

表題：糖尿病性腎症に關与する microRNA の同定
-新規遺伝子治療法・バイオマーカー開発-

論文の区分：博士課程

著者名：石井洋輝

担当指導教員氏名：森下義幸

所属：自治医科大学大学院医学研究科博士課程
地域医療学総合医学内科系総合医学

令和3年1月8日申請の学位論文

目次

1. 緒言

2. 材料と方法

3. 結果

- 1) 糖尿病モデルマウスの腎臓における miRNA のプロファイリング
- 2) 腎疾患モデルマウスにおける miRNA 発現評価
- 3) db/db マウスの腎臓への miRNA-mimic の送達
- 4) miRNA-181b-5p の糖尿病性腎症の治療効果
- 5) miRNA-181b-5p の糖尿病性腎症における機序
- 6) miRNA-125b-5p の糖尿病性腎症の治療効果
- 7) 糖尿病性腎症の診断バイオマーカーとしての miRNA-125b-5p と miRNA-181b-5p の有用性

4. 考察

5. 結論

6. 引用文献

1. 緒言

糖尿病性腎症は、糖尿病の主要な合併症であり、末期腎疾患の主要な原因である¹。糖尿病性腎症の有病率は世界的にも急速に増大しており、経済的・社会的負担も大きい²。また、糖尿病性腎症は脳卒中や心筋虚血などの様々な血管合併症の発症と強く関連している³。

この原因として、糖尿病性腎症には特異的な診断バイオマーカーや治療薬がないことが関与している。現在、糖尿病性腎症の診断には推定糸球体濾過率 (eGFR) とアルブミン尿がその診断と病期分類に使用されているが、これらは糖尿病性腎症特有のものではなく、ほぼすべての腎疾患で共通して見られる検査異常である⁴。したがって、糖尿病性腎症の確定診断には、腎生検による組織学的診断が必要である。しかし、腎生検は侵襲的であるため実施が容易ではなく、繰り返し実施にも適していない。この問題を解決するため糖尿病性腎症のバイオマーカーの開発が進められており、尿中コラーゲン IV、尿中コラーゲン VI の COOH 末端プロペプチド、血清腫瘍壊死因子受容体 1/2 など、いくつかの分子が糖尿病性腎症のバイオマーカーとして有用性を期待されているが、実臨床での有用性はいまだ確立されていない⁵⁻¹⁰。糖尿病性腎症の治療については、レニン-アンジオテンシン系阻害薬、ナトリウム-グルコースコトランスポーター2 阻害薬、グルカゴン様ペプチド-1 アナログなど、いくつかの薬剤で進展抑制効果を示すことが示されているが、いずれも腎機能を著明に改善させることはできず糖尿病性腎症の治療には広大な残余スペースが存在している状態である¹¹⁻¹³。したがって、糖尿病性腎症のバイオマーカーと治療薬の開発は腎臓病領域において喫緊の課題である。

microRNA(miRNA)は、がんや特定の炎症性疾患など分野で疾患特異的なバイオマーカーや治療ターゲットとしての有用性が注目されており、一部では臨床での実用化も開始されている¹⁴⁻¹⁵。miRNA は、約 22 塩基のノンコーディング RNA であり、messenger RNA(mRNA)の分解や翻訳抑制を誘導することで、標的遺伝子やその由来タンパク質の転写後制御因子として作用する¹⁶⁻¹⁷。miRNA は、すべてのタンパク質発現レベルの 60%以上の調節に関与していると考えられており、様々な疾患の病態生理過程において極めて重要かつ多様な役割を果たしている¹⁸。

糖尿病性腎症でも過去の先行研究で、いくつかの miRNA が糖尿病性腎症の病態に関与しており、糖尿病性腎症のバイオマーカーや治療標的として有用である可能性が示唆されているが、生体内での役割など臨床での有用性について明らかでないことも多い¹⁹⁻²⁰。このことより、さらに糖尿病性腎症を調整する miRNA を同定し、バイオマーカーや治療標的としての臨床学的有用性や生体内での機序を検討する研究が必要である。本研究では、糖尿病性腎症に関与する

miRNA を網羅的に検討し、糖尿病性腎症に特異性の高いバイオマーカーおよび治療薬としての可能性を検討した。

2. 材料と方法

実験動物

db/db マウス (C57BLKS/J Iar ⁻+Lepr^{db}/+Lepr^{db}) とコントロールマウス (C57BLKS/J Iar ⁻m+/m+) を動物繁殖研究所 (Ibaraki, Japan) より購入した。AKITA マウス (C57BL/6-Ins2^{Akita}/J mice) とコントロールマウス (C57BL/6J) は日本エスエルシー株式会社 (Shizuoka, Japan) より購入した。腎虚血再灌流は過去に報告されている方法に従って実施した²¹。片側尿管結紮は過去に報告されている方法に従って実施した²²。SAMP マウス (SAMP1/YitFcsJ) とそのコントロールマウス (SAMR/YitFcsJ) は日本エスエルシー株式会社 (Shizuoka, Japan) より購入した²³。HIGA マウス (HIGA/NscSlc) とコントロールマウス (BALB/cCrSlc mice) は日本エスエルシー株式会社 (Shizuoka, Japan) より購入した。

マウスは温度と湿度の調節された室内で 12 時間の明暗周期で飼育を行った。マウスの腎臓と血清は採取後 -80°C で保存した。左腎臓は組織学的分析に使用し、右腎臓は miRNA および mRNA の定量に使用した。24 時間蓄尿をおこなう際には、各マウスを個々の代謝ケージに移して実施した。尿中アルブミンおよび尿中クレアチニン濃度は、LBIS Mouse Urinary Albumin Assay (S-type) (Fujifilm Wako, Osaka, Japan) と LabAssay Creatinine (Fujifilm Wako, Osaka, Japan) に外注し測定した。

患者選択

2016 年 5 月から 2019 年 5 月に自治医科大学附属さいたま医療センター腎臓内科で腎生検を受けた腎臓病患者を対象とした。腎生検で組織学的に糖尿病性腎症と診断した 25 名、および糖尿病性腎症以外の腎疾患と診断した 241 名の中から、傾向スコアにより糖尿病性腎症患者と患者背景の近い 50 名 (IgA 腎症 17 人、膜性腎症 9 人、微小変化型ネフローゼ症候群 6 人、腎硬化症 4 人、間質性腎炎 3 人、IgG4 関連腎症 3 人、ループス腎炎 2 人、その他の腎疾患 6 人) を選出した。全ての腎生検症例は自治医科大学附属さいたま医療センター複数の病理医によって診断された。糖尿病性腎症は、メサンギウム拡大および基質増加、メサンギウム融解・微小血管瘤、結節性病変 (結節性硬化)、糸球体基底膜二重化・内皮下腔開大、滲出性病変等の所見により診断された²⁴。eGFR は日本腎臓学会が推奨している以下の計算式により算出した^{25,26}。eGFR (ml / min / 1.73m²) = 194 × 年齢^{-0.28} × 血清クレアチニン濃度^{-1.094} (× 0.739 女性の場合)。

マイクロアレイ解析

miRNA 発現のマイクロアレイ解析は、北海道システムサイエンス株式会社 (Hokkaido, Japan) に外注した。マイクロアレイ解析は過去に報告されている下記方法に従って実施した²⁷。まず NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) を使用し、Nucleic Acid 測定モードにて RNA の濃度・純度を測定した。さらに Agilent 2100 BioAnalyzer を使用し、RNA の濃度と品質を確認した。次に miRNA Complete Labeling Reagent and Hyb Kit (Agilent Technologies)、miRNA Spike In Kit (Agilent Technologies) を使用し、RNA の脱リン酸化と Cy3-pCp のライゲーションを行った。次に miRNA Complete Labeling Reagent and Hyb Kit (Agilent Technologies) を使用し、ハイブリダイゼーションを行った。その後、Gene Expression Wash Pack (Agilent Technologies) を使用しスライドガラスを洗浄後、Agilent Microarray Scanner (G2505C) にてスライドスキャンし、Agilent Feature Extraction ver.12.0.3.1 を用いて各スポットのシグナル強度の数値化を行った。

同様に、遺伝子発現のマイクロアレイ解析についても北海道システムサイエンス株式会社に外注した。方法は下記の通りである。まず NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) を使用し、Nucleic Acid 測定モードにて RNA の濃度・純度を測定した。さらに Agilent 2100 BioAnalyzer を使用し、RNA の濃度と品質を確認した。次に Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies) を使用し、ラベル化 cRNA を合成し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN, California, USA) を使用し、ラベル化 cRNA を精製した。次に NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) を使用し、MicroArray 測定モードにて cRNA 濃度、蛍光色素濃度を測定した。さらに Agilent 2100 BioAnalyzer を使用し、cRNA の品質を確認した。次に Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies) を使用し、ハイブリダイゼーションを行った後、Gene Expression Wash Pack (Agilent Technologies) を使用しスライドガラスの洗浄後、Agilent Microarray Scanner (G2505C) にてスライドスキャンを実行し、Agilent Feature Extraction ver.12.0.3.1 を用いて各ウェルのシグナル強度の数値化を行った。

また正常マウス群、db/db マウス + 未処置群、db/db マウス + miRNA-181b-5p-mimic-PEI-NPs 投与群、db/db マウス + control-miRNA-PEI-NPs 投与群で WikiPathway に登録されている既存のパスウェイの中から各群で4倍以上の発現変化を示す遺伝子を網羅的探索し、各群のパスウェイ変化解析をおこなった。

Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR): 定量的逆転写 PCR

ガラスホモジナイザーとフィルターカラム破砕機 (QIA Shredder; Qiagen) を使用し腎臓組織サンプルを粉砕し、miRNeasy Mini Kit (Qiagen) を使用して RNA を

抽出した。miRScript PCR System (Qiagen)を使用して各 RNA サンプル 1 μ g を cDNA に逆転写した。次に、miScript SYBR Green PCR Kit と、miRNA-20a-5p、miRNA-34a-5p、miRNA-125b-5p、miRNA-129-1-3p、miRNA-129b-5p、miRNA-142a-3p、miRNA-142a-5p、miRNA-146a-5p、miRNA-181b-5p、miRNA-223-3p、miRNA-342-3p、miRNA-455-5p、miRNA-652-3p、miRNA-6401、および miRNA-6980-5p に対するプライマーを用いて qRT-PCR を行った。各プライマー (miScript Primer Assays)は Qiagen から購入した。miRNA の発現量は U6-snuRNA を内因性コントロール miRNA としてデルタ・デルタ C T法を用いて発現量補正を行った²⁸。

ヒトおよびマウスの血清中の miRNA レベルを測定するために、NucleoSpin miRNA Plasma (Macherey-Nagel, Düren, Germany)および miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen)を使用して、血清から RNA を抽出した。次に、miScript II RT Kit (Qiagen)を使用して、単離した RNA を cDNA に逆転写した。qRT-PCR は、miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen)を使用した。miRNA-20a-5p、miRNA-34a-5p、miRNA-125b-5p、miRNA-129-1-3p、miRNA-1129b-5p、miRNA-142a-3p、miRNA-142a-5p、miRNA-146a-5p、miRNA-181b-5p、miRNA-223-3p、miRNA-342-3p、miRNA-455-5p、miRNA-652-3p、miRNA-6401、miRNA-6980-5p の各プライマー (miScript Primer Assays)は Qiagen から購入した。miRNA の発現量は miRNA-16 を内因性コントロール miRNA としてデルタ・デルタ C T法を用いて発現量補正を行った²⁸⁻²⁹。

mRNA 発現量を測定するために、ガラスホモジナイザーとフィルターカラム破砕機 (QIA Shredder; Qiagen)を使用して腎臓サンプルを粉砕した。RNeasy Mini Kit (Qiagen)を使用して RNA を抽出し、Superscript III First-strand Synthesis system (Thermo Fisher Scientific)を使用して各 RNA サンプル 1 μ g を逆転写し cDNA を合成した。qRT-PCR は、SYBR GreenER qPCR SuperMix (Thermo Fisher Scientific)を使用して実施した。collagen1A1, collagen4A1 のプライマーは、タカラバイオ株式会社 (Shiga, Japan)から購入した。各標的 mRNA の発現量は beta-actin を内因性コントロール miRNA としてデルタ・デルタ C T法を用いて発現量補正を行った³⁰。

miRNA-181b-5p mimic 作成

miRNA-181b-5p-mimic と non target-miRNA-mimic (control-miRNA-mimic)は、ジーンデザイン (Osaka, Japan)に作成を依頼した。miRNA-181b-5p-mimic の配列は 5'-AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGUU-3'であり、control-miRNA-mimic の配列は 5'-GGUUCGUACGUACACUGUUCA-3'である。

miRNA-181b-5p-PEI-NP 投与

miRNA-181b-5p-mimic の効果を調べるためにポリエチレンイミン (in vivo jet PEI; PolyPlus-transfections)を過去に報告されている方法に従って投与した³¹。miRNA-PEI-NP (miRNA : 50 μ g、ポリマー中の窒素 (N)と核酸中のリン酸塩 (P)比率=6)を 200 μ L の 5%グルコース溶液に溶解し、db/db マウスに尾静脈投与した。コントロール群として以下の 3 群を設定した：(1)コントロールマウス (m / m)、(2)未処置の db/db マウス、(3)同じプロトコルを使用して control-miRNA-PEI-NP を db/db マウスに尾静脈投与した。miRNA-181b-5p-PEI-NP または control-miRNA-PEI-NP は 10 週齢の db/db マウスへ週 1 回 10 週間 (20 週齢まで) 投与した。20 週齢にマウスを解剖して解析した。

組織学、蛍光免疫染色、および免疫組織化学

マウスに PBS を灌流後、腎臓を摘出し 4%paraformaldehyde で固定しパラフィンに包埋した。免疫染色、PAS 染色には 5 μ m の切片を使用した。

メサングウム領域評価には、過去の報告に従って PAS 染色切片で糖尿病合併症の動物モデル (AMDCC)プロトコルに従ってメサングウム指数(MI)を計算することにより評価した(<https://www.diacomp.org/shared/protocols.aspx>)。MI は PAS 染色陽性の総面積 / 糸球体面積で計算し、無作為に選択した 20 個の糸球体について計測した³²。

