

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月23日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590880

研究課題名（和文）慢性腎臓病における miRNA 発現変動と虚血・小胞体ストレス応答制御への関与の解明

研究課題名（英文）Expression profile of miRNA in chronic kidney disease and identification of miRNA regulating hypoxia and endoplasmic reticulum stress signals

## 研究代表者

稲城 玲子（INAGI REIKO）

東京大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：50232509

研究成果の概要（和文）：慢性腎臓病における microRNA (miRNA) の役割を解明する目的で、虚血・小胞体ストレス負荷尿細管細胞の miRNA microarray 解析、ストレス下で発現変動する miRNA の機能解析を行った。その結果、1) miR-205 発現はストレス下で著明に低下し、尿細管細胞のストレス感受性を高める、2) miR-205 の標的遺伝子として PHD1 を同定、3) ストレス下での miR-205 発現低下は PHD1 発現亢進、虚血・小胞体ストレス転写因子 HIF/ATF4 の分解促進、ひいては下流遺伝子抗酸化酵素群の発現低下を招くことなどを明らかにした。miR-205 は尿細管細胞恒常性維持に寄与している可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：To assess the pathophysiological function of microRNA (miRNA) in chronic kidney disease (CKD), we performed the miRNA microarray analysis and the loss/gain function assay in human tubular cells (HK-2) expose to hypoxia-induced oxidative stress or endoplasmic reticulum (ER) stress. The results demonstrated that 1) miR-205 expression was significantly decreased by hypoxia-induced oxidative stress or ER stress and was associated with cellular sensitivity to the stresses, 2) PHD1, which degrades transcription factors (HIF, ATF4) of hypoxia and ER stress signals, is a target for miR-205, 3) decreased miR-205 suppressed the expression of HIF/ATF4 downstream genes, anti-oxidant enzymes, via upregulation of PHD1. miR-205 might contribute to tubular homeostasis.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：小胞体ストレス・尿細管・unfolded protein response・虚血・酸化ストレス・翻訳制御・microRNA・腎臓病

1. 研究開始当初の背景

| (1) 腎臓病における虚血、及び小胞体スト

レスの関与：腎臓病領域において、虚血の病態生理学は様々な腎病変で認められる共通概念として、我々を含め世界的に多くの研究がなされている (Review: Nangaku, J Am Soc Nephrol 2006, Nangaku, J Mol Med 2007)。虚血は低酸素応答反応 (Hypoxia inducible factor (HIF) 依存性経路) を惹起し、血管増生、酸素・エネルギー供給に関与する細胞保護的標的遺伝子群の発現を促進する以外に、小胞体ストレスも誘導することが知られている。近年では小胞体ストレスが、虚血や酸化ストレスを伴う腎病変部で惹起されることが明らかにされ、新たな病因論として注目されている。小胞体ストレスとは、小胞体機能 (新規合成蛋白の折りたたみ、ゴルジ体への輸送) が、様々な外的要因 (虚血、栄養飢餓、酸化ストレス、立体構造障害を伴う変異蛋白の産生など) で障害を受け、蛋白が適切に折りたたまれず不良蛋白が小胞体に蓄積し、小胞体機能劣化に陥った状態を示す。小胞体ストレスは2つに大別される細胞内シグナリング (unfolded protein response, UPR) を誘導する。一つは立体構造不良蛋白の折りたたみ能の亢進や、不良蛋白の小胞体外排除などによる小胞体機能維持、ひいては細胞の恒常性維持を担う (adaptive UPR)。もう一つは、過剰あるいは長期の小胞体ストレス時に細胞死を誘導する (apoptotic UPR)。小胞体ストレスは、神経変性疾患や糖尿病などに共通した病因論として 1990 年代に急速に研究が進んだが、腎臓病との関連性を示唆する報告は当時なかった。しかしここ数年で我々のグループを含め世界各国から、その病因論を裏付ける研究成果が相次いで報告され、糸球体、尿細管病変で小胞体ストレスが誘導され、発症・進行に深く関与することが明らかにされた (Inagi et al., J Am Soc Nephrol 2005, Inagi et al., Kidney Int 2005, Ohse and Inagi et al, Kidney Int 2006)。よって、adaptive UPR と apoptotic UPR のバランス、特に adaptive UPR を人為的に活性化することで腎保護効果が得られると推測されるが、そうした仮説を裏付ける成果も急速に蓄積しつつある (Review: Inagi, Nephron Exp Nephrol 2009, Inagi, Curr Opin Pharmacol 2010)。

