

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17740

研究課題名（和文）糖尿病性腎症におけるmicroRNAの意義

研究課題名（英文）Significance of microRNA in diabetic nephropathy

研究代表者

大野 祥子（Ohno, Shoko）

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：50816874

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ポドサイトにおけるmicroRNAの役割を調べるために、ポドサイトでGFPとmiR-26aを過剰発現させたポドサイト特異的miR-26a過剰発現（Tg）マウスを作製した。しかし、Tgマウスは基礎状態では野生型マウスと変わらなかったため、streptozotocinによりpod-miR-26a Tgマウスに糖尿病を誘発したが、有意な表現型は認められなかった。そこで、miR-23bの解析に方向転換し、培養ヒトポドサイトにmiR-23b mimicを遺伝子導入し、miR-23bの標的蛋白と想定されるNPR3、PDE4B、PTENのウェスタンブロットを行ったが有意な低下は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポドサイトのmicroRNAの意義を検討するために、過剰発現マウスを作製したが、miR-26の発現が十分に得られず、その機能的意義を検討するは困難であった。In vivoにおける解析では、野生型マウスの発現レベルを考慮して、過剰発現マウスを作製することが必要であることを示している。社会的意義として、糖尿病性腎症の機序解明に貢献している。

研究成果の概要（英文）：To examine the role of microRNAs in podocytes, we generated podocyte-specific miR-26a overexpression (Tg) mice, which overexpress GFP and miR-26a in podocytes. However, since Tg mice did not differ from wild-type mice in the basal state, we induced diabetes in pod-miR-26a Tg mice by streptozotocin, but did not find any significant phenotype. We changed the direction to analyze miR-23b, and transfected cultured human podocytes with miR-23b mimic and performed Western blotting for NPR3, PDE4B, and PTEN, which are assumed to be target proteins of miR-23b, but no significant decrease was observed.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：ポドサイト microRNA トランスジェニックマウス ストレプトゾトシン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、22-25 塩基の非翻訳 RNA が microRNA として同定され、特定の標的 mRNA の翻訳抑制や分解により標的遺伝子を抑制することが報告されてきた。当研究室では、これまで TGF- $\beta$  と協調して線維化促進作用を示す connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) に着目し、腎疾患に対する研究を進めてきた。

CTGF/CCN2 抑制の意義としては、CTGF アンチセンスオリゴを腎間質尿細管線維化ラットの線維芽細胞特異的に遺伝子導入したところ、TGF- $\beta$  を抑制せずに線維化が軽減する (J Am Soc Nephrol 15:1430, 2004) ことを報告した。また、糸球体上皮細胞 (ポドサイト) 特異的 CTGF 過剰発現マウスではストレプトゾトシン投与による糖尿病性腎症の増悪が認められた (Kidney Int 73:163, 2008)。このことから CTGF/CCN2 は線維化促進因子であり、その抑制により治療的効果があることを当研究室は示してきた。

今回、CTGF/CCN2 を標的とする microRNA として miR-26a に着目した。miR-26a は CTGF をターゲットとすることでコラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外基質産生を低下させること、miR-26a がヒト糖尿病性腎症例で低下することを示した (Koga, Ohno *et al.* Diabetologia 58:2169, 2015)。これらの結果から、miR-26a mimic 投与は細胞外基質産生を抑制できる可能性が想定され、miR-26a mimic が糖尿病性腎症における治療薬剤となりうる可能性が想定される。これまで microRNA を標的とした創薬は近未来のことと考えられてきたが、HCV RNA を安定化する miR-122 に対する anti-miR-122 の核酸医薬 (miravirsin) が phase 2 study において有効性を報告され (Janssen *et al.* N Engl J Med 268:1685, 2013)、創薬の実現性に注目が集まっている。

さらに、研究者らはポドサイトに多く発現していると報告がある miR-23b に着目しており (Ho *et al.* J Am Soc Nephrol 19:2069, 2008)、ポドサイトにおける miR-23b の標的遺伝子、役割を検討予定である。

以下の事項を解明するために本研究を立案した。

- 1) 「miR-26a を増加させることで糖尿病性腎症が改善するのか」
- 2) 「改善する場合はどういった遺伝子群の発現に変化を与えているか」
- 3) 「ポドサイトにおける miR-23b の役割」

## 2. 研究の目的

本研究の目的は

- ・ポドサイトで miR-26a を過剰発現するマウスの作製
- ・ストレプトゾトシン糖尿病ポドサイト特異的 miR-26a 過剰発現マウスの変化
- ・ポドサイトにおける miR-26a は CTGF/CCN2 以外のどういった遺伝子群を制御しているか
- ・ポドサイトにおける miR-23b の役割

を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### 1) ポドサイト特異的 miR-26a 過剰発現 (pod-miR-26a Tg) マウスの作製と解析

