

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591177

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症の発症に関わるマイクロRNAの同定とその機能解析

研究課題名(英文) Identification of microRNAs involved in the development of diabetic nephropathy

研究代表者

藤田 浩樹 (FUJITA, HIROKI)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：30333933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロRNA(miR)はノンコーディングRNAであり、自身と塩基配列相補性を示すメッセンジャーRNAの分解を導くか、タンパクへの翻訳を阻害することで、標的遺伝子の発現を抑制する。糖尿病性腎症への感受性の異なる2種類のAkita糖尿病マウスモデル、腎症抵抗性C57BL/6-Akita、腎症感受性KK/Ta-Akitaの腎および単離した糸球体からRNAを抽出し、両マウスで発現に違いがみられるmiRをマイクロアレイおよびRT-PCRで解析した。C57BL/6-AkitaとKK/Ta-Akitaの腎および糸球体で発現レベルが異なる数個のmiR群が同定され、糖尿病性腎症の発症進展への関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs (miRs) are a family of non-coding RNAs and inhibit target gene expression by causing messenger RNA degradation or by blocking protein translation. We analysed the specific expression of miRs by microarray and real-time RT-PCR using RNA extracted from whole kidneys and isolated glomeruli in two Akita diabetic mouse models which have different susceptibility to diabetic nephropathy, nephropathy-resistant C57BL/6-Akita and nephropathy-prone KK/Ta-Akita. Several miRs whose expression levels are different between C57BL/6-Akita and KK/Ta-Akita were identified in both whole kidney and glomerulus. These results indicate that the identified miRs may play an important role in the development and progression of diabetic nephropathy.

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：糖尿病性腎症 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA (miR) は、18~25 塩基長の小さな一本鎖 RNA であり、それ自身はタンパク質をコードしないノンコーディング RNA である。miR の標的は miR 自身と塩基配列相補性を示すメッセンジャー RNA であり、その分解を導くか、またはタンパクへの翻訳を阻害することにより、標的遺伝子の発現を抑制するように働いている。最近の研究は、miR に基づいた薬剤が癌や自己免疫疾患に対する有効な薬剤となりうることを示しており、糖尿病性腎症の発症進展に関わる遺伝子を調節する特有の miR を同定することはこの疾患に対する新たな治療戦略の開発にとって極めて有用であると考えられる。しかしながら、現在、糖尿病性腎症に関与する miR は明らかにはされていない。

2. 研究の目的

本研究では、糖尿病性腎症の発症進展に関与する miR を同定することを目的とした。糖尿病性腎症は組織学的に腎系球体におけるメサンギウム基質の増加や結節性病変など系球体硬化病変を特徴とする。そこで、我々は、糖尿病性腎症への感受性の異なる 2 種類の糖尿病マウスモデルを用いて腎臓全体および単離系球体での miR 発現プロファイルを作成し、両者で発現に違いのみられる miR を同定したのち、糖尿病性腎症における役割について検討した。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病マウスモデル

我々は最近、糖尿病性腎症への感受性の異なる 2 種類の非肥満型インスリン欠乏型糖尿病マウスモデル、腎症抵抗性 C57BL/6-Akita、腎症感受性 KK/Ta-Akita を確立した。両マウスモデルは同程度の著明な高血糖状態 (随時血糖値 400-600mg/dl) をきたすが、慢性の高血糖で誘因される酸化ストレスに対する防御能の違いにより、C57BL/6-Akita は糖尿病性腎症の発症進展に比較的抵抗性を示す一方、KK/Ta-Akita では系球体結節性病変の形成や高度アルブミン尿がみられ、進行した糖尿病性腎症を発症が観察される (詳細は J Am Soc Nephrol 20: 1303-1313, 2009 に掲載)。これらのモデルは糖尿病性腎症への遺伝的感受性に関連した本疾患の分子メカニズムの解明にとって優れたモデルであると考えられる。