小胞体ストレスは、その病因論の新規性に加え、他の病因論との密接な関連性が極めて重要である。虚血によるエネルギー枯渇、酸化ストレスによる活性酸素 (ROS) 産生亢進、炎症による炎症反応メディエーター合成亢進は小胞体ストレスの原因となる。それによって活性化された UPR は、低酸素応答系 (HIF 経路)、細胞内 ROS 産生、酸化ストレス応答系 (Nrf2 経路)、炎症反応系 (NF- $\kappa$ B 経路) を活性化することから、小胞体ストレスは虚血、酸化ストレス、炎症の増悪因子となり得る。

申請者らは、小胞体ストレスの病因論を探索するなかで、特に小胞体ストレス preconditioning に関する研究を精力的に進めてきた。小胞体ストレス preconditioning とは、細胞障害のない軽度な小胞体ストレスを疾患誘導前に惹起しておくことで、細胞の適応能力を予め高めておき、その病態形成を軽減させるという概念である。興味深いことに、糸球体腎炎モデルラットに preconditioning を施行すると、病変に伴う UPR の過剰発現を抑制し、著明な腎保護効果を呈することを明らかにした (Inagi et al., J Am Soc Nephrol 2008)。

一連の研究により、小胞体ストレスの病因論の重要性のみならず、それに基づく腎臓病治療戦略の可能性が明らかにされると共に、本研究課題を先駆的、かつ独創的に遂行するために必要な研究基盤の構築がなされた。本研究では、それら知識と技術を駆使し、下記に記す miRNA の観点からさらに小胞体ストレスの腎臓における分子病態論を解明することを目指す。

(2) 腎臓病における microRNA (miRNA) の関与：miRNA による遺伝子発現制御は、癌における低酸素応答 (HIF) 経路の制御などを中心に急速に研究が進められており、その病態生理学的重要性が明らかにされつつある。小胞体ストレスと miRNA に関しては、non-coding RNA や miR-19 が小胞体ストレス誘導性細胞死や preconditioning による細胞保護に関与することが2報報告されているのみである。これら病因と腎臓病を直接的に関連づける miRNA の報告はないが、最近、足細胞機能、糖尿病性腎症などに関連する miRNA の報告がなされ、それらは蛋白尿、メサンギウム基質産生亢進などの糸球体障害機序を制御することが示唆されている。miRNA 発現制御の臨床有用性は、腎臓病領域においても極めて革新的で注目される最重要話題の一つである。申請者も他に先駆け、腎臓病における虚血や小胞体ストレスの分子病態解明の一端として、miRNA 発現変動と腎病態との関連性を予備的に検討してきた。その予備的知見として、尿細管上皮細胞に高発現する miRNA を網羅的に同定し、その中に虚血、小胞体ストレス、あるいは両方の刺激によって発現が変動する 32 種類の miRNA を同定することに成功した。それら miRNA は虚血を伴う癌細胞 (肺・大腸がん) で発現変動が認められる miRNA とは異なることから、臓器特異的に腎臓の病態と密接に関与する miRNA の可能性が推測され、本研究課題にて、in vitro, in vivo における機能解析を進めることを目標とする。これら miRNA 研究を通じて、虚血、小胞体ストレスの新たな分子病因論の進展、創薬標的分子探索の領域が広がることなどが大いに見込

まれる。

## 2. 研究の目的

(1) 腎臓細胞、特に尿細管細胞に焦点を絞り、虚血や小胞体ストレスで誘導されるストレス応答経路 (hypoxic response, unfolded protein response) で発現が変動するストレス関連 miRNA を、microRNA microarray 解析などを用いて網羅的に解析する。

(2) ストレス応答経路に関連する候補 miRNA 群の腎疾患における病態生理学的意義を明らかにするために、in vitro 実験を中心に標的 miRNA の loss/gain of function 解析を行い、病因論としての役割を解明する。

