

表題：老化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—

論文の区分：博士課程

著者名：矢内克典

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4年1月7日申請の学位論文

目次

1. 緒言
2. 材料と方法
3. 結果
 - 1) 老化腎障害マウス腎における各群の腎障害の評価
 - 2) 老化腎障害モデルマウス腎で変化する miRNA の網羅的解析
 - 3) その他の腎疾患モデルマウスにおける miRNA-503-5p の腎での発現評価
 - 4) ヒト血清での老化腎障害における miRNA-503-5p のバイオマーカーとしての有用性の検討
 - 5) miRNA-503-5p の老化腎障害の治療薬としての有効性の検討
 - 6) miRNA-503-5p-inhibitor の尿細管間質線維化の治療薬としての有効性とその機序の検討
 - 7) miRNA-503-5p-inhibitor の腎糸球体硬化の治療薬としての有効性とその機序の検討
4. 考察
5. 結論
6. 引用文献

1. 緒言

老化腎障害（加齢に伴う腎機能低下）は末期腎不全、心血管疾患のリスクを増大させ生命予後を悪化させる (Levey et al., 2011)。しかし、全ての高齢者で加齢による腎機能低下が認められるわけではなく、高齢者の腎機能は加齢に伴い腎機能が低下する群とほとんど腎機能が低下しない群の 2 つの群に分かれる(van der Burgh et al., 2021)。従って、1) 高齢者腎構造的変化は、一律的な「加齢による生理的な腎機能低下」よりも個別的な「老化による腎障害 (加齢性腎障害)」であること、2) 老化腎障害は、その進展に何らかの調節分子が働いている可能性があること、が示唆される。しかし、老化腎障害を調節する分子やバイオマーカーは解明されておらず、治療薬も全く確立されていない。

近年、特異的バイオマーカーや治療法が確立されていなかった分野で、マイクロ RNA (miRNA) の有用性が注目されている (Benfey, 2003)。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 RNA で標的メッセンジャー RNA (mRNA) の発現を調節している (Didiano and Hobert, 2006)。現在、miRNA は人を含む哺乳類で 2,500 種類程度同定されており、1 つの miRNA が平均 200 種程度の mRNA 発現を調整し (Didiano and Hobert, 2006)、塩基配列は誰でも自由にアクセスできる公共のデータベース (miRBase: <https://mirbase.org/>) に登録されていること、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 (Lewis et al., 2015)、外因性に人工合成した miRNA-mimic/inhibitor を投与し生体内での発現を変化させ得ること (Lewis et al., 2015)、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 (Lewis et al., 2015)。このことから、老化腎障害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 も存在すると考えられるが未だ同定されていない。本研究では前記の目的を解決するために老化腎障害の腎臓で発現が変化する miRNA を同定し、miRNA を用いた老化腎障害の診断バイオマーカーおよび新規遺伝子治療法を開発することを目的とした。また本研究では上記目的のため、通常のマウスでは老化によっても顕著な腎障害を来すことが少ないため、加齢により老化腎障害をおこすことが確立されている senescence associated mouse prone (SAMP1) マウスを用いて、コントロールとして正常老化を示す senescence associated mouse resistant (SAMR1) マウスを用いて研究を行った。

2. 材料と方法

本研究で行うすべての動物実験は自治医科大学規定の拡散防止措置を遵守して行った。SAMP1 マウス、SAMR1 マウス、BALB/cCrSlc マウス、C57BL/6 マウス (8 週齢 (wks)、雄 ; 20-25 g) を日本エスエルシー株式会社 (静岡県、日本)、東京実験動物株式会社 (東京都、日本) より購入し、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。BALB/cCrSlc マウスより巣状糸球体硬化モデルマウス、C57BL/6 マウスより unilateral ureteral obstruction (UUO) モデルマウス (片側尿管結紮) を作成した。

老化腎障害モデルの作成

老化腎障害モデルマウス (SAMP1 マウス、10wks、雄) およびコントロールとして同系統の SAMR1 マウス (10wks、雄) を日本エスエルシー株式会社より購入し、それぞれ 50 週齢まで飼育を行った。SAMP1 マウスは白血病モデルマウスである AKR/J マウスとヘテロ遺伝子を持つマウスを交配させて得られた、腎萎縮を伴う、急速な老化を呈する老化腎障害モデルマウスである (Takeda et al., 1997)。