ポドサイト特異的 miR-26a 過剰発現マウスを作製した。ヒトポドシンプロモーター 2.5 kb の下流に miR-26a precursor (OriGene)、IRES-GFP, polyA コンストラクトを挿入した配列をマウス受精卵に遺伝子導入し、C57BL/6J バックグラウンドにて作製した。ポドサイトにおける miR-26a ならびに GFP の発現を real-time RT-PCR 法と GFP 蛍光局在にて検討した。ベーサルレベルにおける pod-miR-26a Tg マウスの体重、尿蛋白、血清クレアチニン、糸球体 miR-26a 発現、primiR-26a、GFP 発現を解析した。

### 2) ストレプトゾトシン糖尿病ポドサイト特異的 miR-26a 過剰発現マウスの変化

8~10 週齢の 22g 程度のオスマウスにストレプトゾトシン (100 mg/kg を 3 連日)腹腔内投与し、糖尿病を惹起した。2 週後の随時血糖 300 mg/dL 以上を糖尿病マウスとした。投与 12 週後に屠殺し、体重、血糖、尿量、尿アルブミン排泄、血清クレアチニン、糸球体内 miR-26a, GFP, primiR-26a 発現を解析した。

### 3) 培養ポドサイトにおける miR-23b の役割の検討

これまで他の細胞において miR-23b は PTEN を標的とすることが報告されており、また miR-23b は糸球体ポドサイトに発現することがすでに報告されていることから、培養ヒトポドサイトに miR-23b mimic を transfection することで、PTEN タンパクの発現変化が認められるかを検討した。他の標的としてデータベースから Natriuretic peptide receptor 3 (NPR3), Phosphodiesterase 4B (PDE4B)を抽出し、NPR3 と PDE4B の Western blotting を行った。

## 4. 研究成果

### 1) ポドサイト特異的 miR-26a 過剰発現(pod-miR-26a Tg)マウスの作製と解析

Pod-miR-26a Tg マウスと野生型マウスの体重、尿量、血清クレアチニン値を比較したが、両群に差を認めなかった。糸球体の mRNA 発現を real-time RT-PCR 法で比較したところ、primiR-26a と miR-26a は両群で差を認めなかったが、GFP mRNA 発現は野生型では認められず、pod-miR-26a Tg マウスで強い発現を認めた。腎の凍結切片では pod-miR-26a Tg マウスの糸球体に GFP 発現は認められず、抗 GFP 抗体を用いて蛍光染色を行ったが、やはり pod-miR-26a Tg マウスで認められなかった。このため、発現レベルが低いと考えた。

### 2) ストレプトゾトシン糖尿病ポドサイト特異的 miR-26a 過剰発現マウスの変化

約 22g のオスマウスにストレプトゾトシンを投与した。体重は pod miR-26a Tg マウスの方が野生型マウスに比べ軽い傾向にあったが有意差を認めなかった。血糖についてはいずれも 600 mg/dL 程度で差を認めなかった。尿量については両群とも 20 ml/day 程度であり差を認めなかった。尿アルブミン排泄は 両群とも 50  $\mu$ g/mgCr 程度であり、差を認めなかった。血清クレアチニン値も 0.20 mg/dL 程度で差を認めなかった。糸球体の miR-26a, primiR-26a はいずれも差を認めず、糸球体 GFP mRNA 発現は pod-miR-26a Tg マウスのみで認められた。以上より、糖尿病 pod-miR-26a Tg マウスでは糖尿病野生型マウスと明らかな差を認めなかった。また、この要因としては miR-26a の糸球体内での発現レベルが低いことが関連していると考えた。

### 3) 培養ポドサイトにおける miR-23b の役割の検討

培養ヒトポドサイトに miR-23b mimic もしくは negative control を遺伝子導入し 24 時間後に回収し、NPR3 の western blotting を行ったが、NPR3 のバンドが薄く効果判定はできなかった。また PDE4B についても Western blotting のバンドが薄く判定はできなかった。一方、PTEN は明瞭なバンドを認めたが、miR-23b 遺伝子導入より PTEN 蛋白減少は認められなかった。

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<br>半田貴也, 森慶太, 石井輝, 大野祥子, 金井有吾, 八十田明宏, 栗原孝成, 向山政志, 柳田素子, 横井秀基 |
| 2. 発表標題<br>ナトリウム利尿ペプチドを増加させるオステオクリンはアドリアマイシン腎症を改善させる                 |
| 3. 学会等名<br>日本心血管内分泌代謝学会 神戸（神戸国際会議場）ポスター                              |
| 4. 発表年<br>2019年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|   |
|---|
| 京都大学大学院医学研究科 腎臓内科学<br><a href="http://www.kidney-kyoto-u.jp/">http://www.kidney-kyoto-u.jp/</a> |
|---|

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|