

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461207

研究課題名(和文) 虚血・小胞体ストレス応答経路関連microRNAの腎臓病態生理活性の解明

研究課題名(英文) Identification of microRNA that regulates renal pathophysiology related to hypoxia and ER stress

研究代表者

稲城 玲子 (Inagi, Reiko)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：50232509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病(CKD)におけるエピゲノム変化の病態生理学的意義を明らかにすることを目的とし、1)ヒト尿細管上皮細胞発現microRNAにはCKD発症進展に関与するストレスシグナル(小胞体ストレス、酸化ストレス)により発現が変動するmicroRNAが存在し、その中にストレス適応応答経路の活性化を制御し、細胞恒常性維持に関与するmiR-205を同定し、2)糸球体濾過機能を携わる足細胞に発現するヒストン脱アセチル化酵素(Sirt1)は非エピゲノム活性も有し、細胞骨格関連分子コアクチンの脱アセチル化を介してアクチン細胞骨格の重合・安定性を亢進し、糸球体障害時の蛋白尿を軽減できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We assessed pathophysiological significance of epigenetics, especially microRNA (miR) or SIRT1, in kidney damage.

1) We identified miR-205, whose expression was markedly decreased both under hypoxia-reoxygenation (HR) and endoplasmic reticulum (ER) stress in tubular cells, and demonstrated that miR-205 regulated stress signals induced by HR or ER stress, subsequently tubular pathological phenotypes.

2) Podocyte-specific SIRT1 deficiency showed more severe glomerular/podocyte damages than control groups under oxidative stress conditions both in vivo and in vitro. As a function of SIRT1 in podocytes, we found that SIRT1 deacetylated cortactin for maintenance of actin cytoskeleton. SIRT1 expression in podocytes were significantly upregulated under the oxidative and ER stress conditions. Collectively, SIRT1 regulates the functional state of cortactin by deacetylation, and maintains actin cytoskeleton integrity in podocytes, suggesting a novel non-epigenetic function of SIRT1 in podocytes.

研究分野：医歯薬学

 キーワード：エピゲノム microRNA 小胞体ストレス 酸化ストレス 虚血・再灌流 SIRT1 アクチン細胞骨格
ポドサイト

1. 研究開始当初の背景

日本の慢性腎臓病(CKD)患者数は1,300万人を超え、成人8人に1人が患う新たな国民病として注目されている。なぜ今、そんなにCKD患者が増えているのか?多くの基礎的・臨床的研究からその理由がわかってきた。大きな理由の一つに糖尿病合併症の一つである糖尿病性腎症が急増(1998年から透析導入原疾患の一位)していることや、高齢化など社会的要因が挙げられる。腎臓は沈黙の臓器と呼ばれ、自覚症状がないまま糖尿病や加齢によってCKDは進行する。そのように無症状で進行するCKDには多様なリスクが潜んでいることがわかってきた。

その一つにCKDは末期腎不全による血液透析に至るのみならず、生活習慣病(心筋梗塞、動脈硬化)発症・進展のリスクとなることが明らかになってきた。つまり、腎臓は心臓や血管など他の臓器と密接に繋がっており、そのため腎機能が低下すると心臓や血管の機能低下を著明に引き起こす。CKDの進行が他の臓器に悪影響を及ぼすことは、腎臓が全身の健康を保つためにも重要であることを示している。

さらに老化はCKD進行を早める要因ともいわれ、その逆にCKDは老化を加速させることも科学的に実証され、老化とCKDの悪循環も昨今の超高齢社会においてますます注目されている。言い換えれば、現代の生活スタイルや超高齢化社会といった社会的背景においては、生活習慣病と老化はCKDと切り離せない密接な関係にあることを念頭に置いて新たな切り口でCKD病態生理学を研究する必要がある。

2. 研究の目的

将来の活力ある健康長寿社会づくりを目指す上で、高齢者の生活の質(QOL)向上や総医療費の削減は、解決が急がれる重要な課題のひとつである。そこで我々は、CKD撲滅によって健康長寿社会を築くことを目指し、革新的視点からCKDの病態生理を解明し、より有効なCKD予防・治療戦略の開発、ひいては高齢者が健康で自