尾静脈より投与した miRNA-PEI-NP の腎臓での分布を評価するために過去の報告に従い³¹、Label IT RNAi Delivery Control, Cy3; (Mirus BiO, Wisconsin, USA) を用いて以下のように評価した³¹。Cy3 標識短鎖二本鎖 RNA と PEI-NP で複合体を形成させ、db/db マウスに尾静脈注射し 1 時間後に腎臓を摘出した。4% paraformaldehyde で固定を行い、Tissue-Tek® optimal cutting temperature (OCT) compound((サクラファインテックジャパン株式会社, Tokyo, Japan)に包埋し、液体窒素で凍結した。厚さ 5 μ m の腎臓切片をフルオレセイン標識レクチン(Vector Laboratories, California, USA)とともに室温で 2 時間インキュベートし、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)を用いて核染色を行った。蛍光顕微鏡(BZ-X710; KEYENCE, Osaka, Japan)を用いて蛍光部位を観察撮像し、画像解析ソフト BZ-X_Analyzer (KEYENCE)を使用して評価した。

免疫組織染色では 1 次抗体として collagen I 抗体(NB600-408; Novus Biologicals, Colorado, USA)および collagen IV 抗体(NB120-6586; Novus Biologicals)を使用し、2 次抗体として抗ウサギ IgG(H+L)ヤギポリクローナル抗体(PI-1000; Vector Laboratories)を使用した。

miRNA In situ ハイブリダイゼーション

miRNA-125b-5p および miRNA-181b-5p の In situ ハイブリダイゼーション

を、ジゴキシゲニン標識 miRCURY LNA Detection LNA miRCURY プローブ (mmu-miR-125b-5p: miRCURY LNA miRNA Detection probe: modification, 5'-DIG and 3'-DIG: 5'UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA. mmu-miR-181b-5p: miRCURY LNA miRNA Detection probe: modification, 5'-DIG and 3'-DIG: 5'AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU) (Qiagen)を使用して実施した。スクランブルプローブはネガティブコントロールとして、U6 はポジティブコントロールとして使用した。以下のプロトコルに従って実施した³³。パラフィン包埋マウス腎臓切片(5 μ m)を脱パラフィンし、PBS で洗浄し、プロテイナーゼ K で 37°C 10 分間処理した。次に、スライドを LNA-ジゴキシゲニン標識プローブ(40 nM)とともに、60°Cで一晩インキュベートした。洗浄後、切片をアルカリホスファターゼに結合した抗ジゴキシゲニン抗体とともに 4°Cで一晩インキュベートした。5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)と Nitro Blue Tetrazolium (NBT)の混合液 (Thermo Fisher Scientific)を使用して、暗所、室温で一晩現像した。検体は光学顕微鏡(BZ-X710; KEYENCE)を用いて撮影した。

統計学的検査

データは、JMP ソフトウェア(バージョン 13.0.0; SAS Institute Inc, North Carolina, USA)を使用して分析した。結果は平均 \pm SD で表示した。分散分析(ANOVA)を使用して平均を比較し、ANOVA で群間に統計学的に有意差が認められた場合、post hoc 分析として Tukey's test を行った。カテゴリ変数については、カイ二乗検定を使用して差異を分析した。またロジスティック回帰を実行し、ROC 曲線の AUC を計算して、さまざまなパラメーター分類を評価した。P<0.05 を統計学的有意差ありとした。

3. 結果

1) 糖尿病性腎症モデルマウスの腎臓における miRNA のプロファイリング

36 週齢の C57BL / 6-Ins2Akita / J マウス(AKITA マウス)および 28 週齢の C57BLKS / J Iar- + Lepr^{db} / + Lepr^{db}(db/db マウス)の腎臓のマイクロアレイ分析を行い、糖尿病性腎症で変化する miRNA をスクリーニング選出した。各々1,882 種類の miRNA の発現変化を網羅的に解析し、そのうち 50 個の miRNA が AKITA (n=4)およびコントロール (n=4)マウスの腎臓で統計的に有意差を示した(表 1、図 1)。同様に db/db マウス (n=4)およびコントロールマウス (n=4)の腎臓で解析し、87 個の miRNA が統計的に有意差を示した (表 2、図 2)。これらのうち 15 個の miRNA(miRNA-20a-5p、miRNA-34a-5p、miRNA-125b-5p、miRNA-129-1-3p、miRNA-129b-5p、miRNA-142a-3p、miRNA-142a-5p、miRNA-146a-5p、miRNA-181b-

5p、miRNA-223-3p、miRNA-342-3p、miRNA-455-5p、miRNA-652-3p、miRNA-6401、および miRNA-6980-5p)は、AKITA マウスと db/db マウスでともにコントロールマウスと比較して有意差を示した。これらの miRNA について、qRT-PCR を用いて解析した結果、6 種類の miRNA (上昇：miRNA-34a-5p、miRNA-129b-1-3p、低下：miRNA-125b-5p、miRNA-142a-3p、miRNA-181b-5p、miRNA-223-3p)が AKITA マウスと db/db マウスで共通して、コントロールマウスと比較し有意差を認めた(図 3)。

図 1：AKITA マウスの腎臓における miRNA 発現のヒートマップ

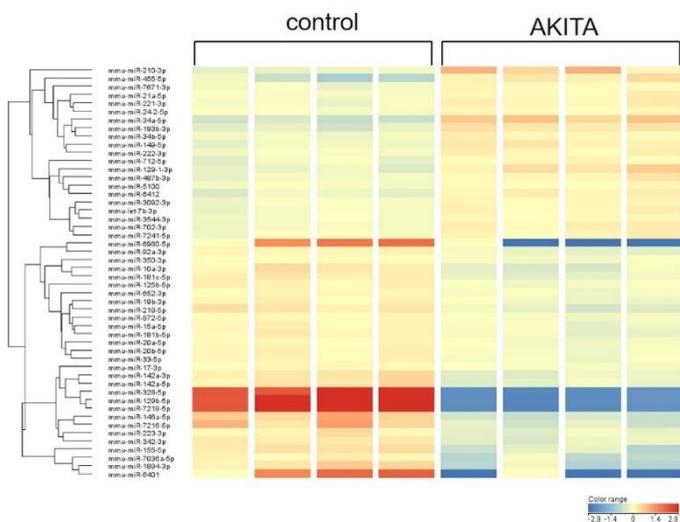


図 2 : db/db マウスの腎臓における miRNA 発現のヒートマップ

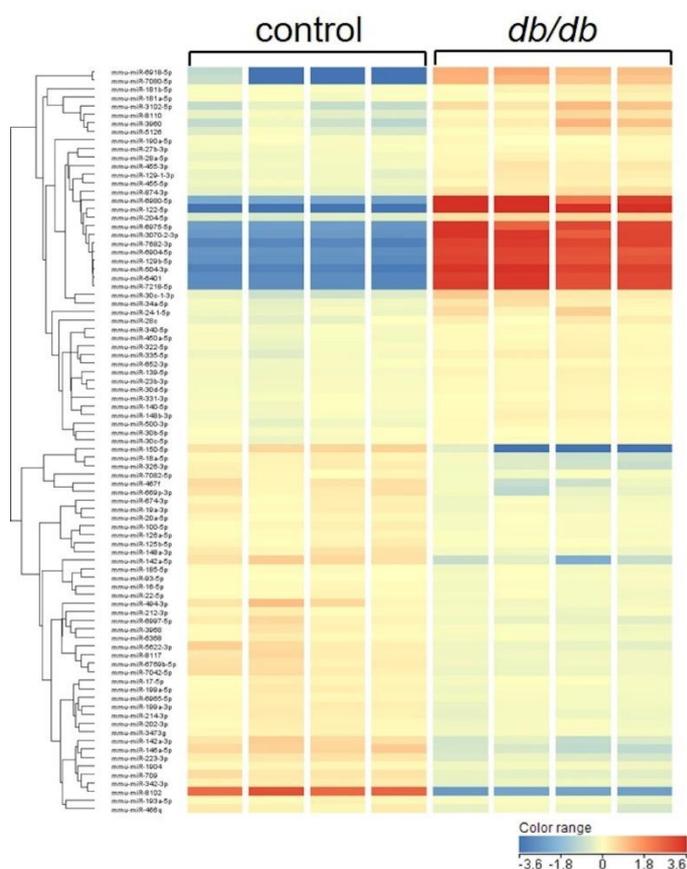


表 1. マイクロアレイ解析において AKITA マウスの腎臓で発現変化した miRNA

microRNA	Sequence	変動倍率 (AKITA mice/control mice)	P- value
miRNA-34a-5p	ACAACCAGCTAAGACACTGC	2.42	<0.01
miRNA-455-5p	CGATGTAGTCCAAAGGCA	1.97	<0.01
miRNA-210-3p	TCAGCCGCTGTCACAC	1.84	<0.01
miRNA-193b-3p	AGCGGGACTTTGTGGGC	1.63	<0.01
miRNA-129-1-3p	ATACTTTTTGGGGTAAGGG	1.59	<0.01
miRNA-6412	TAGTAGCTGAGGATGGTT	1.36	<0.01
miRNA-149-5p	GGGAGTGAAGACACGGAG	1.35	<0.01
miRNA-487b-3p	AAGTGGATGACCCTGTAC	1.25	<0.01
miRNA-712-5p	GGTACCGCCCGGG	1.24	<0.01
miRNA-34b-5p	ACAATCAGCTAATTACTGCC	1.24	<0.01

miRNA-702-3p	GGAGCGGGGTAAAG	1.24	<0.01
miRNA-221-3p	GAAACCCAGCAGACAATGTA	1.23	<0.01
mmu-let-7b-3p	GGGAAGGCAGTAGGTT	1.21	<0.01
miRNA-222-3p	ACCCAGTAGCCAGA	1.19	<0.01
miRNA-7671-3p	GTGGTTCTCCGCCT	1.17	<0.01
miRNA-7241-5p	GGTGGGTATTAACTCATG	1.17	<0.01
miRNA-3092-3p	GGAGGGGAAACAGC	1.17	<0.01
miRNA-21a-5p	TCAACATCAGTCTGATAAGC	1.15	<0.01
miRNA-3544-3p	GGGAACGGCGTCA	1.14	<0.01
miRNA-24-2-5p	ACTGTTTCAGCTCAGTA	1.11	<0.01
miRNA-5100	AGAGGCACCGCTGG	1.11	<0.01
miRNA-350-3p	GAAAGTGTATGGGCTTTGTG	-1.11	<0.01
miRNA-17-3p	CTACAAGTGCCCTCA	-1.12	<0.01
miRNA-872-5p	CCTGAACTAACAAGTAACCT	-1.15	<0.01
miRNA-20a-5p	CTACCTGCACTATAAGCAC	-1.15	<0.01
miRNA-652-3p	CACAACCCTAGTGGCG	-1.16	<0.01
miRNA-33-5p	TGCAATGCAACTACAATGCAC	-1.18	<0.01
miRNA-20b-5p	CTACCTGCACTATGAGCACT	-1.19	<0.01
miRNA-125b-5p	TCACAAGTTAGGGTCTC	-1.20	<0.01
miRNA-19b-3p	TCAGTTTTGCATGGATTTGC	-1.24	<0.01
miRNA-15a-5p	CACAAACCATTATGTGCTGCTA	-1.24	<0.01
miRNA-181b-5p	ACCCACCGACAGCA	-1.30	<0.01
miRNA-92a-3p	CAGGCCGGGACAAGTGC	-1.31	<0.01
miRNA-223-3p	TGGGGTATTTGACAAACTGAC	-1.39	<0.01
miRNA-181c-5p	ACTCACCGACAGGTTGAAT	-1.45	<0.01
miRNA-342-3p	ACGGGTGCGATTTCTGT	-1.49	<0.01
miRNA-142a-5p	AGTAGTGCTTTCTACTTTA	-1.50	<0.01
miRNA-142a-3p	TCCATAAAGTAGGAAACACTACA	-1.54	<0.01
miRNA-10a-3p	TATTCCCCTAGATACGAA	-1.54	<0.01
miRNA-218-5p	ACATGGTTAGATCAAGCACA	-1.58	<0.01
miRNA-7036a-5p	TCTCTTCCCCACCGA	-1.79	<0.01
miRNA-155-5p	ACCCCTATCACAATTAGC	-1.87	<0.01
miRNA-1894-3p	CTCCCTTCACCCTCT	-2.23	<0.01
miRNA-7216-5p	TCTGGGTCTCTGCC	-2.30	<0.01
miRNA-146a-5p	AACCCATGGAATTCAGTTC	-2.46	<0.01
miRNA-6980-5p	CTAACCTAGCCTCCCC	-29.54	<0.01

miRNA-6401	ACCCGACACCACTG	-30.24	<0.01
miRNA-328-5p	CCCTGAGCCCCTC	-40.67	<0.01
miRNA-7219-5p	TCTCAACCCTGAGCTC	-48.90	<0.01
miRNA-129b-5p	GGAAGCCCTTACCCC	-61.03	<0.01

Abbreviation: miRNA, microRNA.