尿細管間質線維化モデル (UUO モデル) の作成

UUO モデルマウスは片側尿管結紮法により、過去の報告に沿って作成した (Hesketh et al., 2014)。具体的には、C57BL/6 マウスにイソフルラン (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, 日本) を用いて、誘導濃度 3.0%~5.0%、維持濃度 2.0%~3.0% の濃度で麻酔を施行した。直腸温が 37 度を保つように保温パッドの上にマウスを寝かせ、腹部表面の毛を脱毛クリームで排除し、高濃度アルコール (72%) を使用して消毒した後、外科用メスで、正中切開を行った。腹腔内の消化管臓器を腹腔外に綿棒で湿潤環境を保ちながら取り出し、左尿管を同定した。4-0 シルクブレードを用いて左尿管を結紮したのち、腹壁と皮膚を 3-0 ナイロンブレードで、縫合し皮膚表面を高濃度アルコール (72%) で消毒し、麻酔からの覚醒を確認した後にゲージに戻した。その 8 日後にイソフルランで再度麻酔導入を行い、血液サンプルを下大静脈から採取し、左腎臓を摘出した。コントロールとして腹部正中切開をしたのみで他は同様の手技を行ったマウスを Sham モデルマウスとした。

巣状糸球体硬化モデル (adriamycin-induced glomerulosclerosis model) の作成

過去に報告のある方法に沿って巣状糸球体硬化モデル: adriamycin-induced glomerulosclerosis model) を作成した (Jiang et al., 2018)。具体的には BALB/cCrSlc

マウスに 10 mg/体重 (kg)のアドリアマイシン [adriamycin:(ADA) 東京化成株式会社, 東京より購入] を体重ベースで尾静脈内に注入した。14 日後にイソフルランで麻酔導入 (誘導濃度 3.0%~5.0%、維持濃度 2.0%~3.0%) を行い、各動物の血液サンプルを下大静脈から採取し、左腎臓を摘出した。コントロールとして同量の生理食塩水を尾静脈内に投与したモデルを mock とした。

その他の腎障害モデル：急性腎障害モデル (acute kidney injury (AKI))、IgA 腎症モデル [high immunoglobulin A (HIGA)]の作成

急性腎障害モデルマウスとして、虚血再灌流急性腎障害マウスモデル (ischemia-reperfusion injury induced AKI model : IRI-AKI model)は過去の報告に沿って作成した (Aomatsu et al., 2020)。IgA 腎症マウスモデル (HIGA/NscSlc マウス、25wks、雌)およびコントロールとして同系統の BALB/cCrSlc マウス (25wks、雌) を日本エスエルシー株式会社より購入した (Kaneko et al., 2020)。

ヒト老化腎障害発症患者、高齢健常人からの血液採取

自治医科大学遺伝子解析研究倫理委員会および自治医科大学大学臨床研究倫理委員会の承認を受け、自治医科大学附属さいたま医療センター腎臓内科外来に通院している患者において、老化腎障害を発症した患者に説明文書を用いて口頭で説明し文書による同意を得た。老化腎障害は、estimated glomerular filtration rate (eGFR) $\text{cys} < 60$ ($\text{ml}/\text{min}/1.73\text{m}^2$)、かつ尿蛋白陰性、尿潜血陰性により臨床診断した (Dasgupta et al., 2007)。eGFR の算出については、血清クレアチニンよりも血清シスタチン C の方が腎機能を正確に示すため、血清シスタチン C より算出した。研究対象者の血液サンプルは研究責任者が連結可能匿名化し、自治医科大学附属さいたま医療センター循環器病臨床医学研究所の腎臓内科冷凍庫に保管した。高齢健常人の血清はコスモバイオ社 (東京都、日本) から購入し、血清シスタチン C の測定は SRL 社 (東京都、日本) へ外注し測定した。

