

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591178

研究課題名(和文) microRNA・尿プロテオーム解析による腎障害発症機序の解明とその臨床応用

研究課題名(英文) An analysis of urinary microRNAs and proteomes in renal diseases.

研究代表者

今田 恒夫 (Konta, Tsuneo)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：60333952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本検討では、腎疾患における尿中microRNA発現について解析した。各種腎疾患患者71名と健常者5名の尿中microRNAについてマイクロアレイ解析を行った。健常者、各腎疾患患者の尿検体から83～137種類のmicroRNAが検出され、80～99%のmicroRNAは健常者と腎疾患尿で共通であった。尿microRNA濃度は健常者に比較して腎疾患患者で増加し、腎疾患の種類により発現パターンは異なっていた。同一患者の腎組織と尿中microRNAの発現量は有意な正相関を示した。尿中microRNAは腎疾患毎に発現が異なり、腎疾患の新規バイオマーカーになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We examined the profiles of urinary microRNAs (UmiRNAs) in 5 healthy controls and 71 patients with various renal diseases. Urinary concentration of miRNAs increased in patients with renal disease compared with healthy controls. The microarray analysis detected 83-137 distinct UmiRNAs and 80-99% of UmiRNAs in both the healthy controls and the renal disease patients. The majority of UmiRNAs displayed higher signal intensity in renal disease patients than in healthy controls, including 39 miRNAs exhibiting signal intensities 100 times greater than that in healthy controls. A different pattern of UmiRNAs was observed in each type of renal disease. The miRNA signal intensity of renal tissue and urine samples was significantly correlated. This study demonstrated that UmiRNAs presented different patterns corresponding to the type of renal disease. These results suggest that UmiRNAs can potentially be used as novel biomarkers for renal diseases.

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：microRNA 尿 腎臓病

## 1. 研究開始当初の背景

近年、20 塩基前後の内因性 non-coding RNA オリゴヌクレオチドである microRNA が、RNA 翻訳抑制を介して、炎症・免疫・代謝など様々な生体反応に関与する遺伝子の発現を調節していることが明らかになった。腎組織内では数百種類の microRNA が発現しており、そのうち数種類が腎障害発症と関連することが報告された。microRNA の発見により、腎疾患研究は遺伝子多型よりも、その制御系に注目が集まってきている。

現在、腎障害の指標として、尿中アルブミン排泄増加や糸球体濾過量 (GFR) 低下が用いられている。しかし、尿中コラーゲンフラグメントなどの尿プロテオーム変化が、アルブミン尿や腎組織変化の前からみられることから、尿プロテオーム変化が腎障害をより鋭敏に反映している可能性が示された。

以上の最近の知見から、microRNA と尿プロテオーム解析は腎疾患の発症機序の解明や、早期診断、バイオマーカーの確立に有用と考えられるが、これまでの研究は腎疾患と microRNA、または腎疾患と尿プロテオームの関連をそれぞれ少数例で個別に検討しているのみで、microRNA と尿プロテオームを同時に多数例で解析した報告はなく、これらの指標の臨床的有用性は明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、腎疾患における尿中の microRNA とプロテオーム発現を網羅的に解析し、健常者と腎疾患患者での比較、腎組織変化と発現プロファイルの関連を検討することで、microRNA の腎疾患新規バイオマーカーとしての可能性を検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 各種腎疾患患者 71 例と健常者 5 例について、新鮮尿からは NORGEN 社 urine microRNA purification kit を用いて、腎組織からは Ambion 社 RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit を用いて、microRNA を抽出した。

(2) 抽出した microRNA について、Agilent 社マイクロアレイ解析 (Rel.16.0) を用いて 1257 種類の microRNA 発現を網羅的に解析し、腎生検組織の microRNA 発現プロファイルと比較した。

(3) 健常者と比較し腎疾患で発現が大きく変化した尿 microRNA を対象に、腎組織病変との関連や in-situ hybridization

(ISH)法による microRNA 発現の局在の検討を行った。

(4) 健常者と各種腎疾患の尿プロテオームを Mass spectrometry (MALDI-TOF 法) を用いて、腎疾患得的なプロテオームパターンパターンを解析する。得られたプロテオーム変化と microRNA プロファイルとの関連について検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 尿 microRNA 濃度と腎関連指標