表 2. マイクロアレイ解析において db/db マウスの腎臓で発現変化した miRNA

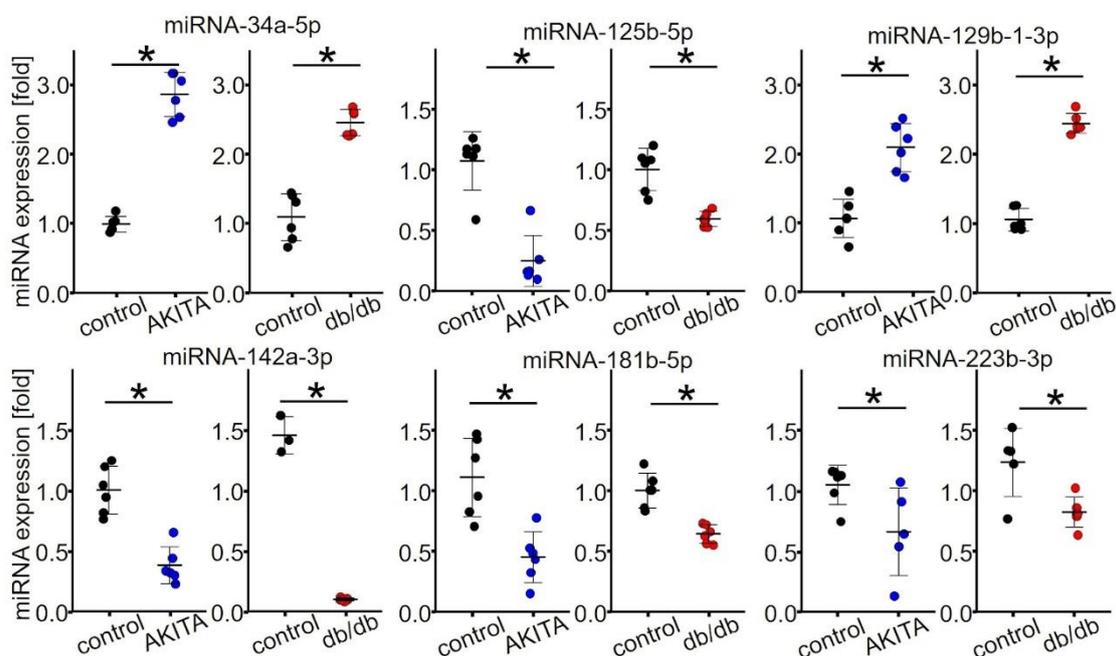
microRNA	Sequence	変動倍率 (<i>db/db</i> mice /control mice)	P- value
miRNA-122-5p	CAAACACCATTGTCACACTC	351.48	<0.01
miRNA-504-3p	GAAACCCTGCCCTG	106.49	<0.01
miRNA-7682-3p	AAAGCCAACCCAACC	89.84	<0.01
miRNA-7218-5p	CCCTCTACTACTAAACCC	80.71	<0.01
miRNA-6401	ACCCGACACCACTG	80.08	<0.01
miRNA-129b-5p	GGAAGCCCTTACCCC	65.07	<0.01
miRNA-3070-2-3p	TCTACCCCTGACCATAG	64.78	<0.01
miRNA-6904-5p	CCACTCAACTCTAACCC	60.34	<0.01
miRNA-6918-5p	AGAACCTAATCCCGTCC	58.84	<0.01
miRNA-6975-5p	TGCCAAACCCCTTTC	54.44	<0.01
miRNA-6980-5p	CTAACCTAGCCTCCCC	49.34	<0.01
miRNA-7080-5p	CCAAACCCACCTCC	44.93	<0.01
miRNA-3102-5p	CAGCCCCACCCTG	2.93	<0.01
miRNA-3960	CCCCGCCTCCG	2.73	<0.01
miRNA-30c-1-3p	GGAGTAAACAACCCTCTCC	2.16	<0.01
miRNA-204-5p	AGGCATAGGATGACAAAGGG	2.00	<0.01
miRNA-874-3p	TCGGTCCCTCGGG	1.67	<0.01
miRNA-5126	CCCCGCCCCCG	1.66	<0.01
miRNA-8110	CCCCCCCCCA	1.58	<0.01
miRNA-24-1-5p	ACTGATATCAGCTCAGTAGGC	1.56	<0.01
miRNA-34a-5p	ACAACCAGCTAAGACACTGC	1.51	<0.01
miRNA-129-1-3p	ATACTTTTTGGGGTAAGGG	1.48	<0.01
miRNA-28c	TCAATAGACTGTGAGCTC	1.42	<0.01
miRNA-335-5p	ACATTTTTCGTTATTGCTC	1.38	<0.01
miRNA-455-3p	GTGTATATGCCCGTGG	1.38	<0.01
miRNA-455-5p	CGATGTAGTCCAAAGGCA	1.31	<0.01

miRNA-28a-5p	CTCAATAGACTGTGAGCTCC	1.29	<0.01
miRNA-139-5p	CTGGAGACACGTGCACT	1.28	<0.01
miRNA-500-3p	TGAACCCTTGCCCAGG	1.26	<0.01
miRNA-322-5p	TCCAAAACATGAATTGCTGCTG	1.24	<0.01
miRNA-148b-3p	ACAAAGTTCTGTGATGCAC	1.24	<0.01
miRNA-23b-3p	GGTAATCCCTGGCAATG	1.21	<0.01
miRNA-181b-5p	ACCCACCGACAGCA	1.20	<0.01
miRNA-30d-5p	CTTCCAGTCGGGGA	1.19	<0.01
miRNA-450a-5p	ATATTAGGAACACATCGCAA	1.19	<0.01
miRNA-340-5p	AATCAGTCTCATTGCTTTA	1.16	<0.01
miRNA-140-5p	CTACCATAGGGTAAAACCACT	1.16	<0.01
miRNA-30c-5p	GCTGAGAGTGTAGGATGT	1.16	<0.01
miRNA-652-3p	CACAACCCTAGTGGCG	1.15	<0.01
miRNA-181a-5p	ACTCACCGACAGCG	1.14	<0.01
miRNA-27b-3p	GCAGAACTTAGCCACTG	1.14	<0.01
miRNA-190a-5p	ACCTAATATATCAAACATATCA	1.11	<0.01
miRNA-331-3p	TTCTAGGATAGGCCAGGG	1.11	<0.01
miRNA-30b-5p	AGCTGAGTGTAGGATGT	1.10	<0.01
miRNA-93-5p	CTACCTGCACGAACAG	-1.08	<0.01
miRNA-185-5p	TCAGGAACTGCCTTTCT	-1.14	<0.01
miRNA-126a-5p	CGCGTACCAAAGTAATAATG	-1.15	<0.01
miRNA-20a-5p	CTACCTGCACTATAAGCAC	-1.15	<0.01
miRNA-125b-5p	TCACAAGTTAGGGTCTC	-1.16	<0.01
miRNA-22-5p	TAAAGCTTGCCACTGAAGA	-1.16	<0.01
miRNA-16-5p	CGCCAATATTTACGTGCT	-1.18	<0.01
miRNA-17-5p	CTACCTGCACTGT	-1.18	<0.01
miRNA-193a-5p	TCATCTTGCCCGCA	-1.19	<0.01
miRNA-6368	CTCCCCTCCACTGC	-1.20	<0.01
miRNA-100-5p	CACAAGTTCGGATCTACGG	-1.20	<0.01
miRNA-7082-5p	CCTCCCCTCCTCC	-1.20	<0.01
miRNA-212-3p	TGGCCGTGACTGGA	-1.21	<0.01
miRNA-3473g	TCTCCCAGCCTCA	-1.22	<0.01
miRNA-1904	CCTCCCCTCCAGAGG	-1.24	<0.01
miRNA-202-3p	TCTTCCCATGCGCTA	-1.25	<0.01
miRNA-674-3p	TTGTTCTGAGATGGGAGCT	-1.25	<0.01
miRNA-6965-5p	TCTCCTGCCCAATAGC	-1.26	<0.01

miRNA-3968	TGGTGTCTGGAGTGG	-1.27	<0.01
miRNA-199a-5p	GAACAGGTAGTCTGAACAC	-1.29	<0.01
miRNA-19a-3p	TCAGTTTTGCATAGATTTGCA	-1.32	<0.01
miRNA-199a-3p	TAACCAATGTGCAGACTACT	-1.38	<0.01
miRNA-214-3p	ACTGCCTGTCTGT	-1.40	<0.01
miRNA-148a-3p	ACAAAGTTCTGTAGTGCAC	-1.45	<0.01
miRNA-342-3p	ACGGGTGCGATTTCTGT	-1.47	<0.01
miRNA-6769b-5p	GCTCTTCCCCACCC	-1.50	<0.01
miRNA-8117	CCCCTTCTGTTCCAC	-1.52	<0.01
miRNA-466q	ACGTATGTGTGTGTGTG	-1.54	<0.01
miRNA-7042-5p	GTGGCCCTTCTGCT	-1.56	<0.01
miRNA-6997-5p	TCTGCACCTCTCCAGC	-1.57	<0.01
miRNA-494-3p	GAGGTTTCCCGTGTA	-1.65	<0.01
miRNA-18a-5p	CTATCTGCACTAGATGCAC	-1.68	<0.01
miRNA-5622-3p	GCACCACCACTACCC	-1.69	<0.01
miRNA-669p-3p	ATACGTGTGTGTGTGTATG	-1.76	<0.01
miRNA-326-3p	ACTGGAGGAAGGGCCCA	-1.78	<0.01
miRNA-709	TCCTCCTGCCTC	-1.79	<0.01
miRNA-223-3p	TGGGGTATTTGACAAACTGAC	-1.83	<0.01
miRNA-467f	TGTAGGTGTGTGTGTGTG	-1.91	<0.01
miRNA-142a-3p	TCCATAAAGTAGGAAACACTACA	-2.31	<0.01
miRNA-146a-5p	AACCCATGGAATTCAGTTC	-2.89	<0.01
miRNA-142a-5p	AGTAGTGCTTTCTACTTTA	-3.28	<0.01
miRNA-150-5p	CACTGGTACAAGGGTT	-24.37	<0.01
miRNA-8102	TCTTCCTCGTTCCCC	-37.16	<0.01

Abbreviation: miRNA, microRNA.

図 3 : qRT-PCR において AKITA マウスと db/db マウスの腎臓で共通して発現変化する miRNA



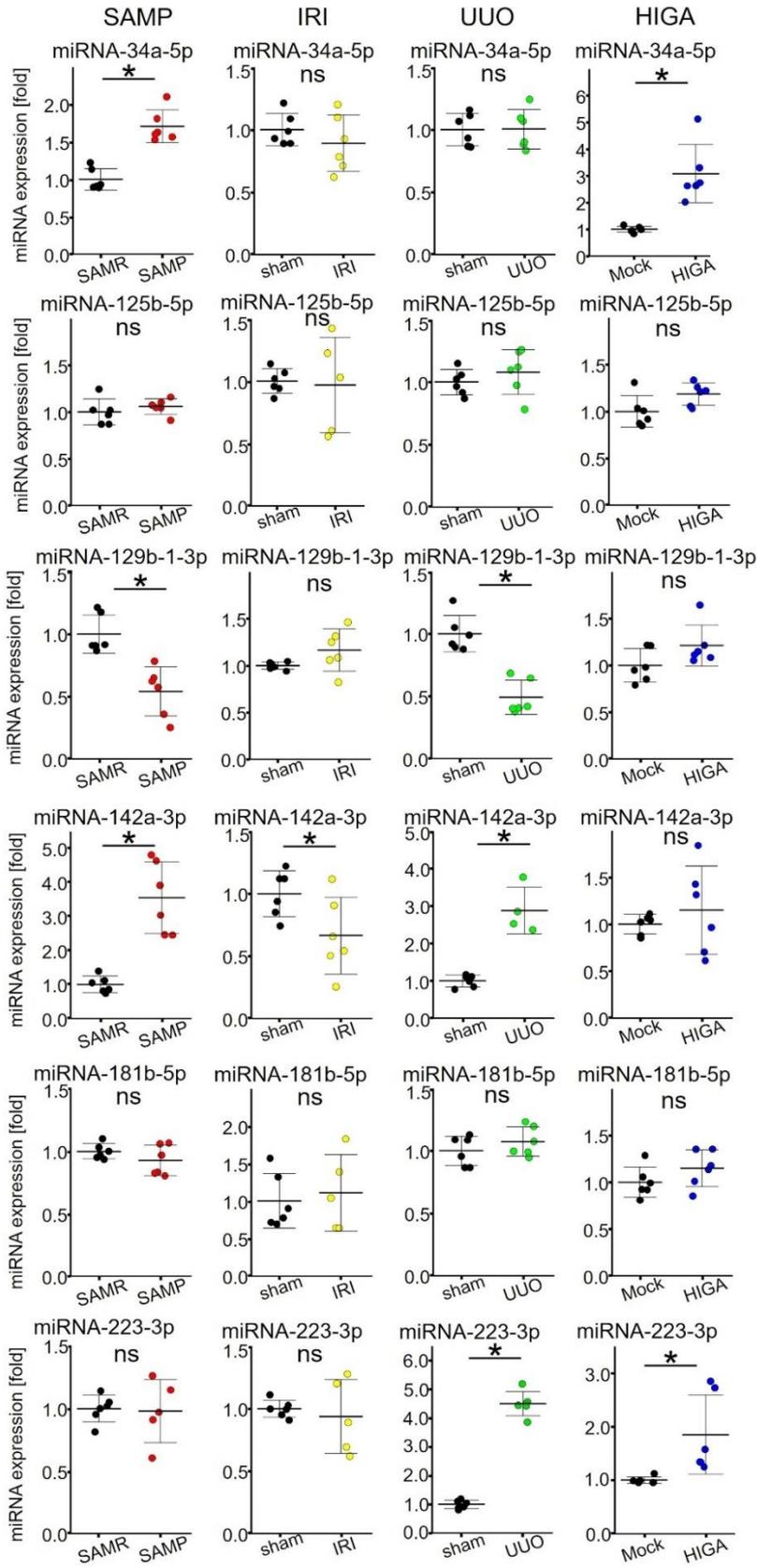
2) その他の腎疾患モデルマウスにおける miRNA 発現評価

次に、糖尿病性モデルマウス (AKITA マウス, db/db マウス) 腎で有意に発現が変化した上記 6 種類の miRNA (miRNA-34a-5p, miRNA-125b-5p, miRNA-129b-1-3p, miRNA-142a-3p, miRNA-181b-5p, および miRNA-223-3p) の発現レベルを他の腎障害モデルマウス腎で同様に qRT-PCR を用いて測定した。糖尿病性腎症以外の腎疾患のマウスモデルとして、老化腎障害マウス (SAMP1 マウス : 50 週齢)、腎線維化モデルマウス (片側尿管結紮モデル)、急性腎障害モデルマウス (虚血再灌流モデル) および IgA 腎症モデルマウス (HIGA / NscSlc マウス) で検討した。miRNA-125b-5p と miRNA-181b-5p は、SAMP1 マウス、片側尿管結紮モデルマウス、虚血再灌流モデルマウスおよび IgA 腎症モデルマウスの腎臓で有意な変化を認めなかったが、他の 4 つの miRNA (miRNA-34a-5p, -129b-1, -142a-3p および -223-3p) は、これらのモデルマウス腎の一部で発現変化が認められた (図 4)。さらに、糖尿病性モデルマウス (AKITA マウス, db/db マウス) の腎および血清での miRNA-181b-5p と miRNA-125b-5p の発現変化を AKITA マウス, db/db 経時的に分析した。その結果、腎臓での miRNA-125b-5p の発現は、AKITA マウスと db/db マウスの両方で週齢とともに減少した (図 5A)。さらに、miRNA-125b-5p の発現は、糖尿病性腎症の進行とともに db/db マウスの血清で増加したが、この

変化は AKITA マウスでは認められなかった (図 5A)。腎臓と血清中の miRNA-181b-5p の発現は、AKITA マウスと db/db マウスの両方で週齢とともに減少を認めた (図 5B)。