(3) 絞り込まれた miRNA を標的分子とした腎臓病創薬の可能性を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) 腎機能障害に関連する miRNA の網羅的探索 (in vitro 解析) (担当：稲城)  
これまでに我々は、培養尿細管上皮細胞株を用いて、様々な要因が虚血や小胞体ストレス応答経路 (HIF 経路, UPR 経路) を惹起させ、細胞機能障害 (細胞死、形質転換など) の引き金になることを報告してきた。本研究では、それらストレス応答経路が亢進する際に発現変動する miRNA を microarray (Agilent 社 human miR microarray Ver. 2) にて網羅的に解析する。

① ヒト培養尿細管上皮細胞に、虚血 (低酸素、0.1% O<sub>2</sub> 暴露)、あるいは小胞体ストレス (小胞体ストレス誘導剤添加) 負荷を加え、microRNA array 解析を行う。これまでの成果で尿細管上皮細胞は、虚血では HIF 経路を介して Hemoxygenase-1 (HO-1) が、小胞体ストレスでは UPR 経路を介してシャペロン (GRP78, ORP150) 発現が亢進することが分かっているので、それを指標にストレス負荷の程度 (細胞死 20% 程度を目安) を確認したうえで、microarray 解析を施行する。

② 虚血は細胞内エネルギー枯渇による蛋白折りたたみ機能低下、ひいては不良蛋白の小胞体内蓄積を引き起こし、小胞体ストレス応答 UPR を惹起するし、UPR 経路によって新規蛋白合成が抑制されると、HIF 経路を介した細胞保護的遺伝子群の翻訳が低下し、虚血に対する抵抗性が弱まる可能性が示唆されている。よって miRNA microarray 解析に際しては、この点を加味して、虚血、あるいは小胞体ストレスに特異的な、及び両者に共通な miRNA の探索を試みる。これによって、網羅的解析結果をより独創的、かつ効率良く in silico 分析できることが期待される。

③ 上記で絞り込まれた miRNA に関して、qPCR による発現変動を経時的に行う。qPCR の信頼性は、増幅産物のシーケンスにて行うが、その発現変動がわずかで、qPCR での再現性に信頼性がない場合には、ノザンプロット法にても評価する。

(2) 腎機能障害に関連する miRNA の網羅的探索 (in vivo 解析) (担当：南学、和田)  
上記で腎尿細管上皮細胞において虚血や小胞体ストレスで発現変動が認められた miRNA に関しては、in vivo 解析によってその変動を検証する。本研究では、ヒト候補 miRNA と相同性を有するラット miRNA に焦点を絞り、急性虚血、あるいは小胞体ストレス誘導剤投与ラット (尿細管拡張、上皮細胞脱落、間質への細胞浸潤などの尿細管障害を呈する) や、各種腎臓病モデルラット (急性腎不全、ネフローゼ、5/6 腎摘慢性腎不全、増殖性糸球体腎炎) における病態形成と miRNA 発現変動の相関を検討する。これらの解析を通じて、腎機能障害に関連する miRNA を in vitro, in vivo にて絞り込む。この際に考慮する点として、発現変動の評価系としては、qPCR を施行するが、それによる評価が難しい場合は、i) 糸球体分画、あるいは尿細管分画を用いて評価系を最適化する、ii) 候補 miRNA 解析用のオーダーメイド rat microarray chip を作成し、それを用いた microarray を施行する。

(3) 虚血、小胞体ストレス関連 miRNA の in silico による機能解析 (担当：大瀬)  
上記の解析にて絞り込まれた虚血、小胞体ストレス関連 miRNA が、ストレス応答経路 (HIF, UPR) にいかなる影響を及ぼすかを、miRNA の annotation に基づくコンピューター解析 (GeneSpring GX) にて推測し、miRNA の機能予測を行いつつ、機能解析の実験基盤を整える。

(4) 虚血、小胞体ストレス関連 miRNA の loss/gain of function assay による機能解析 (担当：稲城)  
絞り込まれた虚血や小胞体ストレス下で発現変動する候補 miRNA に対して、尿細管上皮細胞を用いた機能解析、病態生理学的意義、ストレス応答経路のスロストークにおける役割などを検討する。

## 4. 研究成果

(1) 糖尿病性腎症、慢性腎臓病、急性虚血性腎疾患など慢性、急性の腎臓病において、尿細管における低酸素、それに伴う酸化ストレスや小胞体 (ER) ストレスは共通して腎障害進展に関与する要因である。また近年、腎臓における様々な生理学的、病理学的応答系

