

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16189

研究課題名（和文）腎疾患におけるmiR-23bの意義の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the significance of miR-23b in kidney disease

研究代表者

大野 祥子（Ohno, Shoko）

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：50816874

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では腎疾患におけるmiR-23bの機能解明を目的として、種々の腎疾患モデルでのmiR-23bの腎臓での発現を解析したところ、miR-23b発現はストレプトゾトシン糖尿病マウスの糸球体で低下していたが、抗GBM腎炎の糸球体では増加していた。またアデニン腎症モデルの全腎では大きく低下し、一側尿管結紮モデルの全腎では軽度増加していた。薬剤誘導性全身性miR-23bノックアウトマウスとポドサイト特異的miR-23bノックアウトマウスの腎臓はコントロールマウスと比較して差を認めなかった。抗GBM腎炎薬剤誘導性全身性miR-23bノックアウトマウスでも差を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

microRNAは様々な遺伝子のタンパク質が生成される前に調節を行うRNAであり、多くの標的遺伝子を持つことから、生命の機能の微調節に関与するとされる。miR-23bは腎糸球体で比較的多く発現することから、腎疾患に何等かの役割を持つことが想定される。今回複数の腎障害動物モデルで解析を行ったところ、抗GBM腎炎で増加することを見出した。miR-23bは抗GBM腎炎において病態進展に関与するかmiR-23bノックアウトマウスを用いて検討したが、本研究結果からは大きく関与しているとは言えず、今後別の腎疾患モデルでの検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the function of miR-23b in renal disease, we analyzed the renal expression of miR-23b in various renal disease models. miR-23b expression was decreased in the glomeruli of streptozotocin diabetic mice, but increased in anti-GBM nephritis. It was also greatly decreased in the whole kidney of the adenine nephropathy model and mildly increased in the whole kidney of the unilateral ureteral obstruction model. The kidneys of tamoxifen-induced systemic miR-23b knockout mice and podocyte-specific miR-23b knockout mice showed no differences compared to control mice. Anti-GBM nephritis-induced tamoxifen-treated systemic miR-23b knockout mice also showed no differences.

研究分野：腎臓内科

キーワード：microRNA miR-23b 糖尿病性腎症 抗GBM腎炎 薬剤誘導性全身性ノックアウトマウス ポドサイト特異的ノックアウトマウス

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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。また、当研究室ではconnective tissue growth factor (CTGF/CCN2)が線維化促進因子であり、その抑制が治療的效果を有することを示してきた。そして、ポドサイトにおけるmicroRNAに着目し、ヒト培養ポドサイトにおいてTGF- β 刺激で変化するmicroRNAを網羅的に解析した(図1)。その中で、CTGF/CCN2を標的とするmicroRNA-26aに着目し、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進行例で低下**することを示してきた(図2;Koga, *Ohno et al.* Diabetologia 58:2169, 2015)。

本研究では、ポドサイトに於いて重要な働きをするmiR-26a以外のmicroRNAを検討することとし、図1で示した網羅的解析で変化するmicroRNAの中から、**TGF- β ならびに Angiotensin 刺激で低下する miR-23b**に着目した。既報として、miR-23bは糖尿病マウスである db/db マウスで減少が認められ、Ras GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein 2 (G3BP2)を標的とし、 db/db マウスにmiR-23b agomirを経静脈投与すると腎症が軽快するという報告がある(Zhao et al. J Am Soc Nephrol 27:2597, 2016)。また、miR-23bはphosphatase and tensin homologue (PTEN)を標的とすることも報告されている(Guo et al. Int J Mol Med 42:1637, 2018)。しかしながらmiR-23bの db/db マウス以外の腎臓病における意義については不明である。