次に db/db マウスにおいて *in situ* ハイブリダイゼーションを用いて miRNA-121b-5p、miRNA-181b-5p の腎臓での局在を検討した。miRNA-125b-5p は db/db マウスの腎臓の糸球体および尿細管および細胞質で発現していた (図 6)。miRNA-181b-5p は種々条件を変えて検討したが *in situ* ハイブリダイゼーションでは腎での局在を同定することができなかった。これは腎での miRNA-181b-5p の発現レベルが *in situ* ハイブリダイゼーションで同定できる感度より低いことを示唆していると考えられた。一方、用いた miRNA-181b-5p の probe が *in situ* ハイブリダイゼーションに適さない可能性もある。これについては他臓器での検討ができておらず、今後の検討課題である。Laser capture microdissection と PCR の組み合わせによる発現箇所同定の有用性も報告されている。今回は実施できていないが、今後 *in vitro* での解析を含めて行う必要がある。

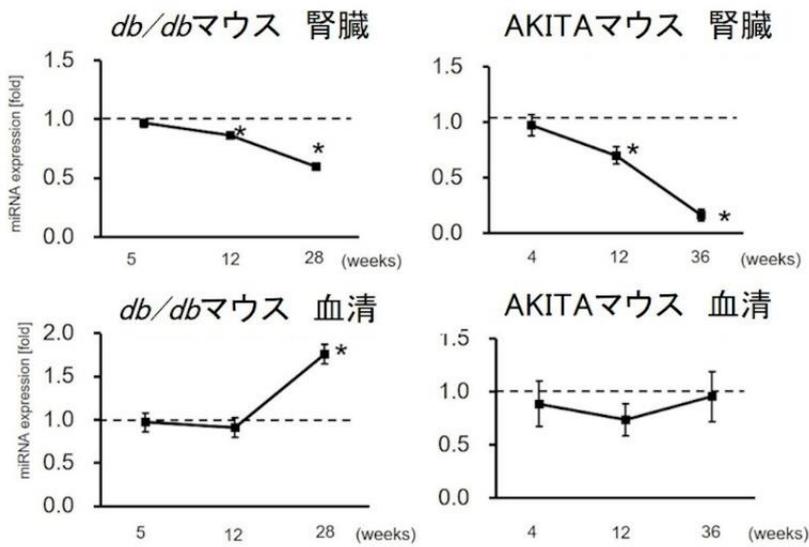
図 4: 各種腎疾患モデルマウスの腎臓における miRNA-34a-5p、miRNA-125b-5p、miRNA-129b-1-3p、miRNA-142a-3p、miRNA-181b-5p および miRNA-223-3p の発現量



SAMP; senescence-accelerated mouse、SAMR; senescence-accelerated mouse resistant、IRI; ischemia-reperfusion injury, UUU; unilateral urteral obstruction, HIGA、high immunoglobulin A、ns; not significant. * $p < 0.05$

図 5 : AKITA マウスと db/db マウスの腎臓および血清における miRNA-125b-5p、miRNA-181b-5p の発現量の経時的変化

(A) AKITA マウスと db/db マウスの腎臓（上段）および血清（下段）における miRNA-125b-5p の発現量



(B) AKITA マウスと db/db マウスの腎臓（上段）および血清（下段）における miRNA-181b-5p の発現量 * $p < 0.05$.

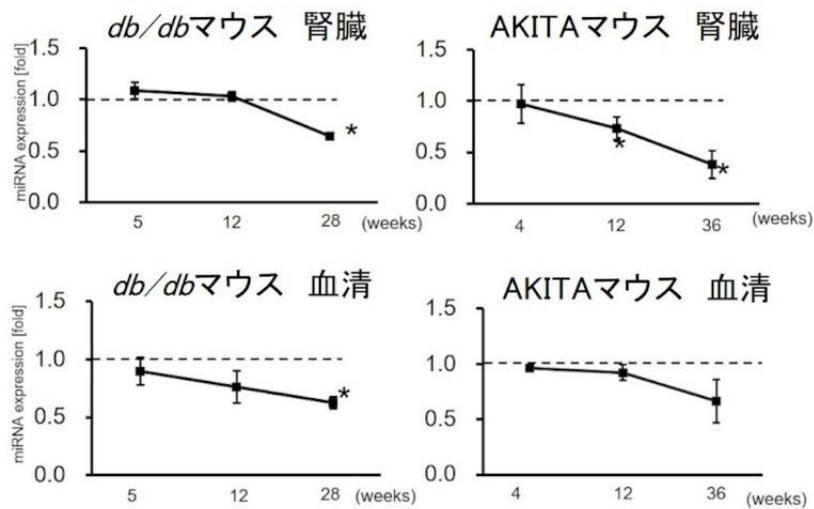
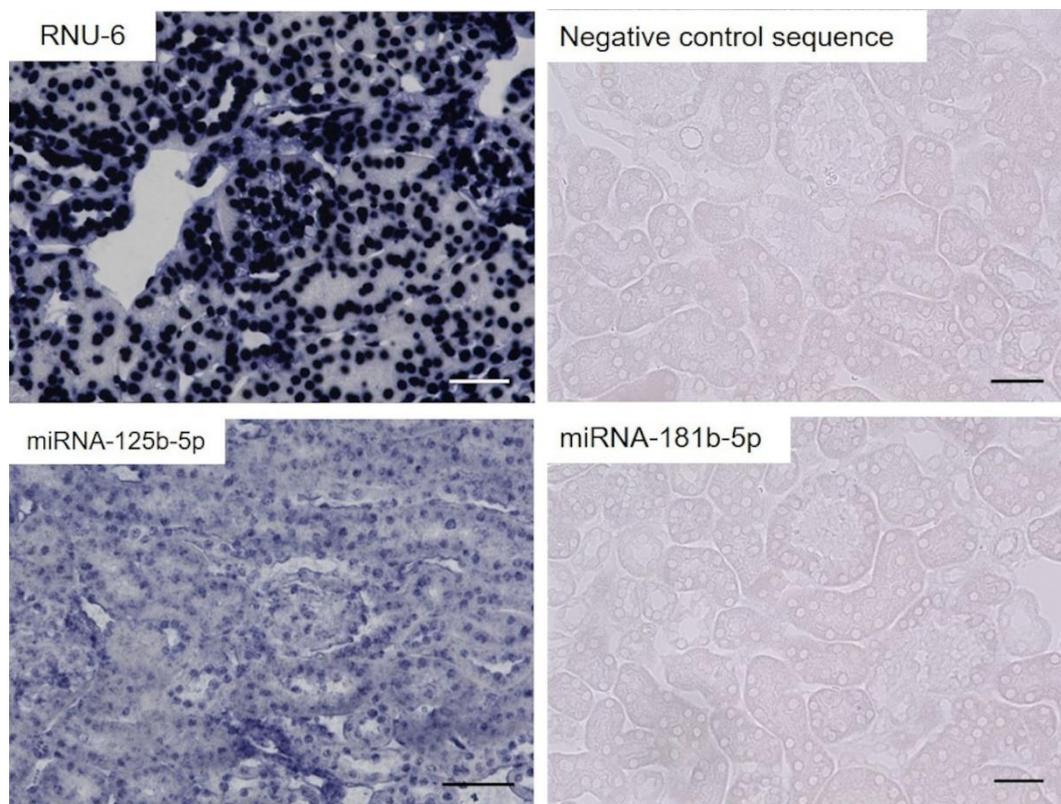


図 6 : db/db マウスの腎臓における miRNA-181b-5p および miRNA-125b-5p の in situ ハイブリダイゼーション

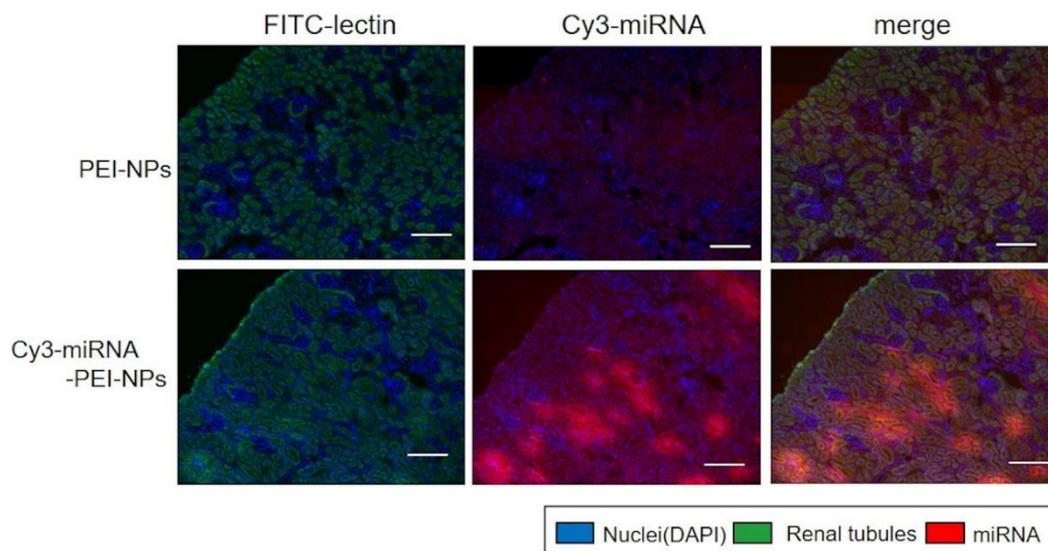


スケールバー50 μ m RNU-6; U6 Small Nuclear 1

3) db/db マウスの腎臓への miRNA-mimic の送達

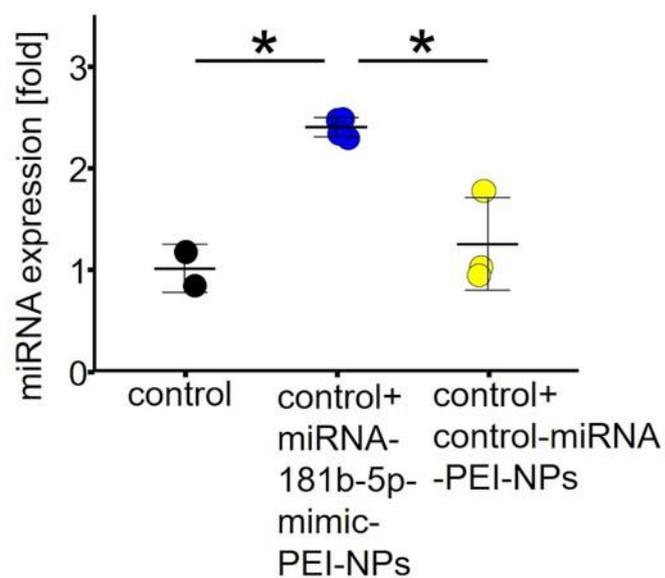
Cy3 を付加した miRNA を non-viral vector である Polyethylenimine Nanoparticles (PEI-NPs) で db/db マウスに尾静脈から腎に投与したところ腎の糸球体、尿細管、細小血管に miRNA がデリバリーされた(図 7)。次に miRNA-181b-5p-mimic (3nmol) を PEI-NPs を用いて同様に db/db マウスに尾静脈から投与したところ、腎臓で miRNA-181b-5p の 2 倍以上の過剰発現が 1 週間程度持続できた (図 8)

図 7 : PEI-NPs によりデリバリーされた miRNA のマウス腎臓内での分布



スケールバー :200 μ m DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; FITC, fluorescein isothiocyanate.

図 8 : miRNA-181b-5p-mimic-PEI-NPs による miRNA-181b-5p の発現変化



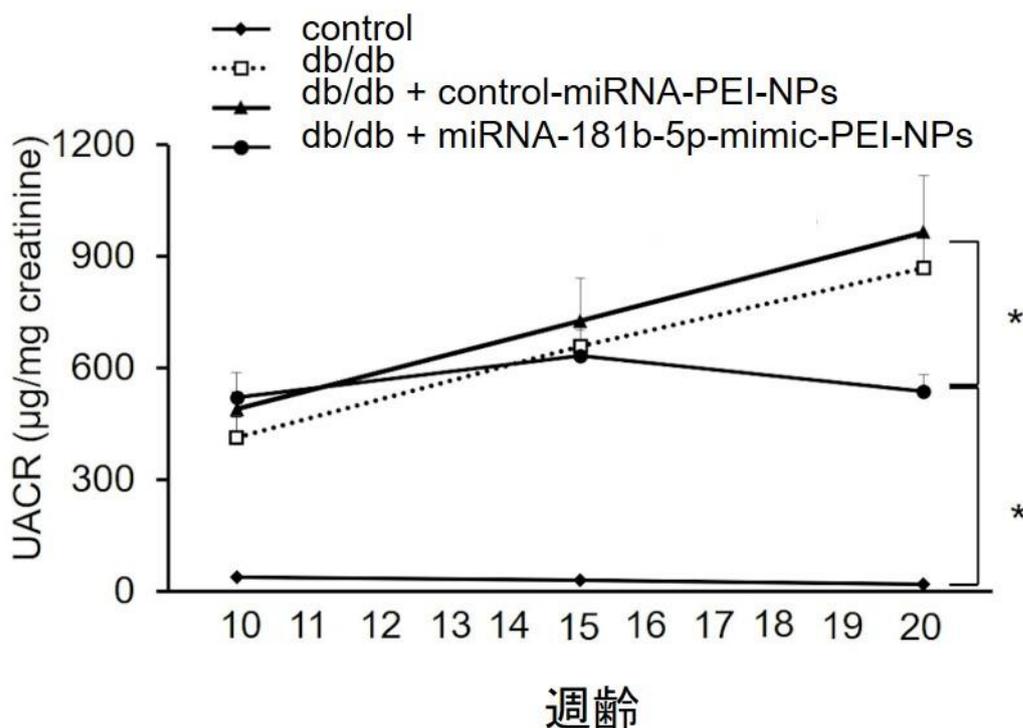
* $p < 0.05$. Abbreviations: PEI-NPs, polyethylenimine nanoparticles.

