伝達：分担者と協力して作成した antagomiR/lncRNA 封入エクソソーム懸濁液を腎障害動物モデルに投与して、血液・尿・組織(腎臓、肝臓、心臓)を経時的に採取する。生化学検査、病理組織および miRNA・mRNA・蛋白発現を解析して治療効果を明らかにする。

(e) 4)-(a)で行った人工合成 antagomiR/lncRNA 静脈注射法と 4)-(d)のエクソソーム封入 antagomiR/lncRNA 投与法について有効性と有害事象の有無について比較検討する。

#### 4. 研究成果

ヒト・モデルマウスでそれぞれ健常群と疾患群の腎臓内・血中・尿中 miRNA/lncRNA を網羅的に解析してバイオマーカー候補 miRNA/lncRNA を選抜した。疾患群として IgA 腎症、ループス腎炎、ANCA 関連血管炎で、バイオマーカー候補 miRNA/lncRNA と腎機能・病理組織の変化の相関関係を解析し、miRNA/lncRNA が制御する病態を評価した。miRNA の下流の因子や lncRNA が病態を制御する機序を解析した。ヒト・動物にて対象の miRNA/lncRNA が診断バイオマーカーとしての有効性を検討した。

心血管手術後 AKI 患者で、miRNA のバイオマーカーとしての有効性について検討を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	市居 修  (Ichii Osamu)  (60547769)	北海道大学・獣医学研究院・准教授    (10101)	

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