(2) 実験動物と腎系球体単離法

15 週齢オス KK/Ta-Akita, KK/Ta-wild-type, C57BL/6-Akita, C57BL/6-wild-type マウスの 4 群において麻酔下で Magnetic 4.5µm diameter Dynabeads を心臓から perfusion したのち腎臓を摘出、collagenase で腎組織を消化し、Magnet で腎系球体を回収した。単離した系球体からは Qiagen 社の RNA 抽出キットを用いて RNA を抽出した。

(3) miR マイクロアレイ解析

海外共同研究者の Mike Thomson らが確立した方法に従って解析を行った (詳細は Methods Enzymol 427: 107-122, 2007 に掲載)。具体的には、腎臓全体および単離系球体から抽出した RNA を Cy3 と Cy5 で蛍光ラベルしたのち、124 個の miR オリゴヌクレオチドプローブがスポットされた Corning GAPS-2 スライドにハイブリダイズする。スライドを Genepix 4000B Scanner (Axon 社) でスキャンしたのち、Cy3 と Cy5 の強度から miR 発現の程度を評価した。

(4) miR 発現データ解析方法

各群 5-6 匹の腎臓全体および単離系球体におけるマイクロアレイ値の平均を算出、KK/Ta および C57BL/6 それぞれのマウスストレインごとの発現変化率 (% change) を以下の式で決定した。

$\%change = (Akita-WildType) / WildType$
 KK/Ta-Akita と C57BL/6-Akita の %change を比較し、両者で発現に違いがみられる miR を検出した。

(5) real-time RT-PCR アッセイによる miR 発現パターンの解析

上記にて得られた miR マイクロアレイによる解析結果を検証するため、Ambion 社の qRT-PCR miR キットにて KK/Ta-Akita マウス腎および系球体における miR 発現パターンの調査を行った。

4. 研究成果

(1) 腎 (whole kidney) における miR 発現プロファイルの比較

非糖尿病 wild-type に対する %change で評価した KK/Ta-Akita と C57BL/6-Akita それぞれのマウスストレインにおいて腎における miR 発現の所見が共通するものおよび違いのみられるものを表 1 にまとめた。

表 1. 腎における miR 発現 (マイクロアレイ)

C57BL/6-Akita, KK/Ta-Akita とともに増加 Mmu-miR-101a, 135a, 699, 759
C57BL/6-Akita, KK/Ta-Akita とともに減少 Mmu-miR-466g
C57BL/6-Akita 増加, KK/Ta-Akita 減少 Mmu-miR-466f, 695
C57BL/6-Akita 減少, KK/Ta-Akita 増加 Mmu-miR-125a-3p, 467a, 582-5p, 709

(2) 単離系球体における miR 発現プロファイルの比較

非糖尿病 wild-type に対する %change で評価した KK/Ta-Akita と C57BL/6-Akita それぞれのマウスストレインにおいて単離系球体における miR 発現の所見が共通するものおよび違いのみられるものを表 2 にまとめた。

表 2 . 系球体における miR 発現
(マイクロアレイ)

C57BL/6-Akita, KK/Ta-Akita ともに増加 Mmu-miR-130, 34
C57BL/6-Akita, KK/Ta-Akita ともに減少 Mmu-miR-429, 699
C57BL/6-Akita 増加, KK/Ta-Akita 減少 Mmu-miR-466, 30, 669c, 21
C57BL/6-Akita 減少, KK/Ta-Akita 増加 Mmu-miR-1224, 1893

(3) 進行性糖尿病性腎症を発症する KK/Ta-Akita マウス腎 (whole kidney) における miR 発現プロファイル: real-time RT-PCR による解析
同ストレイン非糖尿病 wild-type に対し発現の増加または減少がみられたものを表 3 にまとめた。

表 3 . 腎における miR 発現
(real-time RT-PCR)

KK/Ta-Akita 腎で発現増加がみられる miR Mmu-miR-699 (x7.7), miR-101a (x3.2), miR-27a (x2.7), miR-135a (x2.2), miR-300 (x2.4), let-7b (x1.8), miR-467a (x1.8), miR-582-5p (x1.8), miR-190 (x1.7), miR-709 (x3.1), miR-495 (x2.8)
KK/Ta-Akita 腎で発現減少がみられる miR Mmu-miR-686 (x4.2), miR-344 (x4.1), miR-130b (x3.9), miR-126-3p (x3.5), miR-449a (x3.5), miR-685 (x3.4), miR-69 (x3.2), miR-665 (x2.8), miR-134 (x2.7), miR-466g (x2.7), miR-466f-3p (x2.6)