への miRNA の関与が明らかとなっており、新規創薬標的因子として大いに注目されている。

そこで我々は本研究において、培養ヒト尿管細胞 (HK-2) を用いて低酸素-再酸素化を行う酸化ストレス群 (HR)、および tunicamycin もしくは thapsigargin 処理を行う ER ストレス群 (ER) における miRNA microarray 解析を施行し、ストレス下における miRNA 発現変動、及びその病態生理学的意義の解析を行ってきた。その成果の中で、HR や ER の刺激に共通して発現が低下する miRNA として miR-205 を同定した (図 1)。

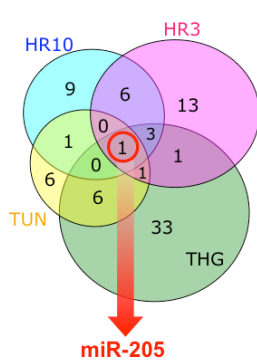


図 1. ストレス負荷尿管細胞における miRNA microarray 解析  
HR3, HR10: 16 時間低酸素培養後に 3, 10 時間再酸素化  
TUN : 24 時間 tunicamycin 処理  
THG : 24 時間 thapsigargin 処理

(2) miR-205 mimic (高発現)、あるいは inhibitor (発現抑制) を用いてその機能解析を行ったところ、miR-205 を過剰発現させた HK-2 では、野生型 HK-2 に比し HR ストレス群や ER ストレス群、さらに H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM, 5 分) による酸化ストレス群で細胞生存率が有意に上昇し、ストレス耐性を示した。それと同時に、スクラッチ後のモビリティアッセイによって細胞修復能の亢進も認められた。

それに比し、miR-205 発現を抑制すると、それらストレスに対する高い感受性を示し、ストレス下での細胞生存率の低下や、酸化ストレスによる細胞内 ROS 量の増加などがみられた。事実、miR-205 の低下は抗酸化酵素群 (SOD1, HO-1 など) の発現低下を伴っていた。

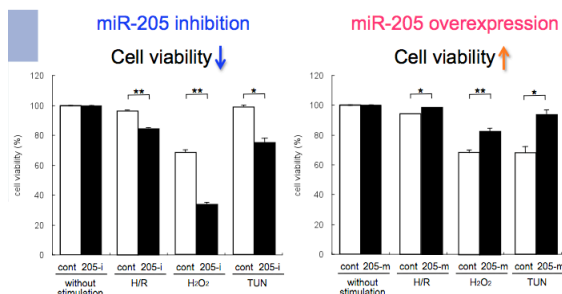


図 2. miR-205 発現変動がストレス負荷尿管細胞の生存率に及ぼす影響。H/R, 16 hr hypoxia followed by 10 hr reoxygenation;

TUN, tunicamycin

(3) そこで miR-205 の標的遺伝子を探索する目的で、miR-205 の標的候補遺伝子の in silico 解析や、ストレス負荷 HK-2 の発現遺伝子プロファイル (microarray 解析) を比較検討した。その結果、標的候補遺伝子のひとつとして prolyl hydroxylase (PHD)1 の翻訳制御に有意に関与することが判明した。PHD1 は低酸素応答経路の転写因子 HIF、及び小胞体ストレス応答経路の転写因子 ATF4 の蛋白分解を司る分子である。よって、miR-205 の低下で PHD1 の発現が亢進すると、HIF や ATF4 の蛋白分解が亢進することでそれらの発現が低下し、その結果、HIF や ATF4 の下流遺伝子である SOD1, HO-1 などの抗酸化酵素群の発現が低下することが明らかにされた。

