

氏名	石井洋輝
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第622号
学位授与年月日	令和3年3月15日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第4条第2項該当
学位論文名	糖尿病性腎症に関する microRNA の同定-新規遺伝子治療法・バイオマーカー開発-
論文審査委員	(委員長) 齋藤 修 教授 (委員) 丹波 嘉一郎 教授 水上 浩明 教授

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

糖尿病性腎症は、糖尿病の主要な合併症であり、末期腎不全の主要な原因である。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。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おり、糖尿病性腎症特異的なバイオマーカーや治療薬の開発は腎臓病領域において喫緊の課題である。

近年、microRNA(miRNA)が、様々な疾患の病態生理過程において重要で多様な役割を果たしていることが報告され、がんや特定の炎症性疾患など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注目されており、一部では臨床での応用も開始されている。過去の先行研究では、いくつかの miRNA が糖尿病性腎症の病態に関与していることが示されているが、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。このことから糖尿病性腎症に関する miRNA を同定し、バイオマーカーや治療標的としての有用性を評価するためのさらなる研究が必要である。本研究では、糖尿病性腎症に関する miRNA を網羅的に検討し、糖尿病性腎症の特異的なバイオマーカーや治療薬としての可能性を明らかにした。

### 2 研究方法

2種類の糖尿病モデルマウス(db/db マウス、AKITA マウス)を用いて、糖尿病性腎症を生じた腎臓より miRNA を精製した。それぞれのマウスの腎臓での miRNA 発現変化をマイクロアレイ法により網羅的に解析し、発現上昇または低下している miRNA を選出した。選出した miRNA を Quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction(qRT-PCR)により確認した。この過程で選出された miRNA の inhibitor もしくは mimic の人工核酸を作成し、糖尿病モデルマウス (db/db マウス) に投与した。投与マウスでの miRNA・mimic の標的 miRNA の過剰発現(mimic 投与時)効率を検討した。また、腎重量、腎組織検査及び尿中アルブミンを用いて、miRNA・mimic の糖尿病性腎症抑制効果を評価した。さらに miRNA の標的 messenger RNA(mRNA)の変化を比較検討し、生体内での標的 miRNA の糖尿病性腎症の調節効果の機序を明らかにした。

さらに糖尿病性腎症患者の血清から miRNA を精製し、糖尿病モデルマウスで同定した糖尿病

性腎症で変化する miRNA の発現を測定した。その後、糖尿病性腎症で有意に上昇または低下している miRNA を同定した。これらの解析で糖尿病性腎症のバイオマーカーとして最も特異度、感度の高い miRNA を同定した。

### 3 研究成果

糖尿病モデルマウス(db/db マウス、AKITA マウス)を用いて糖尿病性腎症を生じた腎臓での miRNA 発現変化をマイクロアレイ法で解析し、2 種類のマウスで共に発現変化している miRNA を 15 種類同定した。さらに qRT-RCP 法を用いてそれらの miRNA を解析し、糖尿病性腎症で特異的に変化する miRNA である miRNA-125b-5p と miRNA-181b-5p を同定した。

次に、miRNA-125b-5p-mimic と miRNA-181b-5p-mimic を糖尿病モデルマウス(db/db マウス)に、non-viral vector であるポリエチレンイミン(in vivo jet PEI; PolyPlus-transfections)と複合体(miRNA-PEI-NPs)を形成させ投与したところ、miRNA の過剰発現(約 2 倍程度)が 1 週間程度持続した。miRNA-181b-5p-mimic-PEI-NPs を 10 週齢の db/db マウスに対して週 1 回、20 週齢まで合計 10 回尾静脈より投与したところ、糖尿病性腎症進展抑制効果を認めた。miRNA-181b-5p の糖尿病性腎症における機能を解明するため、miRNA-181b-5p を過剰発現させた db/db マウスの腎臓で変化する遺伝子をマイクロアレイ法で網羅的に解析した。無治療 db/db マウス群に比較して db/db マウス +miRNA-181b-5p-mimic-PEI-NPs 群では 4 倍以上変化した遺伝子が 51 種類(上昇 24 種類、低下 27 種類)あった。そのうち、miRNA-181b-5p の直接の標的 mRNA としてミトコンドリア機能保持に關与する Slc25a25 を同定した。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。10 シグナルリングパスウェイで 10 種類の mRNA 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。一方、miRNA-125b-5p-mimic-PEI-NPs も同様の方法で db/db マウスに投与したが糖尿病性腎症進展抑制効果を認めなかった。

