

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09360

研究課題名（和文）非翻訳RNAに着目したCNI腎症早期発見システムの構築

研究課題名（英文）Construction of early detection system for CNI nephropathy focusing non-coding RNA

研究代表者

畔柳 佳幸 (kuroyanagi, yoshiyuki)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：30800031

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、カルシニューリン阻害薬（CNI）の使用による腎毒性（CNI腎症）の早期発見を目指している。CNIは移植後の拒絶反応抑制に有効だが、長期使用による腎毒性が問題となる。研究では、腎移植患者のmiRNAプロファイリングを行い、CNI腎症に特異的なmiRNA発現パターンを特定することを試みた。その結果、CNI腎症に関連する8つのmiRNAを発見し、これらは早期診断の新たなバイオマーカーとなる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、カルシニューリン阻害薬（CNI）による腎毒性（CNI腎症）の早期診断に新たな知見を提供する点で学術的意義が高い。具体的には、腎移植患者におけるmiRNAプロファイリングを通じて、CNI腎症に特異的な8つのmiRNAを同定したことが挙げられる。これにより、従来の侵襲的な腎生検に代わる非侵襲的な診断法の確立が期待される。また、早期診断により、適切な免疫抑制剤の減量や変更が可能となり、移植腎の長期生着を実現できる。この研究は、移植医療の質を向上させ、患者の生活の質を大幅に改善する社会的意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：This study aims at the early detection of nephrotoxicity (CNI nephropathy) caused by the use of calcineurin inhibitor (CNI). Although CNI is effective in suppressing rejection after transplantation, nephrotoxicity caused by long-term use remains a significant problem. In this study, miRNA profiling of kidney transplant patients was performed to identify miRNA expression patterns specific to CNI nephropathy. The results revealed eight miRNAs associated with CNI nephropathy, which could serve as novel biomarkers for early diagnosis.

研究分野：腎移植

キーワード：CNI腎症 腎毒性 非翻訳RNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

カルシニューリン阻害薬(CNI) は 1980 年代に登場し、薬剤としての CNI の免疫抑制は有効性が確立されており、膠原病、腎疾患、血液疾患等の様々な疾患で使用されている。しかし使用する疾患はほとんどが慢性疾患であり、長期使用にならざるを得ないという側面を持っている。移植分野では拒絶反応の抑制効果で大幅に腎移植の中期的成績を改善させ、現在も腎移植管理における根幹的免疫抑制剤として使用されている。

一方で CNI の副作用として高血圧、脂質代謝異常、糖尿病、高尿酸血症、高 K 血症などがあるが、特に重大な副作用として腎毒性があり、高濃度での管理、長期使用により CNI 腎症を引き起こす。腎移植分野においても CNI 腎症が移植腎長期生着の問題となる。Nankivell らは腎移植患者の 10 年後の腎生検で重症度の違いはあるものの、CNI 毒性がほぼすべての患者で普遍的に認められると述べている(N Engl J Med. 2003;349:2326-33)。無症候性 CNI 腎症は比較的早期から認められ、Galina らの報告では移植後 1 年後プロトコール腎生検 48 例の検討で 3 例(6%)の無症候性 CNI 腎症を報告している(Open Access Maced J Med Sci.2018;30:606-612)。CNI 腎症は軽度であれば、CNI の減量や他の免疫抑制剤への変更により可逆的であると言われており、無症候性 CNI 腎症を発症早期に発見は移植腎長期生着の重要な課題の一つとなっている。しかし現時点で CNI 腎症の原因も多様な過程が含まれておりその複雑な機序から、現時点で診断する特異的なバイオマーカーはなく、確定診断は腎生検で病理学的に診断する以外に方法は無い。

