

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461246

研究課題名(和文) 腹膜透析におけるPTN, CTGFを標的とするmicroRNAの意義の検討

研究課題名(英文) Role of microRNA targeting PTN and CTGF in peritoneal dialysis

研究代表者

笠原 正登 (Kasahara, Masato)

奈良県立医科大学・医学部・病院教授

研究者番号：50393351

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)：microRNA (miRNA)は遺伝子の蛋白翻訳調節にかかわるRNAである。Chlorhexidine gluconate (CG)の腹腔内投与により腹膜線維症マウスを作製し検討したところ、CTGFを標的とするmiR-26aとmiR-30cは増加し、VEGFを標的とするmiR-93も増加した。ヒト培養中皮細胞MeT5AではPDGF-BBとAngiotensin IIによりmiR-26a, miR-30c発現は増加した。薬剤誘導性CTGFコンディショナルノックアウトマウスではCGによる腹膜線維化が軽度であった。

研究成果の概要(英文)：microRNA regulates protein transcription of the targeted gene. We investigated the role of miRNA using peritoneal fibrosis mice induced by intraperitoneal injection of chlorhexidine gluconate (CG), and showed the increase of miR-26a and miR-30c both of which target CTGF and of miR-93 targeting VEGF. Administration of PDGF-BB or Angiotensin II induced miR-26a and miR-30c expression in cultured mesothelial cell line MeT5A. We further demonstrated the amelioration of peritoneal fibrosis induced by CG in tamoxifen-inducible systemic CTGF conditional knockout mice.

研究分野：腎臓

キーワード：腹膜透析 microRNA マウス トランスフェクション 培養細胞

1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA)は遺伝子の蛋白翻訳調節にかかわる RNA であるが、腹膜透析における意義については報告が少ない。申請者は腹膜線維症において pleiotrophin (PTN)が増加することを報告しており、今回 PTN に対する miRNA の調節機構を検討する。また、申請者は CTGF と線維化の関連に興味を持ち、*Ctgf* floxed マウスを用いて腹膜線維症における CTGF に対する miRNA の意義について検討する。本申請研究は遺伝子改変マウス、培養中皮細胞、ヒト腹膜生検組織、腹膜透析液排液における PTN と CTGF に対する miRNA の発現・機能的解析を中心に病態生理学的意義を明らかにし、長期腹膜透析合併症の機序解明や有用なバイオマーカーの探索を目的とする。申請者は、腹膜線維症モデルマウス腹膜組織において網羅的解析から pleiotrophin (PTN)発現が増加することを報告した。Ptn ノックアウトマウスでは炎症反応の減少、CD3 陽性 T 細胞の浸潤の低下、腹膜透過性亢進の抑制などが認められることを示し、PTN は機能的にも腹膜線維症に関与することを示してきた。さらにはヒト腹膜や腹膜透析排液中に検出されることを報告した (Yokoi, Kasahara *et al.* Kidney Int 2012)。また申請者は connective tissue growth factor (CTGF)が臓器線維化に関連する因子であることを示してきた (Yokoi *et al.* J Am Soc Nephrol 2004, Yokoi, Kasahara *et al.* Kidney Int 2008)。CTGF は腹膜線維症・硬化症発症にも関与する可能性が想定されているが (Mizutani *et al.* Am J Physiol Renal Physiol 298:F721, 2010)、その発現調節などは不明な点も多い。近年注目を集めている miRNA は約 22 塩基の非翻訳 RNA であり、Dicer などにより生成され、翻訳抑制や分解を介してターゲット mRNA を抑制する。しかしながら、腹膜透析における miRNA の意義

はほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

本申請研究は腹膜線維症・硬化症進展において重要とされている PTN と CTGF を標的とする miRNA の意義を検討することを目的とした。また、*Ctgf* ノックアウトマウスは新生児期に死亡するため、これまで成体における解析が困難であったが、申請者らが作製した *Ctgf* floxed マウスを用いることで、タモキシフェン誘導性に全身的に CTGF を欠損させることが可能となり、このマウスにおける腹膜線維化と miRNA の変化を検討する。

3. 研究の方法

(1) PTN および CTGF を標的とする miRNA のマウス腹膜組織における発現と機能解析

10 週齢の C57BL/6J マウスに 0.1% chlorhexidine gluconate (CG)/15% エタノール・85% PBS を 0.3ml 週 3 回 4 週間投与し、腹膜線維症マウスを作製する。コントロールとして 10 週齢の PBS 投与野生型マウスを使用する。腹膜線維症モデルマウスの前腹壁組織より miRNA を抽出する。miRNA を逆転写し、miR-26a, 30c, 590-3p 発現を real-time PCR 法により定量する。*Ptn* KO マウスは腹膜線維症が軽減することはすでに報告したが、miRNA を中心としてその分子機序解明を行う。

(2) 培養中皮細胞における miRNA の発現と作用の検討

ヒト培養中皮細胞 MeT5A に TGF- 1 10 ng/ml, Angiotensin II 10^{-6} M, PDGF-BB 50 ng/ml となるように添加し、その 24 時間後に細胞を回収し、miR-26a, 30c, 590-3p miRNA 発現を定量する。次に miRNA mimic, を培養中皮細胞に遺伝子導入し、標的遺伝子発現変化を Western blot により検討する。