2. 研究の目的

種々の腎障害モデルにおいてmiR-23bの発現変化がみられるかを検討する。モデルとして、ストレプトゾトシン糖尿病モデル(STZ)と抗糸球体基底膜腎炎モデル(GBM)の糸球体、アデニン腎症モデルと一側尿管結紮モデル(UUO)のwhole kidneyのmiR-23bの発現を解析することを目的とする。また、薬剤誘導性全身性miR-23bノックアウトマウスとポドサイト特異的miR-23bノックアウトマウスを作製し、その表現型を解析する。さらに、薬剤誘導性全身性miR-23bノックアウトマウスにGBM腎炎を惹起し、その表現型を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 腎疾患モデル動物における全腎のmiR-23b発現の解析

培養ヒトpodocyteにおけるmiRNAの網羅的解析

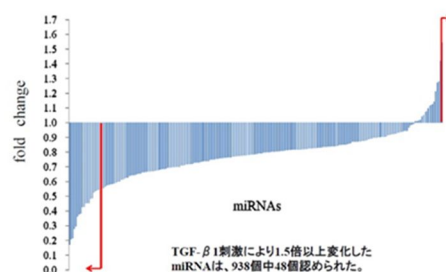
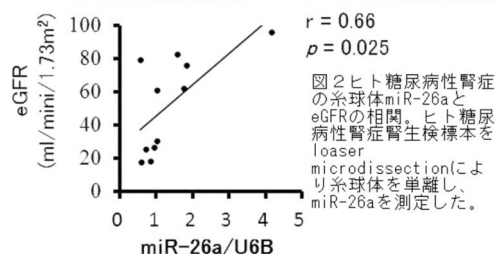
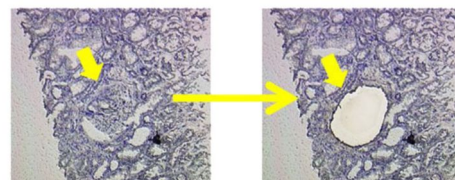


図1ヒト培養ポドサイトにTGF- β 1を添加し、網羅的にmicroRNAの変化を検討した。

LMD (laser microdissection)



体重 18~20 g のオス C57BL/6J マウスにストレプトゾトシン 100 mg/kg を 3 日間連日腹腔内投与を行いストレプトゾトシン糖尿病モデル (STZ) モデルを作製し、投与 12 週後に解析した。8 週令のオスマウスにラビット IgG を投与した後、抗系球体基底膜 (GBM) 抗体を経静脈投与し抗 GBM 腎炎の系球体を解析した。体重 22~25g のオスマウスに 0.2% アデニンを負荷しアデニン腎症モデルを作製し 7 週後に解析した。8 週令のマウスに一側尿管結紮 (UUO) を行い、7 日後に解析した。

2) 薬剤誘導性全身性 miR-23b ノックアウトマウスとポドサイト特異的 miR-23b ノックアウトマウスの腎病変の解析

miR-23b floxed マウスは Jackson Laboratory より Mir-23b^{tm1Mtm}/Mmjax マウスを導入し、全身性 Cre マウスは RosaCreER^{T2} マウス (Artemis 社) を用いた。交配して得られたマウスに 6 週令で Tamoxifen を投与し、miR-23b が部分的に欠損した状態の薬剤誘導性全身性 miR-23b ノックアウトマウスを作製し、腎臓の所見を検討した。また miR-23b floxed マウスを Nephrin-Cre マウスと交配し、ポドサイト特異的 miR-23b ノックアウトマウスを作製し解析した。

3) 薬剤誘導性全身性 miR-23b ノックアウトマウスを用いた、抗 GBM 腎炎における miR-23b の役割の解明

薬剤誘導性全身性 miR-23b ノックアウトマウスとコントロールマウスに、ラビット IgG とラビット抗マウス GBM 抗体を投与し抗 GBM 腎炎を惹起し、腎病変の表現型を検討することにより、miR-23b の役割を検討する。

4. 研究成果

1) 腎疾患モデル動物における全腎の miR-23b 発現の解析

ストレプトゾトシン糖尿病と GBM 腎炎の系球体、アデニン腎症と UUO 腎の全腎の miR-23b を解析した (図 3)。その結果、miR-23b 発現はストレプトゾトシン糖尿病マウスの系球体で低下していたが、抗 GBM 腎炎では増加していた。またアデニン腎症モデルの全腎では大きく低下し、一側尿管結紮モデルの全腎では軽度増加していた。