立した豊かな生活を送れる高齢健康長寿社会づくりに貢献する基礎研究を展開してきた。特に本研究においては慢性腎臓病(CKD)におけるエピゲノム変化の病態生理学的意義を明らかにすることを目的とし、ヒト尿細管上皮細胞発現microRNAにはCKD発症進展に關与するストレスシグナル(小胞体ストレス、酸化ストレス)により発現が変動するmicroRNAが存在するか?もし存在するなら、ストレス適応応答経路の活性化を制御し、細胞恒常性維持に關与するmicroRNAがあるのではないかとこの作業仮説の証明を試みた。

3. 研究の方法

各種刺激を負荷した培養尿細管細胞や疾患モデル動物の腎組織にてmicroRNA microarray、及びmicroRNA機能解析を実施し、刺激に反応して発現が変動するmicroRNAとその病態生理学的意義を検討。また足細胞に発現するエピゲノム関連因子SIRT1の糸球体濾過機能における役割を解明する目的で、足細胞特異的SIRT1欠損マウスや培養足細胞株に疾患誘導因子を作用させ、糸球体や足細胞の形態変化(actin cytoskeletal)検討した。

4. 研究の成果

本研究では、腎臓細胞と腎臓病モデル動物を用いて、CKD発症進展に關与するストレスシグナルのエピゲノム制御の解明をmicroRNAの観点から解析した(次項4-1)。さらに老化関連エピゲノム因子SIRT1の腎機能、特に糸球体足細胞における病態生理学的機能に關しても解明(次項4-2)を行った。

4-1. CKDにおけるストレス応答経路の制御機構破綻の機序解明: エピゲノムの観点からのアプローチ

我々はこれまでに、エピゲノムと腎臓病の関係を明らかにする研究の一環として、尿細管上皮細胞に発現するmiR(microRNA)のプロファイリングを行い、そ

の中から尿細管細胞障害時に発現が変動する miR 群を明らかにしてきた。特に miR-205 は尿細管に恒常的に発現し、酸化ストレスや小胞体ストレス環境下ではその発現が著明に低下することを報告してきた (Muratsu-Ikeada S, Inagi R et al. Plos One 2012)。さらに詳細に miR-205 のヒト近位尿細管細胞株 (HK-2) における病態生理学的意義の解明を試みたところ、1) miR-205 は尿細管細胞が酸化ストレス (虚血再灌流後) や小胞体ストレス (tunicamycin Tapsigargin) に曝露すると尿細管細胞障害 (生存・増殖率低下や細胞内活性酸素種産生増加) に伴ってその発現が著明に低下するが、逆に虚血ストレス下 (1% O₂, 24 時間) では有意に miR-205 発現が亢進すること、2) miR-205 は prolyl hydroxylase (PHD)1 を標的遺伝子としてその発現を抑制し、その結果、PHD1 標的遺伝子 (虚血応答経路転写因子の HIF-1, 小胞体ストレス応答経路転写因子の ATF4) の発現低下、つまりストレス適応反応の低下を招くこと、3) miR-205 は PHD2 や PHD3 には作用せず、PHD アイソフォーム特異的な機能特性にも関与すること、などが分かってきた。

虚血再灌流モデルラットを用いた in vivo 解析では、腎皮質における miR-205 の発現は短期間では in vitro と同様に尿細管細胞障害亢進に伴って miR-205 の発現は低下するが、その後 miR-205 の発現は有意に亢進することが判明した。

以上の事から、尿細管細胞においてストレス障害時に miR-205 発現は低下し、PHD1 発現調節を介して低酸素応答経路や小胞体ストレス応答経路の不均衡を招くが、尿細管修復時には miR-205 の発現が亢進し尿細管細胞の機能恒常性を回復させる可能性が示唆された。

4-2 . ポドサイトの加齢ストレスと CKD : ポドサイト発現抗加齢遺伝子 SIRT1 の病態生理学的役割

糸球体足細胞 (ポドサイト) バイオロジーの研究分野で、最近注目されている分子のひとつに SIRT1 が挙げられる。SIRT1 は

ヒストン脱アセチル化酵素で、代表的なエピゲノム調節因子である。つまり SIRT1 はヒストンのアセチル化修飾を抑えてゲノム構造を締め (DNA のヒストンへの巻きつけを強めて) 転写を OFF にすることで遺伝子発現制御に関わる。我々はポドサイトにおける SIRT1 の役割を探索する中で、SIRT1 の新しい脱アセチル化標的分子としてコータクチン (cortactin) を見だし、コータクチンが SIRT1 によって適切に脱アセチル化されることでアクチン細胞骨格が機能的に維持されることを明らかにした (Motonishi S, Inagi R et al. J Am Soc Nephrol. 2015)。この SIRT1-コータクチン-アクチン経路はアクチン細胞骨格維持を介してポドサイト機能恒常性に重要で、一連の SIRT1 の非エピゲノム活性の破綻は蛋白尿の原因となることがわかってきた。