ゲノムの 90%以上の領域から転写が起こり、転写物の 98%以上はタンパク質をコードしない非翻訳性 RNA (ncRNA) である。ncRNA はこれまで転写、RNA プロセッシング、RNA 分解、翻訳などの遺伝子発現の様々な段階に影響を与えることが知られている。ncRNA 生物学的意義の解明はがん研究において近年報告が増えており、がん幹細胞性の維持や浸潤・転移といったがんの様々な悪性形質に関連し、治療標的分子あるいは診断バイオマーカーとしての有用性が期待されている。ncRNA には micro RNA (miRNA)、long non-coding RNA (lncRNA)、small interfering RNA (siRNA)、PIWI-interacting RNA (piRNA) 複など数の種類がある。miRNA/siRNA/piRNA といった低分子 RNA は 標的 mRNA への結合を介して翻訳を制御したり、タンパク質との複合体を形成し発生、細胞増殖および細胞分化、アポトーシスまたは代謝といった生物学的プロセスに重要な役割を担っている。lncRNA はインプリンティング制御やクロマチン修飾因子との相互作用など重要な機能が次々に明らかになりつつある。

今回着目した miRNA の様々な疾患への関与が明らかになりつつあるが、一方で単一の miRNA は多くの場合疾患特異的ではなく、複数の異なる miRNA で構成される miRNA 発現パターンを解析すること(miRNA プロファイリング)で疾患の鑑別に有用であることが最近の研究で明らかになっている。近年肺癌や前立腺癌の診断において miRNA プロファイリングで悪性度や治療効果予測が可能であるとの報告がされており、(Proc Natl Acad Sci USA.2008;105:10513-8, PLoS One. 2015;10(4):e0124245)、近年がん領域に限らず様々な疾患領域に対してその診断、重症度評価、治療等の様々な用途に miRNA プロファイリングが活用されている。

## 2. 研究の目的

腎移植患者において miRNA プロファイリングを行うことにより、CNI 腎症に特異的な複数の miRNA 発現パターンを特定することは、長期生着の重要な課題である CNI 腎症の早期発見の重要な情報ツールとなり、免疫抑制剤減量、変更などで介入することで CNI 腎症を起こさせな

い移植医療実現において重要な役割を担うものである。しかし従来の報告ではラットにおいて CNI(シクロスポリン)使用前、使用後の miRNA の変化についてはいくつかの報告があるものの、単一の miRNA の独立した研究にとどまっているのが現状であった(Am J Transplant.2015;15:1682-91,Transpl Int. 2015;28:232-45)。最新の報告でも人を用いた移植腎の状態を評価するゴールドスタンダードは腎生検である。移植腎の腎生検が行われる経緯として腎移植術直後、1年後、その他経年で行うプロトコル腎生検、移植腎に病的な異常が強く疑われる場合に行われるエピソード腎生検の2つの過程がある。経年的に CNI 腎症の頻度は増加するが、長期生着している移植腎であるほどドナー特異的抗体(Donor Specific HLA Antibody ; DSA)等の免疫学的要因や高血圧、高脂血症、糖尿病等の患者の状態による移植後の後天的な様々な要因が混在することが多い。1年後のプロトコル腎生検の特徴としてエピソード腎生検や長期生着症例の腎生検とは違い様々な慢性拒絶の多因子要因の影響が少なく、無症候性 CNI 腎症の単独病変を特定できることが特徴である。このことから CNI 腎症バイオマーカーを発見するのに、1年後腎生検時が組織学的評価と同時期に血清学的評価を行うに際して最も適切な時期であると考えられる。ここの両者の相互関係を評価することにより組織学的にのみでしか評価し得ない CNI 腎症を血清学的評価に置き換えることが可能であり、その結果として侵襲的な検査である移植腎生検の減少できる可能性がある。

### 3. 研究の方法

当研究室では移植時および移植1年後プロトコル腎生検と同時期の採血検体の保存を行っている。この同一患者の2つの時期に採取された検体を利用して比較することで miRNA プロファイリングを作成した。

2011年から2020年に施行された移植直後および移植1年後プロトコル腎生検の腎病理を検討することにより移植後1年の経過で発生した無症候性 CNI 腎症単独病変が認められた症例(以下 CNIN 群)を抽出した。同時に対象群として移植腎直後およびプロトコル腎生検にて移植直後、1年後ともに異常が認められなかったコントロール群の患者の5例(以下 CONT 群)も同時に抽出した。腎病理は1人の熟練した腎病理医が診断し、診断の精度の統一化を図った。