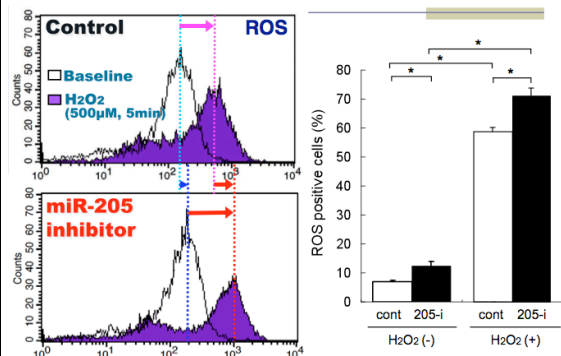
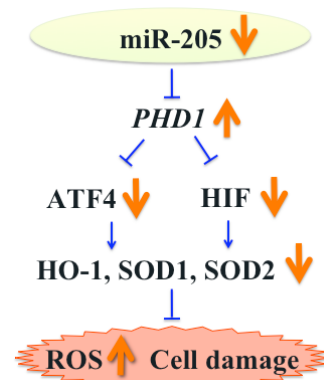


図 3. miR-205 がストレス負荷尿管細胞の細胞内 ROS レベルに及ぼす影響。205-i, miR-205 inhibition

(4) 以上の結果から、尿管細胞においてストレス障害時に miR-205 が低下すると PHD1 蛋白発現が亢進し、それによる低酸素応答経路や小胞体ストレス



応答経路の不均衡が尿管細胞の機能恒常性を破綻させることが示唆された。(右図参照)

miR-205 はストレスシグナル応答経路の調節を介し、尿管細胞の機能恒常性維持のために重要な役割を担うことが明らかにされた。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1: Chiang CK, Nangaku M, Tanaka T, Iwakaki T, Inagi R. Endoplasmic reticulum stress signal impairs erythropoietin production: a role for ATF4. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013 Feb 15;304(4):C342-53. 査読有  
doi: 10.1152/ajpcell.00153.2012.

2: Muratsu-Ikeda S, Nangaku M, Ikeda Y, Tanaka T, Wada T, Inagi R. Downregulation of miR-205 modulates cell susceptibility to oxidative and endoplasmic reticulum stresses in renal tubular cells. *PLoS One*. 2012;7(7):e41462. 査読有  
doi: 10.1371/journal.pone.0041462.

3: Ikeda Y, Inagi R, Miyata T, Nagai R, Arai M, Miyashita M, Itokawa M, Fujita T, Nangaku M. Glyoxalase I retards renal senescence. *Am J Pathol*. 2011 Dec;179(6):2810-21. 査読有  
doi: 10.1016/j.ajpath.2011.08.023.

4: Chiang CK, Tanaka T, Inagi R, Fujita T, Nangaku M. Indoxyl sulfate, a representative uremic toxin, suppresses erythropoietin production in a HIF-dependent manner. *Lab Invest*. 2011 Nov;91(11):1564-71. 査読有  
doi:10.1038/labinvest.2011.114.

5: Inagi R. Inhibitors of advanced glycation and endoplasmic reticulum stress. *Methods Enzymol*. 2011;491:361-80. 査読有  
doi: 10.1016/B978-0-12-385928-0.00020-1.

6: Nishi H, Inagi R, Kawada N, Yoshizato K, Mimura I, Fujita T, Nangaku M. Cytoglobin, a novel member of the globin family, protects kidney fibroblasts against oxidative stress under ischemic conditions. *Am J Pathol*. 2011 Jan;178(1):128-39. 査読有  
doi: 10.1016/j.ajpath.2010.11.011.

7: Mimura I, Nangaku M, Nishi H, Inagi R, Tanaka T, Fujita T. Cytoglobin, a novel globin, plays an antifibrotic role in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Nov;299(5):F1120-33. 査読有  
doi: 10.1152/ajprenal.00145.2010.

8: Chiang CK, Inagi R. Glomerular diseases: genetic causes and future

therapeutics. *Nat Rev Nephrol*. 2010 Sep;6(9):539-54. 査読有  
doi:10.1038/nrneph.2010.103.

9: Kawakami T, Inagi R, Wada T, Tanaka T, Fujita T, Nangaku M. Indoxyl sulfate inhibits proliferation of human proximal tubular cells via endoplasmic reticulum stress. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Sep;299(3):F568-76. 査読有  
doi:10.1152/ajprenal.00659.2009.

10: Inagi R, Kumagai T, Fujita T, Nangaku M. The role of glyoxalase system in renal hypoxia. *Adv Exp Med Biol*. 2010;662:49-55. 査読有  
doi:10.1007/978-1-4419-1241-1\_6.