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 18 件 : 英文論文 11 件はすべて査読有り)

Chiang CK, Nangaku M, Tanaka T, Iwawaki T, Inagi R. Endoplasmic reticulum (ER) stress signal impairs erythropoietin production: a role for ATF4. Am J Physiol Cell Physiol 2013; 304: C342-353.

Shoji K, Murayama T, Mimura I, Wada T, Kume H, Goto A, Ohse T, Tanaka T, Inagi R, van der Hoorn FA, Manabe I, Homma Y, Fukayama M, Sakurai T, Hasegawa T, Aburatani H, Kodama T, Nangaku M. Sperm-associated antigen 4, a novel hypoxia-inducible factor 1 target, regulates cytokinesis, and its expression correlates with the prognosis of renal cell carcinoma. Am J Pathol 2013; 182: 2191-2203.

Inagi R, Shoji K, Nangaku M. Oxidative and endoplasmic reticulum (ER) stress in tissue fibrosis. Curr Pathobiol Rep 2013;

1: 283-9.
Watanabe-Jo A, Ohse T, Nishimatsu H, Takahashi M, Ikeda Y, Wada T, Miyata T, Nagano T, Hirata Y, Inagi R, Nangaku M. Glyoxalase I reduces glycative and oxidative stress and prevents age-related endothelial dysfunction through modulation of endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Aging Cell* 2014;13:519-528.
Inagi R. Glycative stress and glyoxalase in kidney disease and aging. *Biochem Soc Trans* 2014; 42: 457-460.
Inagi R, Ishimoto Y, Nangaku M. Proteostasis in endoplasmic reticulum: new mechanisms in kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2014; 10: 369-378.
Motonishi S, Nangaku M, Wada T, Ishimoto Y, Ohse T, Matsusaka T, Kubota N, Shimizu A, Kadowaki T, Tobe K, Inagi R. Sirtuin1 Maintains Actin Cytoskeleton by Deacetylation of Cortactin in Injured Podocytes. *J Am Soc Nephrol* 2015;26:1939-1959.
Persson P, Friederich-Persson M, Fasching A, Hansell P, Inagi R, Palm F. Adenosine A2 alpha receptor stimulation prevents proteinuria in diabetic rats by promoting an anti-inflammatory phenotype without affecting oxidative stress. *Acta Physiol (Oxf)*. 2015;214:311-318.
Nangaku M, Inagi R, Mimura I, Tanaka T. Epigenetic Changes Induced by Hypoxia-Inducible Factor: a Long Way Still To Go as a Target for Therapy? *J Am Soc Nephrol* 2015;26:1478-1480.
Ishimoto Y, Inagi R. Mitochondria: a therapeutic target in acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant* 2015 Sep 1. pii: gfv317. [Epub ahead of print]
Inagi R. The gut-kidney connection in advanced chronic kidney disease *Kid Res Clin Pract* 2015; 34: 191-193.
稲城 玲子. 【総括】 小胞体ストレ

スと闘う身体—小胞体が発信する生体適応シグナルと生活習慣病—. 細胞 特集：小胞体ストレス. ニューサイエンス社 2013;45:164-167.
石本 遊, 稲城玲子. 慢性腎臓病における低酸素・小胞体ストレス応答の分子機序. *Annual Review 腎臓* 2014. 中外医学社 2014; pp97-104.
平川陽亮, 稲城玲子, 南学正臣. 腎性貧血と腎機能低下：New findings in a moving filed. *腎と透析*. 東京医学社 2014;76:247-251.
平川陽亮, 稲城玲子. Proteostasis と腎臓病. *医学の歩み：腎臓病のすべて*. 医歯薬出版株式会社 2014; pp970-974.
平川陽亮, 稲城玲子. 小胞体ストレスと Proteostasis. *Annual Review 腎臓* 2015. 中外医学社 2015; pp19-25.
本西秀太, 稲城玲子. ポドサイトとストレス応答. *腎と透析*. 東京医学社 2015;78:395-399.
本西秀太, 稲城玲子. ポドサイトにおける SIRT1 の新たな役割. < 公募研究助成報告書 > 日本透析医会雑誌. 日本透析医会 2015;30:306-312.