マウス腎臓からの miRNA の抽出と quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

摘出した腎臓組織の皮質組織片 10 mg をシリコンホモジナイザーに入れ粉碎した後に、フィルターカラム破砕機 (QIA Shredder; Qiagen, Valencia, CA, USA)に移し、25°C、14,000×g、3 分で遠心分離を行い、濾液を新しいチューブへ移しクロロホルム 140 μL を加えた。その後 4°C で 12,000×g、15 分で遠心分離を行いタンパク質と核酸を分離した。上清液を新しいチューブへ移し 1.5 倍量の 100%エタノールを加えた。続いて、miRNeasy Mini Kit (Qiagen 社)を使用して DNA と RNA を分離し、total RNA を抽出した。miScript II RT Kit (Qiagen 社)を使用して、

全量 1 μ g の抽出 RNA を thermal cyclers を用いて 37°C で 60 分間インキュベート、95°C で 5 分間インキュベートし、逆転写反応を行い total RNA から complementary DNA (cDNA) を合成した。次に miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen 社) を使用し、95°C で 15 分間インキュベートした後、Real-time qRT-PCR は 熱サイクル (熱変性: 94°C で 15 秒間、アニーリングと伸長反応: 55°C で 30 秒間、70°C で 30 秒間) を 40 サイクル繰り返すことで施行した。miRNA-142a-3p、miRNA-142a-5p、miRNA-144-3p、miRNA-155-5p、miRNA-181d-5p、miRNA-205-5p、miRNA-342-3p、miRNA-451a、miRNA-503-5p、miRNA-802-5p、miRNA-1231-5p、let-7d-3p、RNU-6 のプライマーは Qiagen 社から購入した。内因性コントロールを RNU-6 として、その発現量を用いて $\Delta\Delta$ CT 法で各遺伝子の相対的発現を評価した (Bustin et al., 2009)。

マウス腎臓からの mRNA の抽出と qRT-PCR

抽出した腎臓組織の皮質組織片 30 mg をシリコンホモジナイザーに入れ粉碎した後に、RNeasy Mini Kit (Qiagen 社) を使用して、messenger RNA (mRNA) を抽出した。全量 1 μ g の抽出 mRNA を Superscript III First-strand Synthesis system (Life Technologies 社) を使用して thermal cyclers において 25°C で 10 分間インキュベート、50°C で 30 分間インキュベート、85°C で 5 分間インキュベートし、逆転写反応を行い mRNA から cDNA を合成した。Real-time qRT-PCR は 熱サイクル (熱変性: 95°C で 15 秒間、アニーリングと伸長反応: 60°C で 60 秒間) を 40 サイクル繰り返すことで行った。podocin、desmin、fibroblast-specific protein-1 (FSP-1)、Vimentin、I型コラーゲン、 α -smooth muscle actin (α -SMA)、transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)、B-cell lymphoma-2 (BCL-2)、mothers against decapentaplegic 7 (Smad7)、Smad2、Smad3、Bax、 β -アクチンのプライマーは、タカラバイオ社から購入した。内因性コントロールを β -アクチンとして、その発現量を用いて $\Delta\Delta$ CT 法で各遺伝子の相対的発現を評価した (Bustin et al., 2009)。

ヒト血清からの miRNA の抽出と qRT-PCR

nucleoSpin miRNA Plasma カラム (Macherey-Nagel) を用いて、200 μ L のヒト血清中の total RNA を単離した。その後、miScript II RT Kit (Qiagen 社) を用いて単離した RNA を逆転写し、miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen 社) を用いて 熱サイクル (熱変性: 94°C で 15 秒間、アニーリングと伸長反応: 55°C で 30 秒間、70°C で 30 秒間) を 40 サイクル繰り返すことで qRT-PCR 法を施行した。内因性コントロールは、血清の miRNA-423-5p を用い、その発現量を用いて $\Delta\Delta$ CT 法で各遺伝子の相対的発現を評価した (Liu et al., 2014)。miRNA-423-5p の配列は 5'-UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU-3' (Qiagen 社) である。ヒトの miRNA-