全例で新鮮尿から microRNA が検出可能であった。尿 microRNA 濃度の中央値は健常者 3.6 mg/gCr、微小変化群 5.5 mg/gCr、IgA 腎症 6.3 mg/gCr、半月体形成性腎炎 9.1 mg/gCr、糖尿病性腎症 13.0 mg/gCr と腎疾患で高値であった。尿 microRNA 濃度は、尿蛋白と正相関を示したが、推定 GFR、血尿とは相関を示さなかった (図 1)。

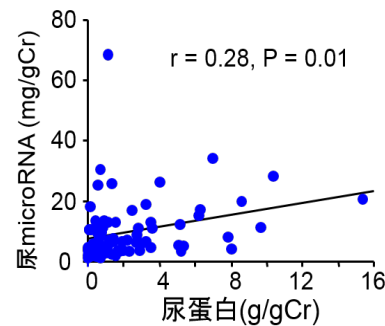


図 1. 尿 microRNA と尿蛋白

腎組織変化との関連では、尿 microRNA は糸球体硬化性変化と有意な正相関を示したが、増殖性変化とは相関を示さなかった (図 2)。

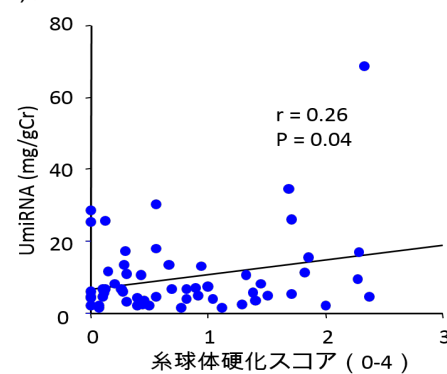


図 2. 尿 microRNA と糸球体硬化

### (2) microRNA 発現プロファイル

抽出した尿 microRNA について、1257 種類の microRNA 発現を網羅的に解析し、腎生検組織の microRNA 発現プロファイルと比較した。尿中に 83 ~ 137 種類の microRNA が検出され、腎疾患では健常人に比べ発現強度が高いものが多かった (図 3)。

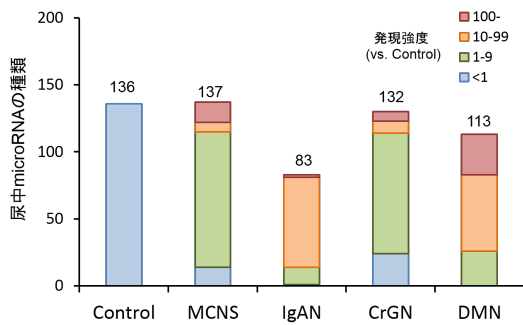


図3. 各腎疾患で発現している microRNA 発現の種類と発現強度

さらに、原疾患により高発現 microRNA のパターンが異なっており、全ての腎疾患で共通に発現しているもの(miR-573-3p)や疾患特異的に高発現(健常者比100倍以上)しているもの(微小変化群での miR-30e, miR-92a, miR-1274a, miR-3156, 半月体形成性腎炎での miR-193b, miR-494 など)がみられた。(図4)

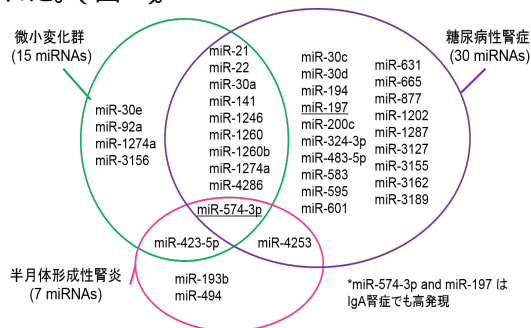


図4. 各腎疾患の高発現尿中 microRNA

各 microRNA の疾患特異的な発現を多数例で検討したところ、糖尿病性腎症で特異的に増加していた miR-30c は、健常者や他の腎疾患と比較して、有意に尿中濃度が増加していた(図5)。