() 内は非糖尿病 wild-type の発現に対する fold increase (倍) を示す。

(4) 進行性糖尿病性腎症を発症する KK/Ta-Akita マウス腎系球体における miR 発現プロファイル: real-time RT-PCR による解析
同ストレイン非糖尿病 wild-type に対し発現の増加または減少がみられたものを表 4 にまとめた。

表 4 . 系球体における miR 発現
(real-time RT-PCR)

KK/Ta-Akita 系球体で発現増加がみられる miR Mmu-miR-207 (x20), miR-16 (x8.5), miR-879 (x8.1), miR-409-5p (x2.6), miR-1893 (x2.5), miR-154 (x2.4), miR-130a (x2.3), miR-704 (x2.3), miR-1224 (x2.2), miR-34c (x2.1)
KK/Ta-Akita 系球体で発現減少がみられる miR Mmu-miR-376a (x18.2), miR-9-3 (x7.3), miR-719 (x4.2), miR-327 (x3.2), miR-494 (x2.4), miR-99b (x2.3), miR-455 (x2.3),

miR-130b (x2.3), miR-30b (x2.2), miR-190b (x2.2)

() 内は非糖尿病 wild-type の発現に対する fold increase (倍) を示す。

(5) miR 解析結果についての考察
これまでに報告された文献に従って考察すると、本研究で同定されたいくつかの miR 群が糖尿病性腎症の発症進展に深く関わっている可能性がある。文献からの所見と合わせてその詳細について以下に記載する。

miR-27a (KK/Ta-Akita 腎で発現増加) PPARgamma を down-regulate する (J Biol Chem 285: 11846-11853, 2010)。

miR-126-3p (KK/Ta-Akita 腎で発現減少) 血管再生に関わる内皮細胞特異的 miR である (Sci Signal 2(52): pe1, 2009)。

miR-21 (C57BL/6-Akita 系球体で発現増加, KK/Ta-Akita 系球体で発現減少) メサンギウム細胞の増殖を抑制する (FEBS Letters 583: 2009-2014, 2009)。

miR-130a (KK/Ta-Akita 系球体で発現増加) 血管平滑筋細胞の増殖を調節する (Am J Hypertens 24: 1087-1093, 2011)。

(6) 研究成果のまとめと今後の展望

本研究では、糖尿病性腎症発症進展への感受性の異なる 2 種類の Akita 糖尿病マウスを用いた解析から、糖尿病性腎症の発症進展に関わる可能性のある miR 群を同定した。本研究成果は、miR に基づいた糖尿病性腎症に対する新たな治療薬の開発および治療戦略の確立につながるものと期待される。本研究では、同定された糖尿病性腎症関連 miR 群に対する十分な機能解析結果を得ることまでは至らなかった。今後は、これら miR 群に対する特異的阻害薬または mimetic のマウスへの投与、さらには miR 発現ベクターや miR スポンジベクターの使用による培養系球体細胞での miR 過剰発現やノックダウンによる糖尿病性腎症関連遺伝子群やタンパク群の腎での発現の変化を調査することで、糖尿病性腎症の病態における miR の役割について解明していく予定である。

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)

[学会発表](計 1 件)

藤田浩樹、森井宰、藤田麻貴、高嶋悟、小川和孝、三ヶ田敦史、菅沼由美、清水尚子、清水辰徳、佐藤雄大、細葉美穂子、月山克史、成田琢磨、山田祐一郎、マイクロアレイ解析による糖尿病性腎症感受性マイクロ RNA の同定、第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011 年 5 月 20 日、札幌

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤田 浩樹 (FUJITA HIROKI)

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：30333933

(2)研究分担者

山田 祐一郎 (YAMADA YUICHIRO)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60283610