(3) CTGF コンディショナルノックアウトマウスを用いた腹膜線維症における

CTGF の意義の解明と miRNA との関連性の解析。

申請者らは *Ctgf* floxed マウスをすでに作製しており、RosaCreER^{T2} マウスとの交配によりタモキシフェン投与により全身的に CTGF を 80~90% 欠損させることが可能である。タモキシフェン投与は経口投与を行う。この CTGF コンディショナルノックアウトマウスに、CG を投与し腹膜線維症に及ぼす影響について検討する。

4. 研究成果

(1) PTN および CTGF を標的とする miRNA のマウス腹膜組織における発現と機能解析

Chlorhexidine gluconate (CG) による腹膜線維症の解析から CTGF を標的とする miR-26a と miR-30c、VEGF を標的とする miR-93、TGF- β を標的とする miR-744、PTN を標的とする miR-590-3p に着目した。CG 投与 1,2,3,4 週後の腹膜組織内の microRNA を解析した。miR-26a は CG 投与 2 週後に 2.2 倍に、miR-30c は投与 2 週後に 1.5 倍に有意な増加を認め、CG 投与 3,4 週後も有意な増加を示した。miR-93 は CG 投与 2 週後より発現増加を認め、投与 3,4 週後さらに増加し、4 週後は 5.0 倍に増加した。一方、miR-590 と miR-744 は発現変化しなかった。

(2) 培養中皮細胞における miRNA の発現と作用の検討

ヒト中皮細胞株 MeT5A に PDGF-BB 50 ng/ml, Angiotensin II 10^{-6} M, TGF- β 1 10 ng/ml を添加し 24 時間後の miRNA 発現を解析した。miR-26a は PDGF-BB もしくは Angiotensin II 刺激において、1.8 倍に増加した。miR-30c は PDGF-BB 刺激により 1.9 倍、Angiotensin II 刺激により 2.4 倍に発現が亢進した。miR-93 はいずれの刺激においても上昇する傾向を認めるものの、有意な上昇を認めなかった。miR-744 は PDGF-BB、Angiotensin II および TGF- β 1 刺激により

いずれも 1.6 倍の発現上昇を認めた。

(3) CTGF コンディショナルノックアウトマウスを用いた腹膜線維症における CTGF の意義の解明と miRNA との関連性の解析

タモキシフェン誘導性全身性 *Ctgf* ノックアウトマウスを作製し、タモキシフェンを経口投与したところ、*Ctgf* 発現は 90% 低下した。この状況で、Chlorhexidine gluconate を投与し、腹膜線維症を惹起したところ、中皮下組織厚が減少し、CTGF が腹膜線維症に関与する因子であることを示した。

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3件)

1. Kuwabara T, Mori K, Kasahara M, Yokoi H, Imamaki H, Ishii A, Koga K, Sugawara A, Yasuno S, Ueshima K, Morikawa T, Konishi Y, Imanishi M, Nishiyama A, Nakao K, Mukoyama M. Predictive significance of kidney myeloid-related protein 8 expression in patients with obesity- or type 2 diabetes-associated kidney diseases. *PLoS One* 9:e88942, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0088942.
2. Kasahara M, Nakagawa T, Yokoi H, Kuwabara T, Yasuno S, Mori K, Mukoyama M, Ueshima K. Do statin play a role in renoprotection? *Clin Exp Nephrol* 18:282-285, 2014. doi: 10.1007/s10157-013-0928-z.
3. Koga K, Yokoi H, Mori K, Kasahara M, Kuwabara T, Imamaki H, Ishii A, Mori KP, Kato Y, Ohno S, Toda N, Saleem MA, Sugawara A, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M. MicroRNA-26a inhibits TGF- β -induced extracellular matrix

protein expression in podocytes by targeting *CTGF* and is downregulated in diabetic nephropathy. *Diabetologia* 58:2169-2180, 2015. doi: 10.1007/s00125-015-3642-4.

〔学会発表〕(計4件)

1. Koga K, Mukoyama M, Yokoi H, Mori K, Kasahara M, Kuwabara T, Imamaki H, Ishii A, Mori P. M, Kato Y, Ohno S, Toda N, Saleem A. M, Sugawara A, Nakao K. microRNA-26a attenuates TGF- β -induced extracellular matrix production by inhibiting CTGF and Smad2 in diabetic nephropathy. World Congress of Nephrology WCN 2013 年6月1日, Hong-Kong
2. Koga K, Yokoi H, Kasahara M, Mori K, Kuwabara T, Imamaki H, Sugawara A, Matsusaka T, Nakao K, Yanagita M, Mukoyama M. microRNA-26a attenuates TGF- β -induced extracellular matrix production by inhibiting CTGF and Smad2 in diabetic nephropathy. Annual meeting of American Society of Nephrology. 2014年11月13日-11月15日、Philadelphia, USA.
3. 横井秀基、戸田尚宏、笠原正登、柳田素子、遺伝子改変動物を用いた腹膜線維症進展機序の解明、第21回日本腹膜透析医学会学術集会、2015年11月28日、仙台
4. Toda N, Yokoi H, Kasahara M, Mori K, Ishii A, Yanagita M, Mukoyama M. Deficiency of CTGF ameliorates peritoneal fibrosis in mice. 16th congress of International Society of Peritoneal Dialysis. 2016年2月28日、Melbourne, Australia.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

京都大学腎臓内科

<http://www.kidney.kuhp.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

笠原 正登 (KASAHARA MASATO)

奈良県立医科大学・医学部・病院教授

研究者番号：50393351

(2)研究分担者

横井 秀基 (YOKOI HIDEKI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90378779

(3)連携研究者

()

研究者番号：