4) miRNA-181b-5p の糖尿病性腎症の治療効果

糖尿病性腎症のバイオマーカーとなる miRNA (miRNA-125b-5p、miRNA-181b-5p) の効果の検討を db/db マウスでおこなった。miRNA-125b-5p および miRNA-181b-5p は糖尿病性腎症モデルマウス (db/db マウス、AKITA マウス) の腎臓で共通して低下していたため、db/db マウスにおいて miRNA-125b-5p-mimic および miRNA-181b-5p-mimic を投与し、糖尿病性腎症の治療効果を検討することとした。

10 週齢の db/db マウスに対して、miRNA-181b-5p-mimic-PEI-NPs (1 回 3nmol, 200 μ L) を週 1 回、20 週齢まで合計 10 回尾静脈より投与し、20 週齢でマウスを解剖して miRNA-181b-5p-mimic の糖尿病性腎症への治療効果を検証した。その結果、miRNA-181b-5p-mimic-PEI-NPs 投与により db/db マウスで糖尿病性腎症進展抑制効果(蛋白尿増加抑制、メサンギウム細胞増加抑制、コラーゲン I およびコラーゲン IV 抑制)を認めた (図 9、図 10、図 11A、図 11B)。

図 9 : miRNA-181b-5p-mimic-PEI-NPs によるアルブミン尿抑制効果



* $p < 0.05$. PEI-NPs, polyethylenimine nanoparticles; UACR, urine albumin-to-creatinine ratio.

図 10 : miRNA-181b-5p-mimic-PEI-NPs によるメサンギウム領域拡大の抑制効果
 * $p < 0.05$; † $p < 0.05$ compared with control. スケールバー 50 μm . PEI-NPs, polyethylenimine nanoparticles.

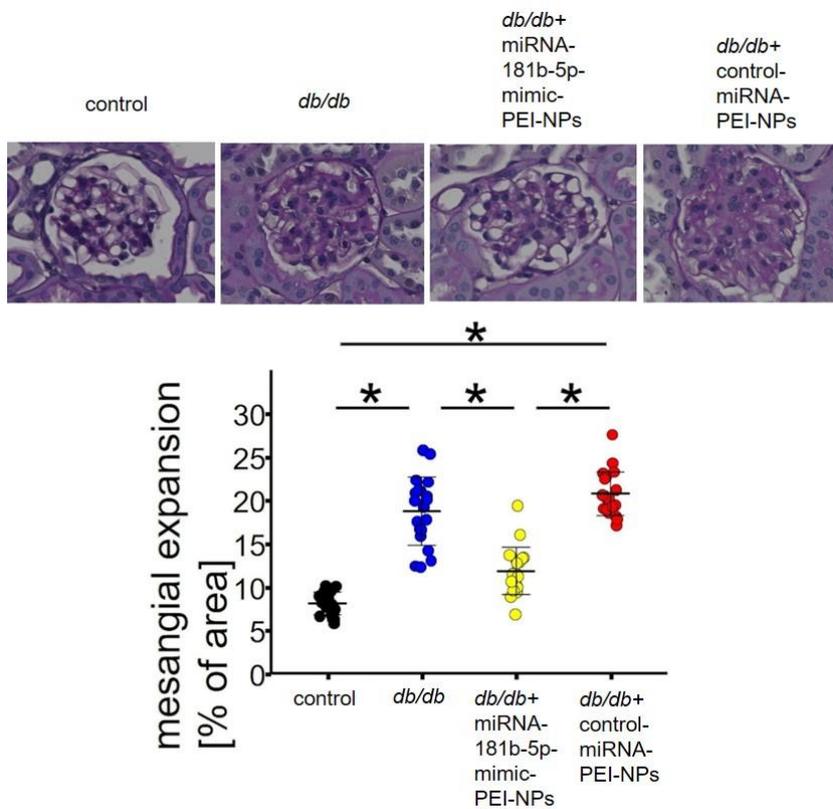
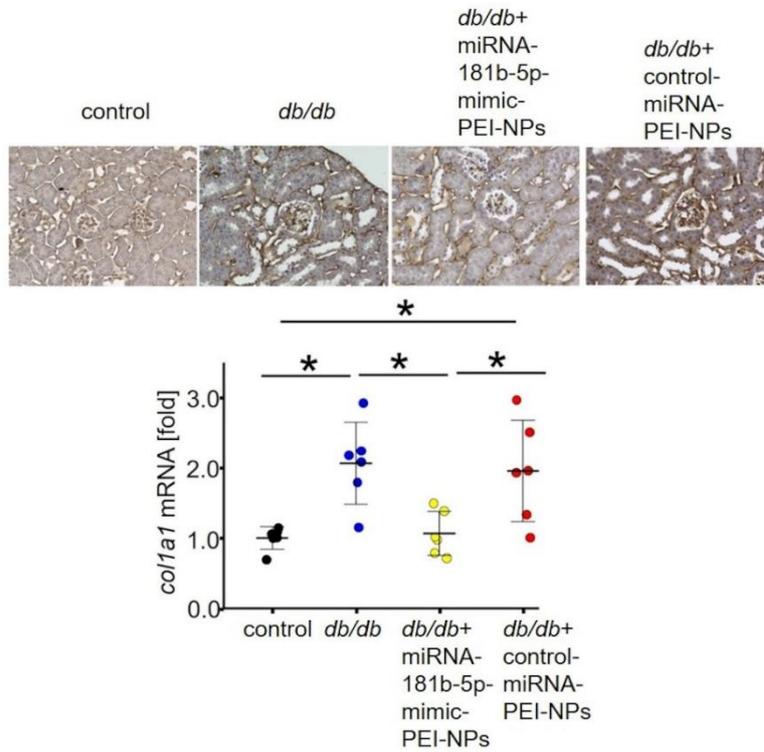
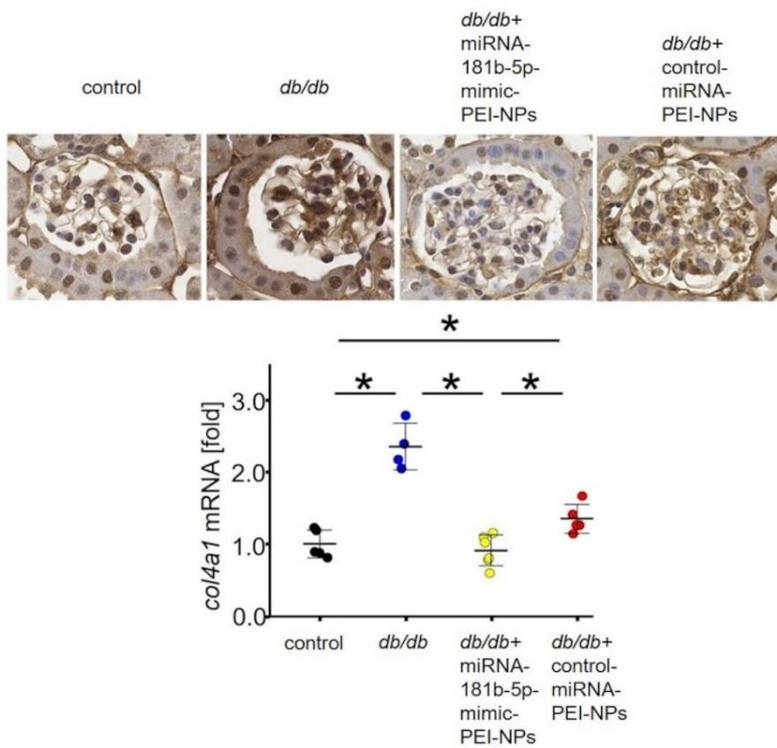


図 11 : miRNA-181b-5p-mimic-PEI-NPs によるコラーゲン I およびコラーゲン IV 発現変化

(A) コラーゲン I の免疫組織染色(上段)および mRNA 発現量(下段)、



(B) コラーゲン IV の免疫組織染色(上段)および mRNA 発現量(下段)



* $p < 0.05$. スケールバー 50 μm . PEI-NPs, polyethylenimine nanoparticles.

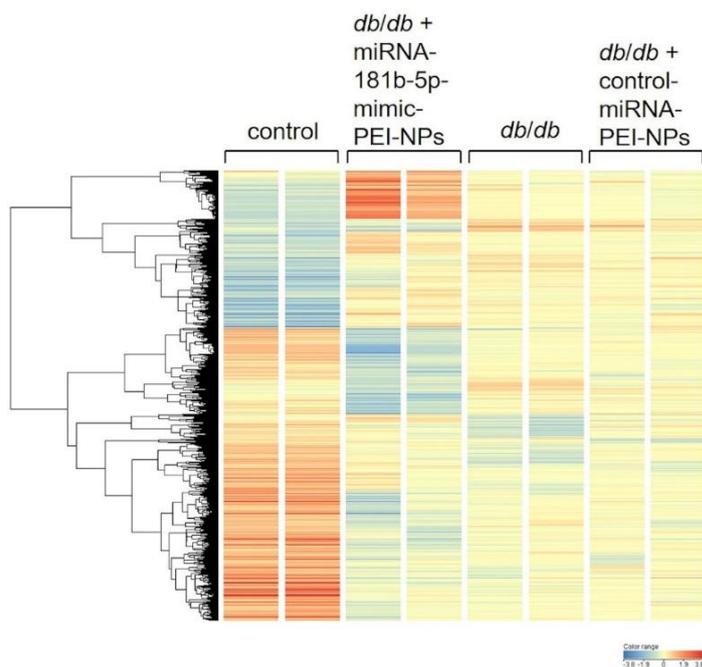
5) miRNA-181b-5p の糖尿病性腎症における機序

糖尿病性腎症の治療効果の認められた miRNA-181b-5p の糖尿病性腎症における機能を解明するため、正常マウス、無治療 db/db マウス、db/db マウス+miRNA-181b-5p-mimic-PEI-NPs、および db/db マウス+control-miRNA-PEI-NPs の各群の腎臓で変化する遺伝子を遺伝子マイクロアレイ法で網羅的に解析した。56,745 種類の遺伝子の中で 4 倍以上変化した遺伝子は表 3a に示すように db/db マウスに比較して db/db マウス+miRNA-181b-5p-mimic-PEI-NPs では 51 種類 (上昇 24 種類、低下 27 種類)が認められた。一方、db/db マウスに比較して db/db マウス+control-miRNA-PEI-NPs では 1 種類であった。miRNA-181b-5p-mimic により特異的に糖尿病性腎症で多数の遺伝子変化が誘導されていた (図 12)。

前記の遺伝子マイクロアレイ法の結果をもとに miRNA-181b-5p の標的 mRNA の変化について検討した。miRNA-181b-5p の標的 mRNA は Target Scan (http://www.targetscan.org/vert_72/)を用いて検索した。その結果、ミトコンドリア機能保持に関与する Slc25a25 の発現変化を db/db マウス+miRNA-181b-5p-mimic-PEI-NPs 群で認めた (表 3b)。qRT-PCR を用いた解析でも db/db マウス+miRNA-181b-5p-PEI-NPs 群で特異的に Slc25a25 の発現変化を認めた(図 13)。

さらに miRNA-181b-5p の既存のシグナリングパスウェイ mRNA におよぼす影響をパスウェイ解析で解析した。その結果、表 3c に示す 10 シグナルリングパスウェイで 10 種類の遺伝子の 4 倍以上の有意変化を db/db マウス+miRNA-181b-5p-mimic-PEI-NPs 群で認めた。これらの mRNA について qRT-PCR を用いて解析した結果、6 種類の mRNA(上昇 : Creb3l3、低下 : Nr1d1、Psme3、Gli3、Cry1、Erc2)が db/db マウス+miRNA-181b-5p-PEI-NPs 群で有意に変化していた (図 13)。

図 12 : miRNA-181b-5p-mimic-PEI-NPs 投与による遺伝子発現のヒートマップ



PEI-NPs, polyethylenimine nanoparticles.