2) 薬剤誘導性全身性 miR-23b ノックアウトマウスとポドサイト特異的 miR-23b ノックアウトマウスの腎病変の解析

薬剤誘導性全身性 miR-23b ノックアウトマウスは系球体の miR-23b が約 80% 低下していた。このマウスは 16 週令時点で血圧、尿アルブミンクレアチニン比、血清 Cr、腎組織像において変化を認めなかった。またポドサイト特異的 miR-23b ノックアウトマウスも同様に、血圧、尿アルブミンクレアチニン比、血清 Cr、腎組織像において変化を認めなかった。

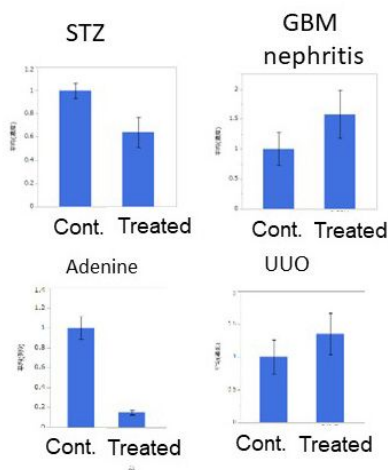


図 3 動物腎障害モデルにおける腎 miR-23b の発現レベル。STZ と GBM は系球体、Adenine と UUO は whole kidney。STZ: ストレプトゾトシン、GBM nephritis: 抗 GBM 腎炎モデル、Adenine: アデニン腎症、UUO: 一側尿管結紮モデル

3) 薬剤誘導性全身性 miR-23b ノックアウトマウスを用いた、抗 GBM 腎炎における miR-23b の役割の解明

6週令のマウスに tamoxifen 投与を行い、8週令のマウスに抗 GBM 腎炎を惹起した。抗 GBM 腎炎を惹起したコントロールマウスおよび薬剤誘導性全身性 miR-23b ノックアウトマウスは尿蛋白クレアチニン比が 30 mg/mgCr 程度に増加したが、両群で差を認めなかった。他、体重、血圧、腎重量、腎組織形態、尿アルブミンクレアチニン比についていずれも変化を認めなかった。

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 Ohno S, Ishii A, Yanagita M, Yokoi H	4. 巻 Mar;26(3)
2. 論文標題 Calcium channel blocker in patients with chronic kidney disease.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clin Exp Nephrol.	6. 最初と最後の頁 207-215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10157-021-02153-1.	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 Handa T, Mori KP, Ishii A, Ohno S, Kanai Y, Watanabe-Takano H, Yasoda A, Kuwabara T, Takahashi N, Mochizuki N, Mukoyama M, Yanagita M, Yokoi H	4. 巻 Nov 8;11(1)
2. 論文標題 Osteocrin ameliorates adriamycin nephropathy via p38 mitogen-activated protein kinase inhibition.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 21835
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-01095-8.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 半田貴也, 森 慶太, 石井 輝, 大野祥子, 金井有吾, 八十田明宏, 柴原孝成, 向山政志, 柳田素子, 横井秀基
2. 発表標題 オステオクリンはナトリウム利尿ペプチド受容体3を阻害し、アドリアマイシン腎症 を軽減する
3. 学会等名 第65回日本腎臓内科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石村拓也, 石井 輝, 山田博之, 中川靖章, 大野祥子, 生島昭恵, 杉岡清香, 半田貴也, 桑原:宏一郎, 柳田素子, 横井秀基
2. 発表標題 拡張型心筋症モデルマウスを用いた心腎連関の機序解明
3. 学会等名 第65回日本腎臓内科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大野祥子、横井秀基、小泉三輝、三木・晶森、辻博子、本田一穂、松原雄、柳田素子
2. 発表標題 腹膜炎歴なく腹膜透析7年の後、血液透析移行後に腹水貯留で発症したEPSの一例
3. 学会等名 第28回日本腹膜透析医学会総会シンポジウム
4. 発表年 2022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

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