

論 文 要 旨

学 位 論 文

表 題 急性腎障害を調節するマイクロ RNA の解析
—新規遺伝子治療法およびバイオマーカーへの応用—

申 請 者 氏 名 青松 昭徳

担当指導教員氏名 森下 義幸 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
専攻 地域医療学系
専攻分野 総合医学
専攻科 内科系総合医学

論 文 要 旨

氏名 青松 昭徳

表題

急性腎障害を調節するマイクロ RNA の解析 —新規遺伝子治療法およびバイオマーカーへの応用—

1 研究目的

急性腎障害 (acute kidney injury: AKI) は腎機能が急激に低下する重篤な病態であり、全入院患者の 20%に発症し患者死亡の大きなリスクである。AKI は脱水、感染、外科手術による腎血流低下、薬剤による尿細管障害、腫瘍や結石による尿路閉塞など様々な原因で発症し生命予後を悪化させている。AKI の予後改善のためには早期診断、早期治療介入が重要である。しかし、AKI に特異的な治療法および早期診断を可能にするバイオマーカーは未だ確立されていない。近年、特異的治療法や早期診断法がなかった分野で、マイクロ RNA(miRNA)の有用性が注目されている。miRNA は細胞に内在する、21-25 塩基長のタンパク質を作らないノンコーディングスモール RNA で標的メッセンジャーRNA の発現を調節している。現在、miRNA は人を含む哺乳類で 2,500 種類程度あることがわかっており、その塩基配列はだれでも自由にアクセスできる公共のデータベース (データベース名 : miRBase など) に登録されている。miRNA は血液・尿にも安定して存在し疾患早期から発現変化すること、外因性に miRNA-mimic/inhibitor を投与し生体内発現を変化させ得ること、ヒトとマウスなどの動物でほぼ同じ塩基配列であり動物実験の結果をヒトに応用させやすいことから、治療ターゲットとしての有用性が報告され、すでに癌や炎症疾患分野で臨床応用が検討されている。このことから AKI の診断バイオマーカーおよび遺伝子治療の標的として有用な miRNA も存在するはずであるが未だ同定されておらず、本研究では AKI 腎臓で発現が変化する miRNA を網羅的に同定し、新規遺伝子治療法、バイオマーカー開発に応用することを目的にした。

2 研究方法

機序の異なる 2 種類の AKI モデルマウス (虚血再灌流モデル : IRI-AKI モデル、敗血症モデル : リポポリサッカライド(LPS)-AKI モデル) を作成し、腎臓で発現変化する miRNA をマイクロアレイ法による網羅的解析で同定した。同定した miRNA を AKI 患者 (30 例) の血清で qRT-PCR 法で測定し健常人と比較した。さらに人工合成した miRNA-5100 の mimic を Non-viral キャリア: polyethylenimine nanoparticle (PEI-NPs) と N/P ratio 6 で複合体 (miRNA-5100-mimic-PEI-NPs) を作成し、IRI-AKI マウスに尾静脈より単回投与で腎にデリバリーし、miRNA-5100 を腎臓で過剰発現させ、AKI の抑制効果を検討した。

3 研究成果

両モデルマウスの腎臓で共通して発現変化している miRNA を 36 種類選出した。そのうちヒトで発現報告のある 17 種類の miRNA を両モデルともに qRT-PCR を行い発現変化を確かめた。両モデルで統計学的有意差を持って変化していたのは、6 種類の miRNA(miRNA-21a-5p, miRNA-29b-1-5p, miRNA-132-3p, miRNA-212-3p, miRNA-223-3p, miRNA-5100)であった。そのうち 5 種類(miRNA-21a-5p, miRNA-29b-1-5p, miRNA-132-3p, miRNA-212-3p, miRNA-223-3p)は過去の AKI での役割がある程度報告されているため、本研究では過去に報告のない miRNA-5100 について検証した。IRI-AKI マウスに miR-5100-mimic-PEI-NPs を AKI を誘導する 2 日前に予防薬として尾静脈投与したところ miRNA-5100 は腎臓で過剰発現され、組織学的、尿細管間質細胞障害マーカー(NGAL,KIM-1)などで AKI の抑制効果を認めた。miRNA-5100 の効果の機序を調べる目的での遺伝子マイクロアレイで IRI-AKI において miRNA-5100 を過剰発現させると、IRI+無治療群と比較して、53 種類の遺伝子が 4 倍以上、82 種類の mRNA が 4 倍以下に統計学的有意差をもって変化していた。それらの遺伝子のなかで miRNA-5100 の過剰発現は、アポトーシスシグナル伝達経路を含む 29 種類の mRNA と炎症シグナル伝達経路を含む 10 種類の mRNA の発現を変化させ AKI でアポトーシスと炎症を複数のパスウェイから抑制することで AKI 進展を抑制していることが明らかになった。さらに、別の実験系で miRNA-5100-mimic-PEI-NPs を AKI を誘導後 1 時間後に尾静脈から治療薬として投与したところ、miRNA-5100 は腎臓で過剰発現され、AKI の改善効果を認めた。

また qRT-PCT 法で測定したところ AKI 患者 (30 例) では、健常人(30 例)において miRNA-5100 の血清での発現量が有意に低下(AKI 患者 : 0.11 ± 0.07 vs 健常人 ; 1.05 ± 1.12 , $p < 0.01$)していた。

4 考察

本実験結果から、miRNA-5100 は AKI の進展調節に関与しており AKI の新規治療薬となる可能性は明らかになった。また血清 miRNA-5100 発現レベルは AKI のバイオマーカーとなる可能性がある。いくつかの以前の研究では、in vitro および in vivo で AKI の miRNA を用いた治療薬としての可能性の報告があるが、miRNA-5100 についての報告は本研究が初めてである。本研究では 2 つの異なる AKI モデルを用いて共通に変化する miRNA をスクリーニングすることで、AKI、マウスのバックグラウンドおよび手術手技などの影響を軽減した。この研究では、in vivo で腎での miRNA-5100 を過剰発現させるために、miRNA-5100 を投与する際の非ウイルス性キャリアとして、ポリカチオンである polyethyleneimine-nanoparticles (PEI-NPs)を用いた。IRI-AKI マウス miRNA 5100-mimic-PEI-NPs 投与により、腎で miRNA-5100 は過剰発現され、腎尿細管の組織学的損傷と腎機能障害 (BUN、serum creatinine、NGAL および KIM-1) を抑制した。その機序としてアポトーシスおよび炎症を複数のパスウェイで抑制することが明らかになった。またこれまでの過去の報告では AKI を起こす前に microRNA-mimic/inhibitor を投与し AKI への効果を検証していたが、本研究では AKI を起こす前、別実験で AKI を起こしたあとに miRNA 5100-mimic-PEI-NPs を投与し、いずれも AKI の改善効果を認めた。本結果から、miRNA 5100-mimic は AKI の予防薬および治

(甲種)

療薬として有効であることが明らかになった。

さらにまた AKI 患者では、健常人において miRNA-5100 の血清での発現量が有意に低下していたことから、血清 miRNA-5100 は AKI のバイオマーカーとなる可能性が示唆され、今後症例数を増やして検証する必要がある。

5 結論

miRNA-5100 は急性腎障害の新規遺伝子治療法およびバイオマーカーとなる可能性がある。