図 13 : qRT-PCR において miRNA-181b-5p-mimic-PEI-NPs で発現変化した mRNA

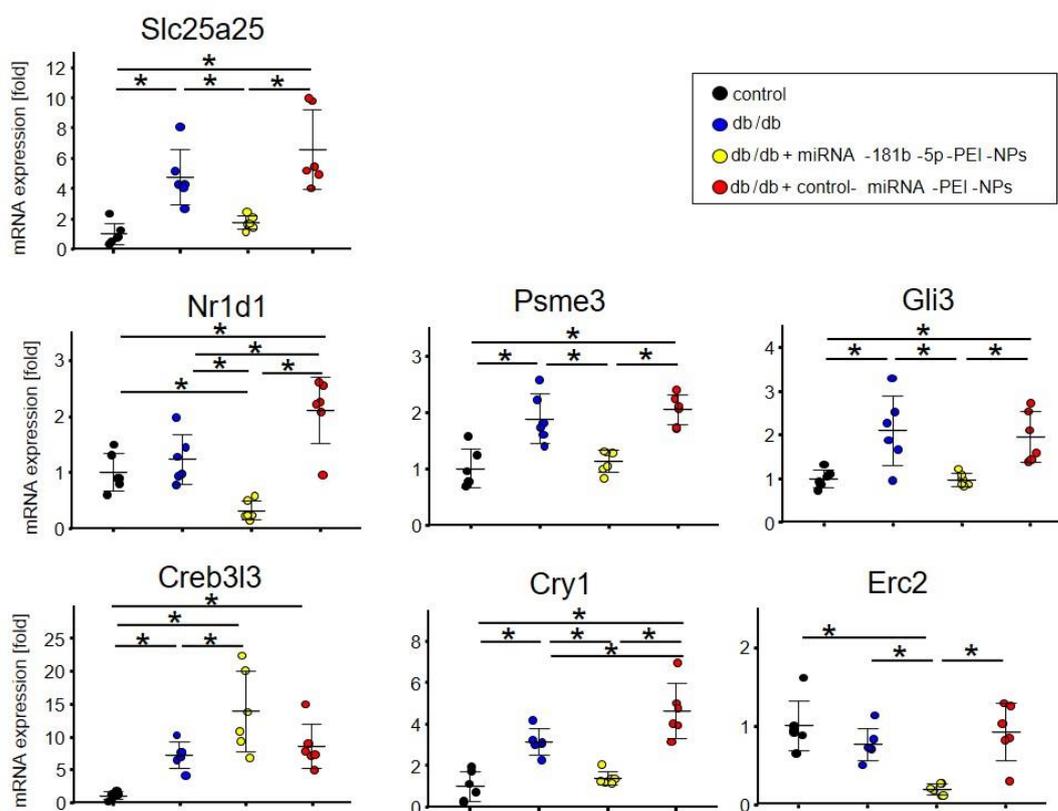


表 3a. *db/db* マウスで miRNA-181b-5p の過剰発現により 4 倍以上発現変化した遺伝子

Gene Symbol	Gene bank accession number	control vs. <i>db/db</i>	<i>db/db</i> vs. <i>db/db</i> + miRNA- 181b-5p- mimic- PEI-NPs	<i>db/db</i> vs. <i>db/db</i> + control- miRNA- PEI-NPs	<i>P</i>-value (ANOVA)
<i>Cyp24a1</i>	NM_009996	10.59	-13.75	-2.88	0.01
<i>Tshz2</i>	XM_006499424	4.36	-7.37	-1.47	0.01
<i>Ciart</i>	NM_001033302	3.24	-7.04	-2.03	0.01
<i>Erc2</i>	XR_383314	-1.57	-6.89	-1.92	0.01
<i>Gm41568</i>	XR_876749	3.52	-6.19	-1.72	0.03
<i>Grm7</i>	NM_001346640	4.83	-6.01	-1.42	<0.01
<i>Gm853</i>	NM_001034872	-10.32	-6.00	-1.30	0.01
<i>Nr1d1</i>	NM_145434	-1.02	-5.70	-1.07	0.03
<i>Gm3230</i>	NR_033642	1.07	-5.31	-1.52	<0.01
<i>Ptrh1</i>	AK132137	2.05	-5.25	-1.98	0.01
<i>Rbm39</i>	AK050568	1.74	-5.08	-1.37	0.01
<i>Tsga10</i>	NM_207228	-1.68	-5.08	-1.02	0.01
<i>Gng8</i>	NM_010320	1.26	-5.04	1.06	0.01
<i>Gm46558</i>	XR_001781962	3.20	-4.65	-1.24	0.01
<i>Tceanc2</i>	NM_025617	1.31	-4.61	-1.03	<0.01
<i>Sytl3</i>	NM_031395	-1.28	-4.56	-1.68	0.01
<i>Serpind1</i>	NM_008223	6.36	-4.55	-1.26	0.03
<i>Tmem269</i>	NM_029198	1.32	-4.52	-1.54	<0,01
<i>Myom3</i>	NM_001085509	-5.66	-4.49	-1.29	0,02
<i>Micall</i>	XM_017313821	-2.53	-4.44	1.05	0.02
<i>Slco1a1</i>	NM_013797	-111.7	-4.33	1.49	<0.01
		0			
<i>Gli3</i>	NM_008130	1.83	-4.32	-1.27	<0.01
<i>Jup</i>	AK171501	4.69	-4.26	-1.64	0.02
<i>Negr1</i>	NM_001039094	1.47	-4.14	-2.42	<0.01
<i>Ak5</i>	NM_001081277	2.56	-4.14	-1.20	0.04
<i>1810024B</i>	NM_198630	2.45	-4.13	-1.19	<0.01

<i>03Rik</i>					
<i>2010111I0</i>	NR_110521	1.84	-4.06	-2.43	0.03
<i>1Rik</i>					
<i>Fryl</i>	NM_028194	1.60	4.02	1.04	0.01
<i>Igsf9</i>	NM_033608	2.18	4.03	-1.13	<0.01
<i>Psme3</i>	NM_011192	1.92	4.06	-1.15	<0.01
<i>Arhgef15</i>	NM_177566	1.99	4.10	-1.13	0.01
<i>Tmprss3</i>	NM_001163776	2.00	4.12	-1.09	0.01
<i>A530006G</i>	NR_046014	2.18	4.15	-1.13	<0.01
<i>24Rik</i>					
<i>Scn8a</i>	NM_001077499	2.11	4.21	-1.09	<0.01
9530083O	AK079287	1.83	4.22	-1.02	0.01
<i>12Rik</i>					
<i>Dad1</i>	NM_010015	1.48	4.23	-1.02	<0.01
1700110I0	NR_038059	2.12	4.23	-1.09	<0.01
<i>1Rik</i>					
<i>Zfp133-ps</i>	NR_033459	1.71	4.24	-1.12	0.01
<i>Srgap2</i>	NM_001081011	2.02	4.24	-1.00	<0.01
<i>Il15ra</i>	NM_133836	1.89	4.25	-1.03	0.01
<i>Dmtn</i>	AK165204	1.94	4.27	-1.12	0.01
<i>Cry1</i>	NM_007771	3.95	4.28	-1.31	<0.01
<i>Slc25a25</i>	NM_146118	2.68	4.31	-1.59	0.02
<i>Phip</i>	AK048498	1.84	4.37	-1.12	0.01
<i>Tnfrsf25</i>	NM_001291010	-2.94	4.47	2.51	0.02
<i>Akna</i>	AK158313	1.58	4.59	1.05	0.02
4930556N	NR_045358	-1.17	4.65	2.90	0.02
<i>09Rik</i>					
<i>Nkx6-2</i>	NM_183248	2.21	5.15	1.52	0.04
<i>Creb3l3</i>	NM_145365	2.73	6.17	1.12	<0.01
<i>Nfil3</i>	NM_017373	-2.22	8.73	-1.14	0.04
<i>Il1f6</i>	NM_019450	-1.20	11.65	1.92	0.04

Abbreviations: Ak5, adenylate kinase 5; Akna, AT-hook transcription factor; Arhgef15, Rho guanine nucleotide exchange factor 15; Ciart, circadian associated repressor of transcription; Creb3l3, cAMP-responsive element binding protein 3-like 3; Cry1, cryptochrome 1; Cyp24a1, cytochrome P450, family 24, subfamily a, polypeptide 1; Dad1, defender against cell death 1; Dmtn, dematin actin-binding protein; Erc2,

ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 2; Fryl, FRY-like transcription coactivator; Gli3, GLI-Kruppel family member GLI3; Gm3230, predicted gene 3230; Gm41568, predicted gene, 41568; Gm46558, predicted gene 46558; Gm853, predicted gene 853; Gng8 guanine nucleotide-binding protein (G protein), gamma 8; Grm7, glutamate receptor, metabotropic 7; Igsf9, immunoglobulin superfamily, member 9; Il15ra, interleukin 15 receptor, alpha chain; Il1f6, interleukin 1 family, member 6; Jup, junction plakoglobin; Mical1, microtubule-associated monooxygenase, calponin, and LIM domain-containing 1; Myom3, myomesin family, member 3; Negr1, neuronal growth regulator 1; Nfil3, nuclear factor, interleukin 3, regulated; Nkx6-2, NK6 homeobox 2; Nr1d1, nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1; Phip, pleckstrin homology domain-interacting protein; Psme3, proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3 (PA28 gamma, Ki); Ptrh1, peptidyl-tRNA hydrolase 1 homolog; Rbm39, RNA-binding motif protein 39; Scn8a, sodium channel, voltage-gated, type VIII, alpha; Serpind1, serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade D, member 1; Slc25a25, solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, phosphate carrier), member 25; Slc1a1, solute carrier organic anion transporter family, member 1a1; Srgap2, SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 2; Sytl3, synaptotagmin-like 3; Tceanc2, transcription elongation factor A (SII) N-terminal and central domain-containing 2; Tmem269, transmembrane protein 269; Tmprss3, transmembrane protease, serine 3; Tnfrsf25, tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25; Tsga10, testis-specific 10; Tshz2, t-shirt zinc finger family member 2; Zfp133-ps, zinc finger protein 133, pseudogene.

表 3b. *db/db* マウスで miRNA-181b-5p の過剰発現により発現変化した miRNA-181b-5p の標的 mRNA

Gene Symbol	Gene bank accession number	control vs. <i>db/db</i>	<i>db/db</i> vs. <i>db/db+</i> miRNA- 181b-5p- mimic- PEI-NPs	<i>db/db</i> vs. <i>db/db+</i> control- miRNA- PEI-NPs	<i>P</i>-value (ANOVA)
<i>Slc25a25</i>	NM_146118	2.68	4.31	-1.59	0.02
<i>Eya3</i>	NM_010166	-1.64	1.76	1.38	0.01
<i>Fam102a</i>	NM_153560	1.18	1.56	-1.00	0.01
<i>2410141K0</i>	NM_001290196	-1.22	1.41	1.12	0.02
<i>9Rik</i>					

<i>Tardbp</i>	NM_145556	-1.41	1.22	1.00	0.01
<i>Ugcg</i>	NM_011673	-2.15	1.14	1.25	0.03
<i>Palld</i>	NM_001293772	1.40	1.14	1.04	0.02
<i>Ncald</i>	NM_134094	1.32	1.08	-1.07	0.02
<i>Ralgapb</i>	NM_001291137	1.35	-1.01	1.03	<0.01
<i>Ugcg</i>	NM_011673	-2.12	-1.02	1.21	0.04
<i>Card11</i>	NM_175362	-2.67	-1.03	1.23	<0.01
<i>Pgap1</i>	AK051546	-1.30	-1.07	1.09	0.04
<i>Armc1</i>	AK034483	-1.35	-1.28	1.24	0.02
<i>Luzp1</i>	NM_024452	-1.17	-1.28	-1.32	0.01
<i>Zfp704</i>	NM_133218	1.51	-1.42	-1.04	0.04
<i>Slc39a8</i>	NM_001135150	-1.90	-1.60	-1.05	0.02
<i>Grm7</i>	NM_001346640	4.83	-6.01	-1.42	0.01

Abbreviations: *Armc1*, armadillo repeat-containing 1; *Card11*, caspase recruitment domain family, member 11; *Eya3*, EYA transcriptional coactivator and phosphatase 3; *Fam102a*, family with sequence similarity 102, member A; *Grm7*, glutamate receptor, metabotropic 7; *Luzp1*, leucine zipper protein 1; *Ncald*, neurocalcin delta; *Palld*, palladin, cytoskeletal-associated protein; *Pgap1*, post-GPI attachment to proteins 1; *Ralgapb*, Ral GTPase-activating protein, beta subunit (non-catalytic); *Slc25a25*, solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, phosphate carrier), member 25; *Slc39a8*, solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 8; *Tardbp*, TAR DNA-binding protein; *Ugcg*, UDP-glucose ceramide glucosyltransferase; *Zfp704*, zinc finger protein 704.

表 3c. db/db マウスで miRNA-181b-5p の過剰発現により 4 倍以上の発現変化のあった遺伝子と関連するシグナリングパスウェイ

Pathway	Gene Symbol	Control vs. <i>db/db</i>	<i>db/db</i> vs. <i>db/db+</i> miRNA- 181b-5p- mimic- PEI-NPs	<i>db/db</i> vs. <i>db/db+</i> control- miRNA- PEI-NPs	P-value (ANOVA)
Endochondral ossification	<i>Gli3</i>	1.83	-4.32	-1.27	< 0.01
Hedgehog signaling	<i>Gli3</i>	1.83	-4.32	-1.27	< 0.01
Exercise-induced	<i>Cry1</i>	3.95	4.28	-1.31	< 0.01

circadian regulation					
Exercise-induced	<i>Erc2</i>	-1.57	-6.89	-1.92	0.01
circadian regulation					
Exercise-induced	<i>Nr1d1</i>	-1.02	-5.70	-1.07	0.03
circadian regulation					
Focal adhesion-PI3K- Akt-mTOR-signaling	<i>Creb3l3</i>	2.73	6.17	1.12	< 0.01
Focal adhesion-PI3K- Akt-mTOR-signaling	<i>Gng8</i>	1.26	-5.04	1.06	0.01
Myometrial relaxation and contraction pathways	<i>Gng8</i>	1.26	-5.04	1.06	0.01
GPCR class C metabotropic glutamate pheromone	<i>Grm7</i>	4.83	-6.01	-1.42	0.01
Nuclear receptors in lipid metabolism and toxicity	<i>Cyp24a1</i>	10.59	-13.75	-2.88	0.01
Protein-protein interactions in the podocyte	<i>Jup</i>	4.69	-4.26	-1.64	0.02
Wnt signaling pathway	<i>Jup</i>	4.69	-4.26	-1.64	0.02
Proteasomal degradation	<i>Psme3</i>	1.92	4.06	-1.15	0.01

Abbreviations: *Gli3*, GLI-Kruppel family member GLI3; *Cry1*, cryptochrome 1 (photolyase-like); *Erc2*, ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 2; *Nr1d1*, nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1; *Creb3l3*, cAMP-responsive element-binding protein 3-like 3; *Gng8*, guanine nucleotide-binding protein (G protein), gamma 8; *Grm7*, glutamate receptor, metabotropic 7; *Cyp24a1*, cytochrome P450, family 24, subfamily a, polypeptide 1; *Jup*, junction plakoglobin; *Psme3*, proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3 (PA28 gamma, Ki), PI3K, phosphoinositide 3-kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin; GPCR, G protein-coupled receptor.

6) miRNA-125b-5p の糖尿病性腎症の治療効果

10 週齢の db/db マウスに miRNA-125b-5p-mimic-PEI-NPs(1 回 3nmol, 200 μ L)を週 1 回、20 週齢まで合計 10 回尾静脈より投与し、20 週齢でマウスを解剖して miRNA-125b-5p-mimic の糖尿病性腎症への治療効果を検証した。その結果、

miRNA-125b-5p-mimic-PEI-NPs 投与ではアルブミン尿減少効果を認めなかった。また、腎組織にも有意な変化は得られなかった。

7) 糖尿病性腎症の診断バイオマーカーとしての miRNA-125b-5p と miRNA-181b-5p の有用性

糖尿病性腎症の診断バイオマーカーとしての miRNA-125b-5p および miRNA-181b-5p の有用性を検討するために、糖尿病性腎症患者 (n=25)、健常人 (n=25) および糖尿病性腎症患者と背景を一致させた糖尿病性腎症以外の腎疾患患者 (n=50)での miRNA-125b-5p および miRNA-181b-5p の血清での発現量を qRT-PCR を使用して測定した。各グループの背景は表 4 に記載した通りである。血清 miRNA-125b-5p の発現量は糖尿病性腎症患者で健常者や糖尿病性腎症以外の腎疾患患者と比較して有意に高値であり、血清 miRNA-181b-5p の発現レベルは有意に低値であった (図 14A)。また、ROC 解析で miRNA-125b-5p および miRNA-181b-5p は糖尿病性腎症に対する良好な診断能を示した (miRNA-125b-5p: cut-off value 0.775, area under the curve [AUC] 0.740, sensitivity 0.857, specificity 0.580, $p<0.05$; miRNA-181b-5p: cut-off value 0.583, AUC 0.787, sensitivity 0.933, specificity 0.553, $p<0.05$) (図 14B)。次に miRNA-125b-5p、miRNA-181b-5p の組み合わせによる糖尿病性腎症の診断能を検証した。各個人で miRNA-125b-5p の発現/miRNA-181b-5p の発現を計算し、miRNA-125b-5p/miRNA-181b-5p の糖尿病性腎症診断の有用性を検証したところ、miRNA-125b-5p/miRNA-181b-5p は糖尿病性腎症をそれぞれ単独より、優れた診断能を示した(miRNA-125b-5p/miRNA-181b-5p: cut-off value 2.050, sensitivity 1.000, specificity 0.727, AUC 0.918, $p<0.05$) (図 14C)。