〔学会発表〕(計 59 件から主要な招待講演を 29 件抜粋)

Reiko Inagi. Unfolded Protein Response and miRNA in Tubulointerstitial Diseases. ASN Kidney week 2013 Atlanta, GA Nov 5-10, 2013
Reiko Inagi. Glycative stress and glyoxalase in kidney disease and aging. Glyoxalase Centennial: 100 Years of Glyoxalase Research and Emergence of Dicarbonyl Stress in Warwick, UK Nov 27-29, 2013
稲城玲子. 腎性貧血と腎臓の線維化を繋ぐメカニズム：新たなコンセプトに基づく治療戦略にむけて. 技術情報協会セミナー「腎臓病」 東京 1月22日, 2014
稲城玲子. 小胞体ストレスが紡ぐ腎

性貧血. 東北大学大学院医学系研究科講演会 仙台 2月17日, 2014
Inagi R. Proteostasis and Uremia. 8th International Congress on Uremia Research and Toxicity in Okinawa, Japan March 13-15. 2014
Inagi R. Hypoxia and endoplasmic reticulum (ER) stress in the kidney. CARPEDIEM-kick off meeting in Amsterdam, NL. May 31. 2014
稲城玲子. 蛋白恒常性 (protein homeostasis) と老化. 第14回日本抗加齢医学会総会 大阪 6月6-8日, 2014
稲城玲子. 心血管老化と小胞体ストレス. Broad World Heart Conference (BWHC) 東京 6月28日, 2014
稲城玲子. 尿毒素を介した腎臓病治療の最前線. 第57回日本腎臓学会総会 横浜 7月4-6日, 2014
稲城玲子. 蛋白恒常性と腎老化: 老化蛋白から腎老化メカニズムを探る. 第2回腎性抗加齢医学を考える会 東京 7月20日, 2014
Inagi, R. Kidney aging and Uremic toxins. 7thAACL (Asian aging Core for Lecture) in Jeju, Korea September 21-22. 2014
稲城玲子. 小胞体ストレスが紡ぐ低酸素応答/酸化ストレス障害. 第87回日本生化学会大会 京都 10月15-18日, 2014
稲城玲子. 新たなCKDの発症・進展に關与する分子メカニズムに基づいた新たな創薬戦略. 技術情報協会セミナー「腎臓病の新たな分子メカニズムの基づいた新薬開発戦略と簡便なモデル動物作成」 東京 11月5日, 2014
稲城玲子. オルガネラストレスと蛋白恒常性. 第37回日本分子生物学会年会 横浜 11月25-27日, 2014
Motonishi S, Nangaku M, and Inagi R. Sirt1 maintains actin cytoskeleton by deacetylation of cortactin in podocytes. International Society of Nephrology

(ISN) Forefronts Symposium 2014 in Charleston, SC. Mar 6-9. (Oral presentation), 2014
Inagi R, Motonishi S, Nangaku M. Sirt1 maintains actin cytoskeleton by deacetylation of cortactin in podocytes. 51th ERA-EDTA congress in Amsterdam, NL. May 31-Jun 3. (Oral presentation), 2014
Anusornvongchai T, Chiang CK, Ishimoto Y, Suzuki N, Yamamoto M, Nangaku M, Inagi R. Long-chain Saturated Fatty acid-induced Endoplasmic Reticulum Stress Suppresses Erythropoietin Production in Kidney. American Society of Nephrology (ASN-Kidney week 2014) in Philadelphia, USA (Oral presentation), 2014
本西秀太, 南学正臣, 和田健彦, 石本遊, 松阪泰二, 清水章, 稲城玲子. SIRT1はpodocyteにおいてcortactinを脱アセチル化しアクチン細胞骨格を制御する. 第57回日本腎臓学会総会 横浜 7月4-6日 (優秀演題賞受賞) 2014
本西秀太, 南学正臣, 和田健彦, 石本遊, 松阪泰二, 清水章, 稲城玲子. SIRT1はpodocyteにおいてcortactinを脱アセチル化しアクチン細胞骨格を制御する. 第5回分子腎臓フォーラム 東京 9月6日 (優秀賞受賞) 2014
Anusornvongchai T, Ishimoto Y, Suzuki N, Yamamoto M, Nangaku M, Inagi R. Long-chain Saturated Fatty acid-induced Endoplasmic Reticulum Stress Suppresses Renal Erythropoietin Production. 第5回腎不全研究会 東京 12月13日 2014
21 Reiko Inagi. CKD and premature aging of kidney. Asian Aging Core for Longevity (AACL) “2006-2015, 10 years and Beyond” in Osaka, Japan March 10-13, 2015
22 Reiko Inagi . Proteostasis and kidney