さらに血清 miRNA-125b-5p の発現レベル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。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,  $p < 0.05$ )。さらに各個人で 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,  $p < 0.05$ )。

### 4 考察

miRNA-125b-5p と miR-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 については、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。

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、糖尿病性腎症で特異的に

変化する miRNA を特定した。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、糖尿病性腎症と糖尿病合併があるが他の腎疾患を区別することも可能であった。

本研究では、non-viral vector である PEI-NPs を用いて miRNA-125b-5p と miRNA-181b-5p を腎で過剰発現可能であった。そのうち 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る Slc25a25 が有意に発現変化していた。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, Creb313, 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。これらの結果は、miRNA-181b-5p が様々なシグナル伝達経路やミトコンドリア機能を調節することで糖尿病性腎症に影響を与えていることを示唆している。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示唆され、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。

## 論文審査の結果の要旨

研究目的の明確さ、研究方法の妥当性、特色性・独創性

糖尿病による糖尿病性腎症の発症機序を解明すべく miRNA を用いた研究で、研究手技としては遺伝子工学的に注目されている手法を用いている。研究デザインも miRNA 検索のため I 型糖尿病モデルマウスである AKITA mouse と II 型糖尿病モデルマウスである db/db mouse の miRNA 発現差を比較して、インスリン分泌量によらない高血糖がもたらす両疾患共通の糖尿病病態に着目し研究が進められている。また、そこで得られた知見を用い、腎生検病理所見より鑑別診断を行った 2 型糖尿病患者で腎症未発症糸球体腎炎患者と糖尿病性腎症の血清などに発現している miRNA を分析し、腎生検で得られた腎病理組織像との対比なども検証している。これらの実験モデルは、実臨床に則し、分子生物学的手法と病理学的アプローチを上手く融和した説得力のある研究方法である。

独創性についても、これまで miRNA を用いた糖尿病研究は多数報告されているが、腎生検で病理学的に診断が付いている糖尿病合併慢性糸球体腎炎と、糖尿病性腎症を miRNA の結果から鑑別可能化という点に取り組んだ研究はなく、極めて斬新的な試みと言える。

研究結果、考察、今後の展望について

AKITA mouse と II 型糖尿病モデルマウスである db/db mouse の miRNA の発現をマイクロアレイ解析それぞれ検討しており、共通の miRNA から miRNA-125b-5p と miRNA-181b-5p が選定され、このいずれの miRNA もモデル動物で糖尿病性腎症が発症する次期に一致して腎臓での発現量低下が認められる事も経時的な研究で証明しており、より病態に則した miRNA であることが伺えた。これらの結果から 2 つの miRNA 選定については科学的客観性や妥当性を十分満たす選択といえる。

次に、これら miRNA が腎臓の組織にどのように発現しているかを in situ hybridization 法を用いて証明しようと本研究では試みられた。結果は miRNA125b-5p では糸球体や尿細管で広汎な腎組織に発現が認められたのに対して miRNA-181b-5p では腎臓での発現が認められなかった。この結果を著者等は腎臓での miRNA-181b-5p の発現量が in situ hybridization での検出感度を下回ったためと推察しているが、腎組織での発現減少が生じる 12 週以前でも同様な結果であったかどうかや、hybridization に用いたプローブが正常組織でも反応するのかなどの検証が些か不足しており、この点については今後の研究での改善が望ましい。