503-5p の配列は 5'-UAGCAGCGGGAACAGUUCUGCAG-3' (Qiagen 社) である。標的 miRNA の発現レベルを内因性コントロールと比較して正規化した。2- $\Delta\Delta$ CT 法を用いて、標的 miRNA の相対的な発現レベルを計算した (Bustin et al., 2009)。

マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析は、抽出した miRNA を北海道システムサイエンス社 (北海道、日本) へ外注し施行した。具体的な方法は miRNA Complete Labeling Reagent and Hyb Kit (Agilent Technologies 社)、miRNA Spike In Kit (Agilent Technologies) を使用して、miRNA の脱リン酸化と Cy3-pCp ライゲーションを施行した (Morishita et al., 2016)。miRNA Complete Labeling Reagent and Hyb Kit を使用して miRNA のハイブリダイゼーションを行った。miRNA は、Low Input Quick Amp Labeling Kit, One - Color (Agilent Technologies 社) を使用して Cy3 標識し、標識された miRNA サンプルを、遺伝子発現ハイブリダイゼーションキット (Agilent Technologies 社) を使用して、マウス miRNA マイクロアレイ 8x60K rel.21.0 (Agilent Technologies 社) に 65°C で 17 時間のハイブリダイズを行った。ハイブリダイゼーションを行った後、マイクロアレイを Gene Expression Wash Buffers Pack (Agilent Technologies 社) のコンポーネントで洗浄し、Agilent Technologies Microarray Scanner で 3 μ m の解像度でスキャンを行った。シグナル強度は、Agilent Feature Extraction ver.12.0.3.1 で評価した。

SAMP1 マウスに対する miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs の治療効果

マウスでの発現抑制 (inhibition) 用の miRNA-503-5p-inhibitor、及びコントロールの miRNA (negative control-miRNA) は、株式会社味の素社から購入した。miRNA-503-5p-inhibitor (株式会社味の素社) の配列は、5'-GACGGCGCUAGGAUCAUCAACCGCAGUACUGUUCGGCUGCUACAAGUAUUCUGGU-3' である。negative control-miRNA は、miRBase に登録されている miRNA とは相同しない合成配列であり、ネガティブコントロールである。200 μ L 中に 5 nmol の miRNA-503-5p-inhibitor が含まれるように、miRNA-503-5p-inhibitor と PEI-NPs を N/P ratio 6.0 で混合した。ネガティブコントロールについても同様に、200 μ L 中に 5 nmol の negative control-miRNA が含まれるように PEI-NPs を N/P ratio 6.0 で混合した。SAMP1 マウス (20wks ; 30-35 g) を、① SAMP1 マウス群 : 10 週間飼育のみ、② SAMP1+miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs マウス群 : SAMP1-20wks マウスに尾静脈から miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs を週 1 回、10 週間投与、③ SAMP1+negative control-miRNA-PEI-NPs マウス群 : SAMP1-20wks マウスに尾静脈から negative control-miRNA-PEI-NPs を週 1 回、10 週間投与、の 3 群に分け、30wks になった時点で各動物の左腎臓を採取し解析した。

UUO マウスに対する miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs の治療効果

SAMP1 への治療の実験と同様に、200 μ L 中に 5 nmol の miRNA-503-5p-inhibitor が含まれるように、miRNA-503-5p-inhibitor と PEI-NPs を N/P ratio 6.0 で混合した。また同様に 200 μ L 中に 5 nmol の negative control-miRNA が含まれるように PEI-NPs を N/P ratio 6.0 で混合した。C57BL/6 マウス (8wks ; 20-25 g) を、①Sham マウス群：腹部正中切開のみ、②UUO マウス群：片側尿管結紮手術、③UUO+miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs マウス群：UUO 手術の 1 日前、1 日後、3 日後に尾静脈から miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs を投与、④UUO+negative control-miRNA-PEI-NPs マウス群：UUO 手術の 1 日前、1 日後、3 日後に尾静脈から negative control-miRNA-PEI-NPs を投与、の 4 群に分け、手術 8 日後に各動物の左腎臓を採取し解析した。