- disease .Lecture in University of Virginia in Charlottesville, USA May 26. 2015
- 23 稲城玲子 . シンポジウム : 炎症を標的とした病態発症メカニズムの解明 . 慢性腎臓病 (CKD) と炎症 ~ 高齢化社会における CKD ~ . 第 15 回抗加齢医学会総会 福岡 5 月 29~31 日, 2015
- 24 稲城玲子 . ワークショップ 6 : 基礎研究への招待 . 世界と繋がる基礎研究の魅力 . 第 58 回日本腎臓学会学術総会 名古屋 6 月 5~7 日, 2015
- 25 Reiko Inagi . Hypoxia and ER stress in chronic kidney disease . An International Symposium on Oxygen Biology, Tokyo, Japan July 26, 2015
- 26 Reiko Inagi . Anemia in PD patients: lessons form HD and CKD patients. The 15th Congress of International Society for Peritoneal Dialysis, Taegue, Korea September 17-19, 2015
- 27 稲城玲子 . ワークショップ: 小胞体ストレス応答による生体内恒常性維持: 臓器連関の新展開. 尿毒素による臓器連関障害と小胞体ストレス. BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会) 神戸 12 月 1~4 日, 2015
- 28 Anusornvongchai T, Chiang CK, Suzuki N, Yamamoto M, Nangaku M, Inagi R. Palmitate suppresses EPO production via induction of endoplasmic reticulum stress. World Congress of Nephrology 2015 in Cape Town, South Africa, Mar 13-17, 2015
- 29 Inagi R, Anusornvongchai T, Ishimoto Y, Okada A, Suzuki N, Yamamoto M, Nangaku M. Palmitate Exacerbates Renal Anemia: Suppression of Renal Erythropoietin Production via Endoplasmic Reticulum Stress. Kidney Week 2015 in San Diego, USA, Nov 3-8, 2015

〔図書〕(計 3 件)

稲城玲子. 小胞体ストレスによる

EPO 産生制御. 全人力・科学力・透析力に基づく透析医学. 医薬ジャーナル社 2014; pp355-358

Inagi R. Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum Stress in Kidney Aging: Impact of Uremic Toxins as the Cause of Stress. In "Aging Mechanisms: Longevity, Metabolism, and Brain Aging" Edited by Nozomu Mori, Inhee Mook-Jung. (Springer 439 pages) 2015: pp209-221. PubMed PMID: 26333547

城愛理, 稲城玲子. メイラード反応の機構・制御・利用 シーエムシー出版 2016: pp39-47

〔その他〕

ホームページ等

東京大学 大学院医学系研究科 慢性腎臓病 (CKD) 病態生理学
<http://www.todai-ckd.com>

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・准教授
 研究者番号 : 5 0 2 3 2 5 0 9

(2) 研究分担者

南学 正臣 (NAGAGU, Masaomi)
 東京大学・医学部附属病院・教授
 研究者番号 : 9 0 3 1 1 6 2 0

和田 健彦 (WADA, Takehiko)
 東京大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号 : 9 0 4 4 7 4 0 9

大瀬 貴元 (OHSE, Takamoto)
 東京大学・医学部附属病院・臨床登録医
 研究者番号 : 1 0 5 6 8 4 4 7

(3) 研究協力者

城 愛理 (JO, Airi)
本西 秀太 (MOTONISHI, Shuta)
石本 遊 (ISHIMOTO, Yu)
岡田 啓 (OKADA, Akira)