以降の実験で、著者等は miRNA のうち、miRNA181-5p が治療応用可能かを検証している。miRNA181-5p-PEI-NP を作成し、マウスへの経静脈的投与により腎臓での過剰発現に成功し、尿蛋白低減効果やメサンギウム細胞増殖抑制、コラーゲン I および IV の抑制効果が示された。また、尿中アルブミン排泄量の低下も示しており、治療への応用が期待できる実験結果であった。この作用は、生理的な状態で発現している miRNA181-5p が欠乏して糖尿病性腎症が生じるのか、単に miRNA181b-5p の過剰発現が糖尿病性腎症の進展を抑制するのかが、in situ hybridization での腎組織発現が示されていないことから、もうひとつ明瞭ではなかったが、今後の検討で更に明確にされることを期待する。一方で、miRNA125b-5p については検証されておらず、miRNA181b-5p との組み合わせにより診断特異度が改善した結果の傍証となるような実験データが不足しており、今後これらの点を更に明確になることを期待する。

ヒトに対する臨床検査への応用については、腎生検で糖尿病性腎症と診断した症例と、糖尿病合併慢性糸球体腎炎と診断した症例の血清 miRNA の比較を行っており、本研究が臨床検査として有用であるかを検証する極めて重要な実験と言える。結果は miRNA125b-5p は糖尿病性腎症患者血清中により多く存在し miRNA181b-5p ではより減少していることが明らかとなった。また、これらの miRNA 測定による診断方法は、感度は比較的良好であるが、特異度は低いことも実験結果より明示している。この改善方法として、著者等は miRNA125b-5p と miRNA-181b-5p の比を算出し、感度、特異度ともに改善することを示した。本研究で腎生検を行った症例の GFR が低く、果たして進行した糖尿病性腎症にこれら miRNA がどの程度有効なのか、むしろ早期腎症に対してより有効であるのかなど、今後の研究結果で更に解明されることを期待する。一方で、このような miRNA を Vector により持続発現させた場合はどうなるかなど、動物実験においても更なる研究発展など期待が出来るとの意見が審査員より多数みられた。

## 最終試験の結果の要旨

本研究では I 型糖尿病、II 型糖尿病動物実験モデルを用い、マイクロアレイ法による検討で影

響の強い2つの miRNA、miRNA125b-5p と miRNA-181b-5p を選定し、これら miRNA の腎組織、並びに血清での変化を詳細に検討されている。特に、今回の研究では実験動物を用いたマイクロアレイの解析、in situ hybridization, miRNA 181-5p-PEI-NP の作成と組織染色など多岐に渡る実験手技で、I 型、II 型糖尿病に共通する miRNA を特定し、その miRNA が糖尿病性腎症にどのように影響を及ぼすか動物モデルを用いて解析している。更に、その結果を実臨床に応用すべく、腎生検病理組織像より糖尿病性腎症と診断した症例と、糖尿病合併、非糖尿病性糸球体腎炎と診断した症例の血清を用いて診断的有効性まで検討するに至った。基礎研究から得られた結果を実臨床に応用できるまで発展させたことは、医学部大学院生として十分な技能を習熟した証といえる。また、これら多岐に渡る検討を行ってきた申請者の実験能力の高さも、大学院生として賞賛に値するレベルに達している。実験計画や論理展開、統計解析といった点についても、本研究は申請者の能力が遺憾なく発揮されており、研究発表の質疑応答や学位論文の改訂についてもしっかりと対応できていた。

本研究は、大学院終了後にも引き続き継続研究するに値する非常に良いテーマであり、申請者の研究者としての飛躍も期待できることから、現状の実験スケジュールを維持、加速しながら更に研究に邁進されることを祈念している。また、本研究は自治医科大学大学院卒業並びに医学博士号取得に相応しい研究結果であると審査員全員一致で判定するに至った。