また、腎生検で診断された糖尿病性腎症 25 例と糖尿病合併があるが腎生検で他の腎疾患と診断された 25 例 (IgA 腎症 4 例、膜性腎症 7 例、腎硬化症 4 例、間質性腎炎 1 例、微小変化型ネフローゼ症候群 2 例、IgG4 関連腎症 3 例、その他 4 例)血清 miRNA-125b-5p および miRNA-181b-5p の発現を比較検討した。各グループの背景は表 5 に記載した。その結果 miRNA-181b-5p は糖尿病性腎症群で有意に高かった。一方、miRNA-125b-5p は有意差を認めなかった (図 14A)。miRNA-125b-5p と miRNA-181b-5p の血清レベルの比率(miRNA-125b-5p / miRNA-181b-5p)は、糖尿病性腎症の患者で有意に高かった (図 14A)。ROC 解析では miRNA-125b-5p の発現/miRNA-181b-5p 比は糖尿病性腎症をそれぞれ単独よりも高い精度で診断可能であった(cut-off value 3.110, sensitivity 0.769, specificity 0.909, AUC 0.839, $p<0.05$) (図 14B)。

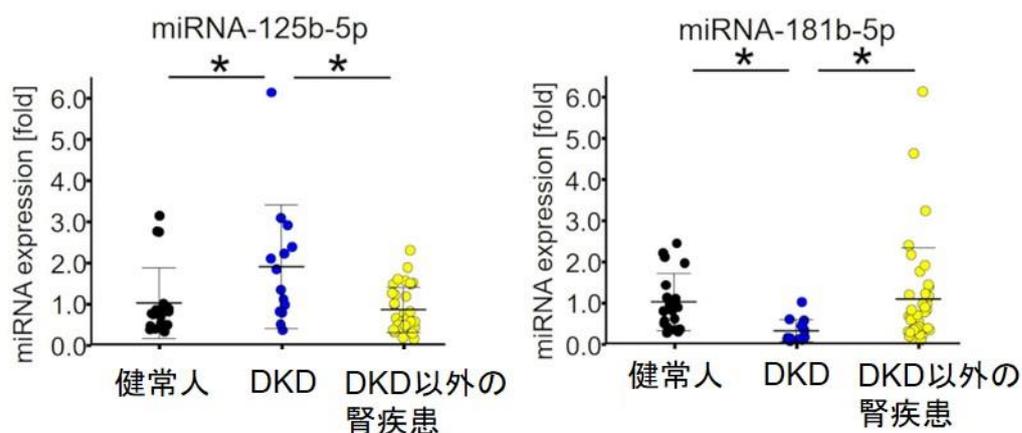
表 4. 糖尿病性腎症および糖尿病性腎症以外の腎疾患患者の背景

患者背景	DKD (n=25)	DKD 以外の腎疾患 (n=50)	P-value
年齢 (歳)	63.6±11.1	56.1±26.0	0.09
性別 (男/女)	17/8	29/21	0.40
BMI (kg/m ²)	25.3±5.4	22.8±3.6	0.02
HbA1c (%)	6.7±1.0	5.9±0.7	<0.01
血糖値 (mg/dL)	171.6±72.0	133.3±46.7	<0.01
Alb (g/dL)	3.2±0.9	3.2±0.9	0.99
BUN (mg/dL)	29.4±15.9	25.1±18.1	0.32
Cr (mg/dL)	1.62±0.78	1.74±1.92	0.75
eGFR (mL/min/1.73m ²)	43.4±25.0	53.1±32.8	0.19
UACR (g/gCr)	5.8±6.5	2.6±2.9	0.01
UA (mg/dL)	6.2±1.4	6.3±1.7	0.73
HDL-C (mg/dL)	52.4±23.1	53.1±19.7	0.89
LDL-C (mg/dL)	118.1±52.8	142.6±80.6	0.18
TG (mg/dL)	203.4±151.0	208.6±186.1	0.90
Hb (g/dL)	11.6±2.1	12.4±2.2	0.17

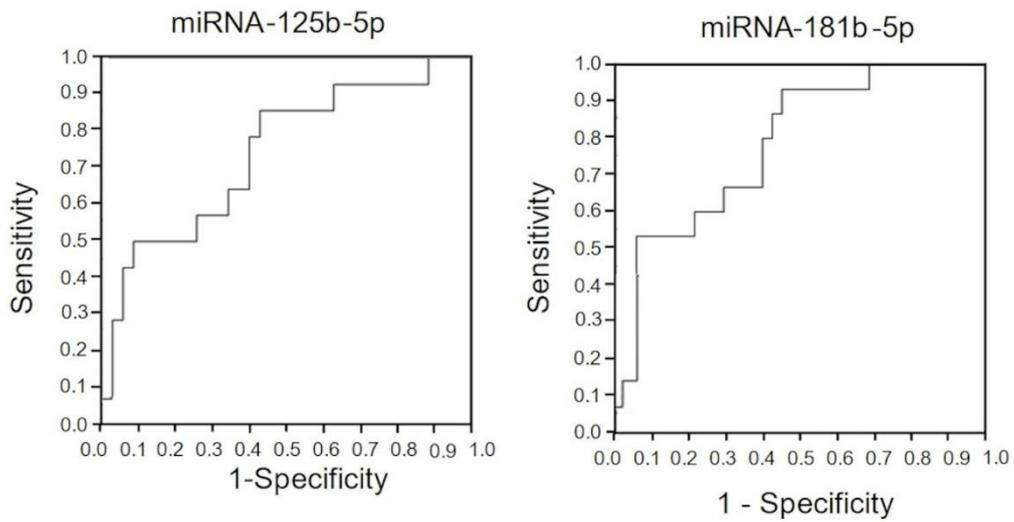
Abbreviations: BMI, body mass index; BUN, blood urea nitrogen; Cr, creatinine; Hb, hemoglobin; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; TG, triglyceride; UA, uric acid; UACR, urine albumin-to-creatinine ratio

図 14 : miRNA-125b-5p および miRNA-181b-5p の診断バイオマーカーとしての有用性

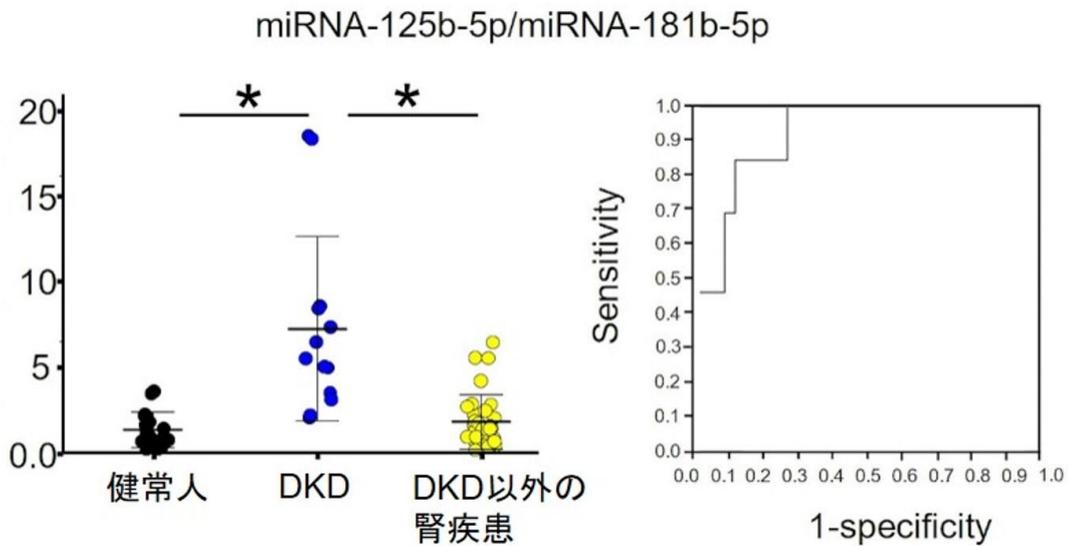
(A) miRNA-125b-5p および miRNA-181b-5p の発現量



(B) miRNA-125b-5p および miRNA-181b-5p の発現量の ROC 解析



(C) miRNA-125b-5p と miRNA-181b-5p の発現比(miRNA-125b-5p / miRNA-181b-5p) (左図)および ROC 解析(右図)



* $p < 0.05$. DKD, diabetic kidney disease.

表 5. 糖尿病性腎症および糖尿病を合併した糖尿病性腎疾患以外の腎疾患患者

の背景

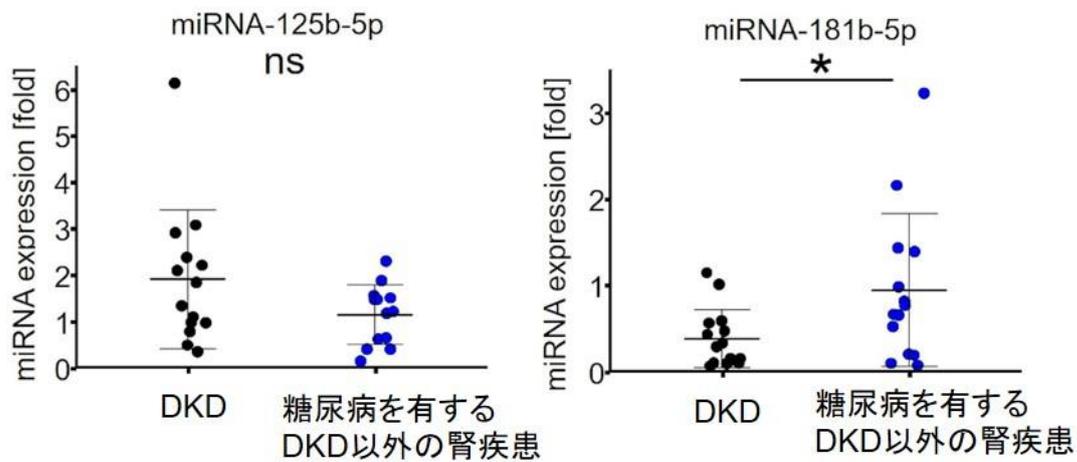
患者背景	DKD (n=25)	糖尿病を有する DKD 以外の腎疾患 (n=25)	P-value
年齢 (歳)	63.6±11.1	69.0±8.9	0.10
性別 (男/女)	17/8	20/5	0.33
BMI (kg/m ²)	25.3±5.4	23.8±3.9	0.28
HbA1c (%)	6.7±1.0	6.5±0.5	0.28
血糖値 (mg/dL)	171.6±72.0	160.0±50.7	0.51
Alb (g/dL)	3.2±0.9	3.2±0.8	0.84
BUN (mg/dL)	29.4±15.9	30.8±18.7	0.77
Cr (mg/dL)	1.62±0.78	2.21±2.3	0.23
eGFR (mL/min/1.73m ²)	43.4±24.7	38.3±16.8	0.46
UACR (g/gCr)	5.8±6.5	2.7±2.9	<0.05
UA (mg/dL)	6.2±1.4	7.0±1.6	0.07
HDL-C (mg/dL)	52.4±23.1	46.7±12.8	0.29
LDL-C (mg/dL)	118.1±52.8	136.2±74.4	0.34
TG (mg/dL)	203.4±151.0	188.1±116.0	0.69
Hb (g/dL)	11.6±2.1	12.7±2.5	0.13

Abbreviations: BMI, body mass index; BUN, blood urea nitrogen; Cr, creatinine; Hb, hemoglobin; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; TG, triglyceride; UA, uric acid; UACR, urine albumin-to-creatinine ratio

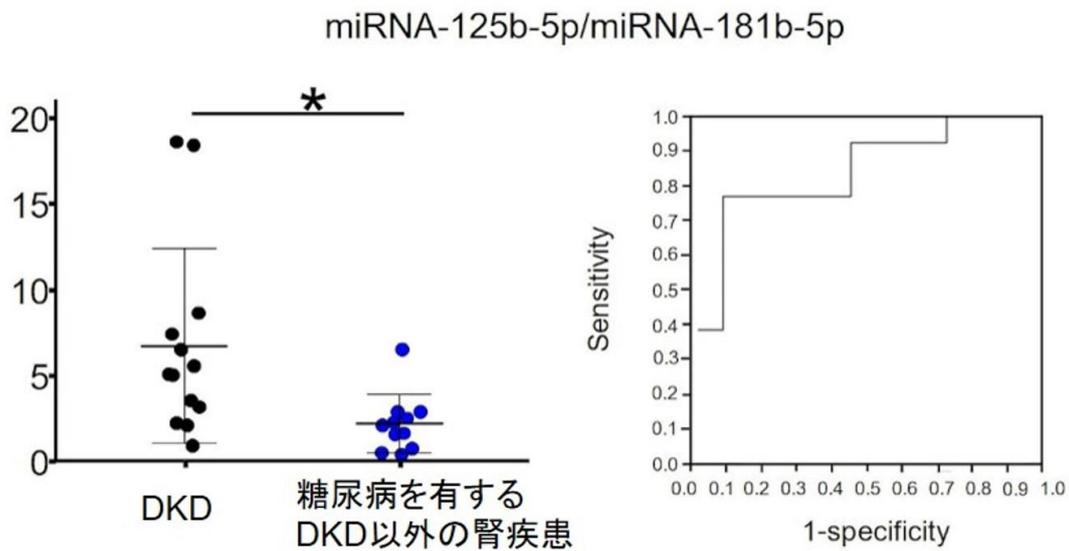
図 15 : miRNA-125b-5p および miRNA-181b-5p の DKD と糖尿病を有する DKD

以外の腎疾患との比較

(A) miRNA-125b-5p および miRNA-181b-5p の発現量



(B) miRNA-125b-5p と miRNA-181b-5p の発現比(miRNA-125b-5p / miRNA-181b-5p) (右図) および ROC 分析 (左図)



* $p < 0.05$. DKD, diabetic kidney disease.