11: Inagi R. Endoplasmic reticulum stress as a progression factor for kidney injury. *Curr Opin Pharmacol*. 2010 Apr;10(2):156-65. 査読有  
doi:10.1016/j.coph.2009.11.006.

[学会発表] (計 42 件) うち招待講演 12 件を記載

① Reiko Inagi (Invited) Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and the progression of kidney Disease. Lecture in Chulalongkorn University, February 19, 2013 Bangkok, Thailand

② Reiko Inagi (Invited) Glyoxalase I retards renal senescence. -Glycative stress as a mediator of renal senescence- Molecular and Cellular biology of Aging The 34<sup>th</sup> Japan Society for Biomedical Gerontology symposium, October 16, 2012 Nagoya, Japan

③ Reiko Inagi (Invited) Endoplasmic Reticulum Stress and kidney disease. INSERM seminar, September 12, 2012 Paris, France

④ Reiko Inagi (Invited) Glycative stress as a progressive factor for kidney disease and renal senescence. -A role for glyoxalase I- Annual Conference of the Korean Society for Gerontology (the 12th Korea-Japan joint symposia), June 14-15, 2012 Osong, Korea

⑤ 稲城玲子 シンポジウム:オルガネラと腎障害の密接な関係を紐解くー小胞体ストレスと腎障害ー 第 55 回日本腎臓学会学術総会 2012, 6 月 1-3 日 横浜

⑥ 稲城玲子 小胞体ストレスと腎性貧血. 協和発酵キリン腎臓シンポジウム 2011, 11 月 26 日 東京

- ⑦ 稲城玲子 小胞体ストレスとARB. ARBのエビデンスを考える会 2011, 11月7日 東京
- ⑧ Reiko Inagi (Invited) Endoplasmic reticulum: the master regulator of stress responses in kidney disease. The 20<sup>th</sup> anniversary symposium of the Korean Society of Life Science, 2011 Oct 27-28, Busan, Korea
- ⑨ Reiko Inagi (Invited) Endoplasmic reticulum stress in glomerulonephritis. Annual meeting of World congress of Nephrology (WCN2011), 2011 April 8-12, Vancouver, Canada
- ⑩ 稲城玲子 Endoplasmic Reticulum Stress and Kidney Disease. 南大阪腎臓セミナー, 2010, 7月16日 大阪
- ⑪ Reiko Inagi (Invited) Endoplasmic reticulum stress as a progression factor for kidney disease. The Korean Society for Microbiology and Biotechnology Annual Meeting & International Symposium, June 24-25, 2010 Seoul, Korea
- ⑫ Reiko Inagi (Invited) Endoplasmic reticulum stress as a progression factor for kidney disease. Seminar in Kyungpook National University, June 23, 2010, Daegu, Korea

[図書] (計6件)

- ① 稲城玲子、メディカルレビュー社、アンチ・エイジング医学：老化を促進する危険因子としての糖化ストレス、2012、pp29-34
- ② 城 愛理、稲城玲子、南学正臣、メディカルレビュー社、AGEsと老化—糖化制御からみたウェルエイジング—、2012、pp125-134
- ③ Inagi R. In Tech, An Update on Glomerulopathies - Volume I. Etiology and Pathogenesis. 2011, pp276
- ④ 稲城玲子、南学正臣、科学評論社、内分泌・糖尿病・代謝内科、2011、pp160
- ⑤ Inagi R. Humana Press, Endoplasmic reticulum stress as a target of therapy against oxidative stress and hypoxia in Studies on Renal Disorders. 2010, pp783
- ⑥ Inagi R. Springer, The role of glyoxalase system in renal hypoxia in Oxygen transport to tissue XXXI. 2010, pp552

[その他]

ホームページ等

[http://www.todai-jinnai.com/kenkyu/g\\_nephrology/g01\\_nephrology](http://www.todai-jinnai.com/kenkyu/g_nephrology/g01_nephrology)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲城 玲子 (INAGI REIKO)  
 東京大学・医学部附属病院・特任研究員  
 研究者番号：50232509

(2) 研究分担者

南学 正臣 (NANGAKU MASAOMI)  
 東京大学・医学部附属病院・教授  
 研究者番号：90311620

和田 健彦 (WADA TAKEHIKO)  
 東京大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号：90447409

大瀬 貴元 (OHSE TAKAMOTO)  
 東京大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号：10568447