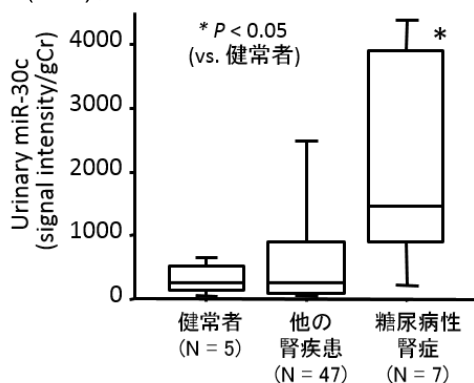


図5. 尿中 miR-30c 濃度の比較

### (3) In-situ hybridization(ISH) 法による microRNA 発現の局在

図6に示すように、microRNA の種類により、糸球体細胞、尿細管上皮、間質細胞に特異的な発現パターンが見られた。

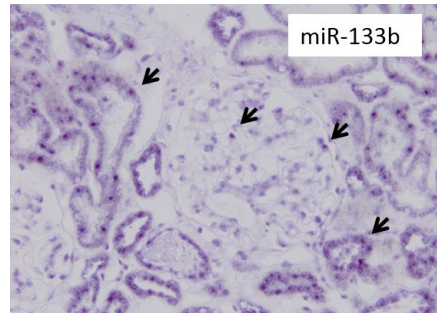
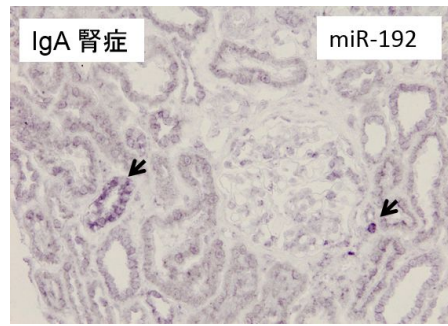


図6. microRNA 発現の局在

### (4) 尿・腎組織 microRNA の相関

尿 microRNA83 種類の中で 75 種類(90%)が腎組織中でも検出され、尿と腎組織で共通発現している microRNA の発現強度は正相関していた。このことから、尿 microRNA は腎組織 microRNA 発現を反映する可能性が示唆された(図7)。

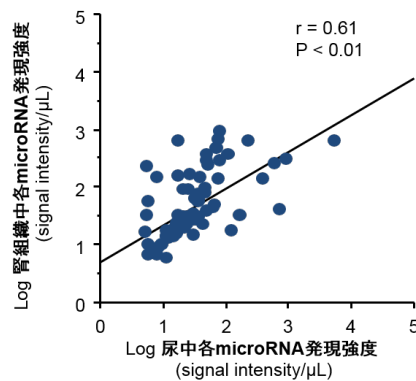


図7. 尿・腎組織 microRNA 発現強度の相関

### (5) 尿中メタボローム解析

腎生検例では障害部位、原疾患に特異的なピークをもつ尿プロテオームパターンが得られ、糸球体障害では 60kDa 近辺に、尿細管障害では 10-30kDa 近辺にピークを示していた。しかし、疾患別の尿 microRNA の発現パターンとは有意な相関は見られず、現時点では、その関連性は明らかではなかった。

### 結果のまとめ

以上の結果より、尿中 microRNA 発現は腎組織病変と原疾患により異なり、腎組織 microRNA 発現を反映することが明らかとな

った。尿中 microRNA は腎疾患の新たなバイオマーカーとなる可能性があり、今後さらに検討する価値があると思われた。

## 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1件)

Konta T, Ichikawa K, Suzuki K, Kudo K, Satoh H, Kamei K, Nishidate E, Kubota I. A microarray analysis of urinary microRNAs in renal diseases. Clin Exp Nephrol. 査読有、2013 Nov 6. [Epub ahead of print]

### [学会発表](計2件)

今田恒夫、佐藤紘子、工藤光介、鈴木和子、池田亜美、市川一誠、久保田功. 腎疾患患者における尿中 microRNA 発現プロファイル解析. 第 56 回日本腎臓学会学術集会. 2013 年 5 月 10-12 日東京(東京国際フォーラム)

Tsuneo Konta, Kazuko Suzuki, Ami Ikeda, Yusuke Mashima, Kazunobu Ichikawa, Isao Kubota. The urinary excretion of microRNAs in patients with renal diseases. Annual meeting of American Society of Nephrology. 2011. Nov. 8-13. Philadelphia USA, (Pennsylvania Convention Center)

### [その他]

ホームページ等

<http://www.ichinai.com/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

今田 恒夫 (KONTA Tsuneo)  
山形大学・医学部・准教授  
研究者番号：60333952

### (2)連携研究者

真島 佑介 (MASHIMA Yusuke)  
山形大学・医学部・医員  
研究者番号：60596576  
(H23)