4. 考察

本研究で、miRNA-125b-5p と miRNA-181b-5p は糖尿病性腎症のバイオマーカーとして有用であることが示唆された。さらに、miRNA-181b-5p は、発現を上昇させることで糖尿病性腎症の治療になる可能性がある。

これまでも糖尿病性腎症で miRNA の発現が変化することが報告されている³⁴³⁵。しかし、miRNA-125b-5p と miRNA-181b-5p についてはまだ報告がない。これは実験方法と患者選択の差異による可能性を考えている。本研究では、miRNA を異なる 2 つの糖尿病モデルマウスを使用して、糖尿病性腎症で変化する miRNA を特定した。そこで特定した 6 種類の miRNA から、他の腎障害で変化せず、糖尿病性腎症で特異的に変化する miRNA を同定した。さらにその miRNA について、腎生検で糖尿病性腎症と診断された患者と、腎生検で他の腎疾患と診断された患者について検討したところ、糖尿病性腎症で特異的に変化していることを確認した。また、実臨床で糖尿病性腎症のバイオマーカーのニーズが最も高いのが、糖尿病患者の腎障害(蛋白尿、腎機能低下)が糖尿病性腎症への進展なのか、他の腎疾患が合併したのかという鑑別を要する場面である。この点を検証するために、腎生検で診断された糖尿病性腎症と糖尿病合併があるが腎生検で他の腎疾患と診断された 25 例で血清 miRNA-125b-5p および miRNA-181b-5p の発現を比較検討したところ、miRNA-125b-5p と miRNA-181b-5p の血清レベルの比率(miRNA-125b-5p / miRNA-181b-5p)は、糖尿病性腎症の患者で有意に高く(図 14A)、miRNA-125b-5p / miRNA-181b-5p の発現比は糖尿病性腎症に対する優れた診断能を示した(図 14B)。これらの結果から miRNA-125b-5p および miRNA-181b-5p およびその組み合わせは糖尿病性腎症の特異的バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

糖尿病性腎症での miRNA の過剰発現、抑制が糖尿病性腎症に影響することはこれまでも報告されている³²³⁶。過去にトレプトゾトシン誘発糖尿病性腎症マウスにおいて、miRNA-21 阻害剤を投与することで間質性線維化減少やマクロファージ浸潤減少、ポドサイト喪失減少、線維化・炎症性遺伝子発現減少、さらにアルブミン尿を減少させることが報告されている³²。また、別の研究では、糖尿病性腎症マウスに対して超音波マイクロバブルシステム法を用いて腎臓へ miRNA-29 の過剰発現させたところ、メサンギウム領域の拡大と尿細管間質線維化を抑制し、アルブミン尿を減少させることが示されている³⁶。

本研究では、non-viral vector である PEI-NPs を用いて miRNA-125b-5p と miRNA-181b-5p を腎臓で過剰発現可能であった。miRNA-181b-5p を糖尿病性腎症マウスの腎臓に過剰発現させることで、糖尿病性腎症の病理学的特徴であるメサンギウム領域の縮小やアルブミン尿の減少が確認できた。また、miRNA-181b-5p を投与した群では、腎で多数の遺伝子の変化を認めた。変化した遺伝子

の中でも、miRNA-181b-5p のターゲット mRNA とされる Slc25a25 が 4 倍以上上昇していた。Slc25a25 はミトコンドリアにおいて ATP の恒常性の調節に重要とされている³⁷。さらに、既知のシグナル伝達経路に関与する他の 6 種類の mRNA (Gli3, Cry1, Erc2, Nr1d1, Creb3l3, Psme3) についても発現が変化していた。これらの遺伝子のうち、Cry1 は、細胞の安定化を乱すことで糖尿病性腎症に影響を与えることが報告されている³⁸。本研究で同定されたその他の mRNA については、過去に糖尿病性腎症の進展との関連は報告されていない。今後の研究でこれらの mRNA の糖尿病性腎症への役割を調べる必要がある。一方、miRNA-125b-5p については同様に方法により腎で発現上昇を誘導しても糖尿病性腎症進展に影響はなかった。この結果は miRNA-125b-5p の過剰発現の程度が不十分な可能性、miRNA-125b-5p の過剰発現が糖尿病性腎症の進展に関与していない可能性などが考えられ、今後さらに検討する必要がある。

5. 結論

miRNA-125b-5p および miRNA-181b-5p は糖尿病性腎症に対する有用な新規診断バイオマーカーになる可能性がある。さらに miRNA-181b-5p は糖尿病性腎症の治療標的になる可能性がある。

6. 引用文献

1. de Boer, I. H., A New Chapter for Diabetic Kidney Disease. *The New England journal of medicine*. 377: 885-887, 2017
2. Cho, N. H.; Shaw, J. E.; Karuranga, S.; Huang, Y.; da Rocha Fernandes, J. D.; Ohlrogge, A. W.; Malanda, B., IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes research and clinical practice*, 138: 271-281, 2018
3. Fineberg, D.; Jandeleit-Dahm, K. A.; Cooper, M. E., Diabetic nephropathy: diagnosis and treatment. *Nature reviews. Endocrinology*. 9: 713-723, 2013
4. Barrett, E. J.; Liu, Z.; Khamaisi, M.; King, G. L.; Klein, R.; Klein, B. E. K.; Hughes, T. M.; Craft, S.; Freedman, B. I.; Bowden, D. W.; Vinik, A. I.; Casellini, C. M., Diabetic Microvascular Disease: An Endocrine Society Scientific Statement. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 102: 4343-4410, 2017
5. Narita, T.; Hosoba, M.; Kakei, M.; Ito, S., Increased urinary excretions of immunoglobulin g, ceruloplasmin, and transferrin predict development of microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. *Diabetes care*. 29: 142-144, 2006
6. Niewczas, M. A.; Gohda, T.; Skupien, J.; Smiles, A. M.; Walker, W. H.; Rosetti, F.;

- Cullere, X.; Eckfeldt, J. H.; Doria, A.; Mayadas, T. N.; Warram, J. H.; Krolewski, A. S., Circulating TNF receptors 1 and 2 predict ESRD in type 2 diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 23: 507-15, 2012
7. Rasmussen, D. G. K.; Hansen, T. W.; von Scholten, B. J.; Nielsen, S. H.; Reinhard, H.; Parving, H. H.; Tepel, M.; Karsdal, M. A.; Jacobsen, P. K.; Genovese, F.; Rossing, P., Higher Collagen VI Formation Is Associated With All-Cause Mortality in Patients With Type 2 Diabetes and Microalbuminuria. *Diabetes care*. 41: 1493-1500, 2018
8. Papadopoulou-Marketou, N.; Kanaka-Gantenbein, C.; Marketos, N.; Chrousos, G. P.; Papassotiriou, I., Biomarkers of diabetic nephropathy: A 2017 update. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 54: 326-342, 2017
9. Cao, Q.; Chen, X. M.; Huang, C.; Pollock, C. A., MicroRNA as novel biomarkers and therapeutic targets in diabetic kidney disease: An update. *FASEB bioAdvances*. 1: 375-388, 2019
10. Sankrityayan, H.; Kulkarni, Y. A.; Gaikwad, A. B., Diabetic nephropathy: The regulatory interplay between epigenetics and microRNAs. *Pharmacological research*. 141: 574-585, 2019
11. Brenner, B. M.; Cooper, M. E.; de Zeeuw, D.; Keane, W. F.; Mitch, W. E.; Parving, H. H.; Remuzzi, G.; Snapinn, S. M.; Zhang, Z.; Shahinfar, S., Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *The New England journal of medicine*. 345: 861-869, 2001
12. Perkovic, V.; Jardine, M. J.; Neal, B.; Bompoint, S.; Heerspink, H. J. L.; Charytan, D. M.; Edwards, R.; Agarwal, R.; Bakris, G.; Bull, S.; Cannon, C. P.; Capuano, G.; Chu, P. L.; de Zeeuw, D.; Greene, T.; Levin, A.; Pollock, C.; Wheeler, D. C.; Yavin, Y.; Zhang, H.; Zinman, B.; Meininger, G.; Brenner, B. M.; Mahaffey, K. W., Canagliflozin and Renal Outcomes in Type 2 Diabetes and Nephropathy. *The New England journal of medicine*. 380: 2295-2306, 2019
13. Mann, J. F. E.; Ørsted, D. D.; Brown-Frandsen, K.; Marso, S. P.; Poulter, N. R.; Rasmussen, S.; Tornøe, K.; Zinman, B.; Buse, J. B., Liraglutide and Renal Outcomes in Type 2 Diabetes. *The New England journal of medicine*. 377: 839-848, 2017
14. Valihrach, L.; Androvic, P.; Kubista, M., Circulating miRNA analysis for cancer diagnostics and therapy. *Molecular aspects of medicine*. 72: 100825, 2020
15. Lu, Q.; Wu, R.; Zhao, M.; Garcia-Gomez, A.; Ballestar, E., miRNAs as Therapeutic Targets in Inflammatory Disease. *Trends in pharmacological sciences*. 40: 853-865, 2019
16. Kim, V. N.; Han, J.; Siomi, M. C., Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 10: 126-139, 2009

17. He, L.; Hannon, G. J., MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews. Genetics.* 5: 522-531, 2004
18. Friedman, R. C.; Farh, K. K.; Burge, C. B.; Bartel, D. P., Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research.* 19: 92-105, 2009
19. Dewanjee, S.; Bhattacharjee, N., MicroRNA: A new generation therapeutic target in diabetic nephropathy. *Biochemical pharmacology.* 155: 32-47, 2018
20. Gholaminejad, A.; Abdul Tehrani, H.; Gholami Fesharaki, M., Identification of candidate microRNA biomarkers in diabetic nephropathy: a meta-analysis of profiling studies. *Journal of nephrology.* 31: 813-831, 2018
21. Hesketh, E. E.; Czopek, A.; Clay, M.; Borthwick, G.; Ferenbach, D.; Kluth, D.; Hughes, J., Renal ischaemia reperfusion injury: a mouse model of injury and regeneration. *Journal of visualized experiments : JoVE.* 2014
22. Hesketh, E. E.; Vernon, M. A.; Ding, P.; Clay, S.; Borthwick, G.; Conway, B.; Hughes, J., A murine model of irreversible and reversible unilateral ureteric obstruction. *Journal of visualized experiments : JoVE.* 2014
23. Takeda, T.; Hosokawa, M.; Higuchi, K., Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of senescence. *Experimental gerontology.* 32: 105-109, 1997
24. Najafian, B.; Fogo, A. B.; Lusco, M. A.; Alpers, C. E., AJKD Atlas of Renal Pathology: diabetic nephropathy. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation.* 66: e37-38, 2015
25. Levey, A. S.; Bosch, J. P.; Lewis, J. B.; Greene, T.; Rogers, N.; Roth, D., A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Annals of internal medicine.* 130: 461-470, 1999
26. Imai, E.; Horio, M.; Nitta, K.; Yamagata, K.; Iseki, K.; Hara, S.; Ura, N.; Kiyohara, Y.; Hirakata, H.; Watanabe, T.; Moriyama, T.; Ando, Y.; Inaguma, D.; Narita, I.; Iso, H.; Wakai, K.; Yasuda, Y.; Tsukamoto, Y.; Ito, S.; Makino, H.; Hishida, A.; Matsuo, S., Estimation of glomerular filtration rate by the MDRD study equation modified for Japanese patients with chronic kidney disease. *Clinical and experimental nephrology.* 11: 41-50, 2007
27. Morishita, Y.; Yoshizawa, H.; Watanabe, M.; Imai, R.; Imai, T.; Hirahara, I.; Akimoto, T.; Ookawara, S.; Muto, S.; Nagata, D., MicroRNA expression profiling in peritoneal fibrosis. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine.* 169: 47-66, 2016
28. Schwarzenbach, H.; da Silva, A. M.; Calin, G.; Pantel, K., Data Normalization Strategies for MicroRNA Quantification. *Clinical chemistry.* 61: 1333-42, 2015

29. Vigneron, N.; Meryet-Figuière, M.; Guttin, A.; Issartel, J. P.; Lambert, B.; Briand, M.; Louis, M. H.; Vernon, M.; Lebailly, P.; Lecluse, Y.; Joly, F.; Krieger, S.; Lheureux, S.; Clarisse, B.; Leconte, A.; Gauduchon, P.; Poulain, L.; Denoyelle, C., Towards a new standardized method for circulating miRNAs profiling in clinical studies: Interest of the exogenous normalization to improve miRNA signature accuracy. *Molecular oncology*. 10: 981-992, 2016
30. Radonić, A.; Thulke, S.; Mackay, I. M.; Landt, O.; Siegert, W.; Nitsche, A., Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and biophysical research communications*. 313: 856-862, 2004
31. Morishita, Y.; Imai, T.; Yoshizawa, H.; Watanabe, M.; Ishibashi, K.; Muto, S.; Nagata, D., Delivery of microRNA-146a with polyethylenimine nanoparticles inhibits renal fibrosis in vivo. *International journal of nanomedicine*. 10: 3475-3488, 2015
32. Kölling, M.; Kaucsar, T.; Schauerte, C.; Hübner, A.; Dettling, A.; Park, J. K.; Busch, M.; Wulff, X.; Meier, M.; Scherf, K.; Bukosza, N.; Szénási, G.; Godó, M.; Sharma, A.; Heuser, M.; Hamar, P.; Bang, C.; Haller, H.; Thum, T.; Lorenzen, J. M., Therapeutic miR-21 Silencing Ameliorates Diabetic Kidney Disease in Mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 25: 165-180, 2017
33. Kloosterman, W. P.; Wienholds, E.; de Bruijn, E.; Kauppinen, S.; Plasterk, R. H., In situ detection of miRNAs in animal embryos using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nature methods*. 3: 27-29, 2006
34. Assmann, T. S.; Recamonde-Mendoza, M.; de Souza, B. M.; Bauer, A. C.; Crispim, D., MicroRNAs and diabetic kidney disease: Systematic review and bioinformatic analysis. *Molecular and cellular endocrinology* **2018**, 477, 90-102.
35. Ishii, H.; Kaneko, S.; Yanai, K.; Aomatsu, A.; Hirai, K.; Ookawara, S.; Ishibashi, K.; Morishita, Y., MicroRNAs in Podocyte Injury in Diabetic Nephropathy. *Frontiers in Genetics*. 11: 993, 2020
36. Chen, H. Y.; Zhong, X.; Huang, X. R.; Meng, X. M.; You, Y.; Chung, A. C.; Lan, H. Y., MicroRNA-29b inhibits diabetic nephropathy in db/db mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 22, 842-853, 2014
37. Satrústegui, J.; Pardo, B.; Del Arco, A., Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signaling. *Physiological reviews*. 87, 29-67, 2007
38. Olaoye, O. A.; Masten, S. H.; Mohandas, R.; Gumz, M. L., Circadian Clock Genes in Diabetic Kidney Disease (DKD). *Current diabetes reports*. 19: 42, 2019