CONT 群、CNIN 群のそれぞれ2つの時期(移植時、1年後腎生検時)に採取された同一患者の末梢血リンパ球から miRNA をマイクロアレイ法により抽出を行い比較検討することで CNIN のバイオマーカーとなりうる miRNA 探索を試みた。

(図1)

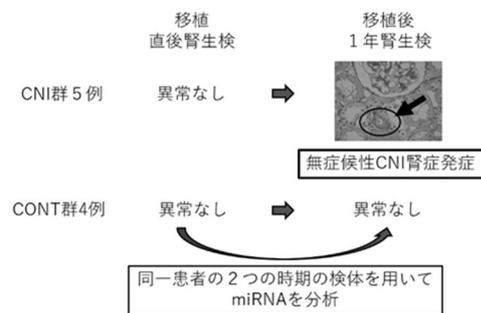


図1 実験の方法

### 4. 研究成果

解析ソフト (RNAseqchef: <https://imegku.shinyapps.io/RNAseqChef/>) を使用し CONT 群 5 例、CNIN 群 4 例の計 9 人の個人毎の移植時、1 年後の miRNA 比率をとり両群間の中で階層クラスタリングを行うことで、グループ分けが同一群のなかで一定の傾向を持つことを確認した(図2)。

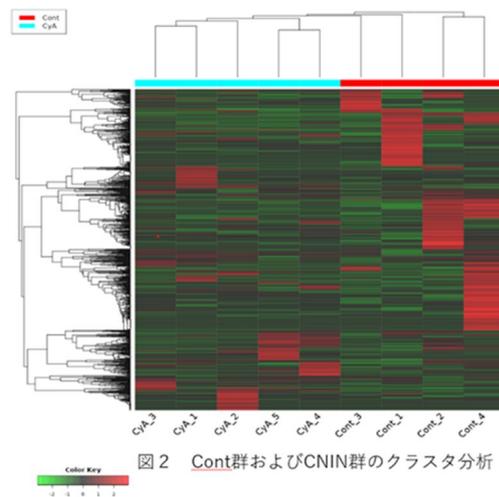


図2 Cont群およびCNIN群のクラスタ分析

さらに解析をすすめバイオマーカーとなりうる変化率の高いmiRNAを10個抽出した。(図3)うち5個はダウンレギュレーション、5個はアップレギュレーションしていた。(図3)

これらの10個のうち明らかにいずれの検体においても発現量が少ない2つを除き

(miR-380-5p,miR-589-3p)

8個のmiRNA(図4)がCNI腎症に関与していると考えられた。

この8つのmiRNAはいずれもCNI腎症のバイオマーカーとしての報告例はなく今後のCNI腎症の早期診断に新たな知見を寄与するものである。

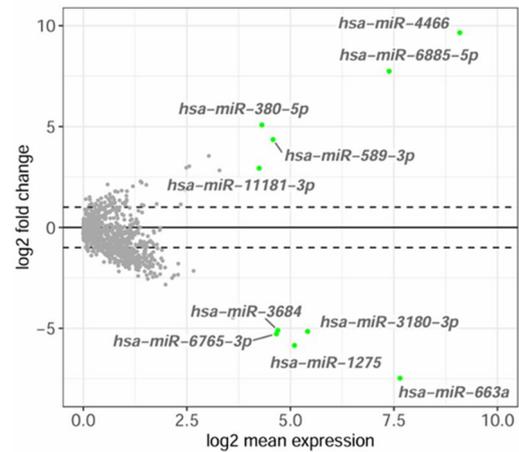


図3 miRNA抽出

	miRNA
up	miR-4466
	miR-6885-5p
	miR-11181-3p
Down	miR-3684
	miR-3180-3p
	miR-6765-3p
	miR-1275
	miR-663a

図4

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	岩崎 研太  (iwasaki kenta)  (10508881)	愛知医科大学・医学部・准教授    (33920)	
研究分担者	小林 孝彰  (kobayashi takaaki)  (70314010)	愛知医科大学・医学部・教授    (33920)	
研究分担者	三輪 祐子  (miwa yuuko)  (90572941)	愛知医科大学・医学部・助教    (33920)	

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