単状糸球体硬化モデルマウスへの miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs の治療効果

SAMP1 への治療の実験と同様に、200 μ L 中に 5 nmol の miRNA-503-5p-inhibitor が含まれるように、miRNA-503-5p-inhibitor と PEI-NPs を N/P ratio 6.0 で混合した。また同様に 200 μ L 中に 5 nmol の negative control-miRNA が含まれるように PEI-NPs を N/P ratio 6.0 で混合した。BALB/c マウス (8wks ; 20-25 g) を、①mock マウス群：生理食塩水投与のみ、②アドリアマイシンマウス群：アドリアマイシン投与 (尾静脈より 10 mg/kg 投与)、③ アドリアマイシン投与+miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs マウス群：アドリアマイシン投与 1 日前、1 日後、4 日後、7 日後、10 日後に尾静脈から miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs を投与、④アドリアマイシン+negative control-miRNA-PEI-NPs マウス群：アドリアマイシン投与 1 日前、1 日後、4 日後、7 日後、10 日後に尾静脈から negative control-miRNA-PEI-NPs を投与、の 4 群に分け、アドリアマイシン投与 2 週間後に各動物の左腎臓を採取し解析した。

組織学的検査

マウス個体にリン酸緩衝食塩水を灌流後、腎臓組織を摘出し、4% paraformaldehyde で一晩固定化した。組織はパラフィンへ包埋した後、切片を作成し、periodic acid Schiff (PAS) 染色、AZAN 染色を行った。老化腎障害の組織評価として、尿細管間質の線維化、糸球体硬化で、尿細管の間質については AZAN 染色による線維化面積の割合 (200 倍で 10 視野)、糸球体硬化については PAS 染色による糸球体硬化スコアを、1 点:糸球体構造の変化なし、2 点:メサンギウム細胞の増殖、3 点:分節性硬化、4 点:全節性硬化として検体ごとに 50 個の糸球体をランダムに選出し、点数の平均値を算出して比較した (Rajj et al., 1984)。

統計学的検査

マイクロアレイのデータについては two-way analysis of variance (ANOVA) analysis を用い、post-hoc analysis には、Tukey-Kramer analysis を用いた。90 パーセントイルシフト法で標準化した上で SAMR1-10wks を基準とするベースライン補正を行った。その他のデータは平均±標準誤差で示した。2 群間の統計学的有意差は、Student's t test を用いた。3 群間、4 群間の統計学的有意差は one-way ANOVA analysis を用いて、post-hoc analysis には、Tukey-Kramer analysis を用いた。統計学的解析には JMP 13 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を使用した。P<0.05 を統計学的に有意なものとした (Kanda, 2013)。Propensity score matching は高齢健常人群、老化腎障害患者群に対して、年齢、性別を独立変数として調整して施行した。Caliper 係数は 0.25 とした。

3. 結果

1) SAM マウス腎臓における各群の腎障害の評価

老化腎障害の腎臓で変化する病理学的変化、分子学的変化の解析を行った。高齢 (50 週齢) 老化促進モデルマウス (SAMP1-50wks マウス)、若年 (10 週齢) 老化促進モデルマウス (SAMP1-10wks マウス)、高齢 (50 週齢) 正常老化モデルマウス (SAMR1-50wks マウス)、若年 (10 週齢) 正常老化モデルマウス (SAMR1-10wks マウス) を用いた。SAMR1-10wks マウス、SAMR1-50wks マウス、SAMP1-10wks マウス、SAMP1-50wks マウスで変化する病理学的変化、分子学的変化について解析した。それぞれ、各 SAMR1-10wks マウス (4 匹) と SAMR1-50wks マウス (4 匹)、SAMR1-50wks マウス (4 匹)、SAMP1-50wks マウス (4 匹) の腎臓で解析を行った。病理学的変化については SAMP1-50wks マウスの腎臓で SAMR1-10wks 群、SAMR1-50wks 群、SAMP1-10wks 群に比べて尿細管間質線維化、糸球体硬化を有意に認めた (図 1A-B、D-E)。また、分子学的変化についても、SAMP1-50wks マウスの腎臓で SAMR1-10wks 群、SAMR1-50wks 群、SAMP1-10wks 群に比べて尿細管間質線維化、糸球体硬化を有意に認めた (図 1C、F)。

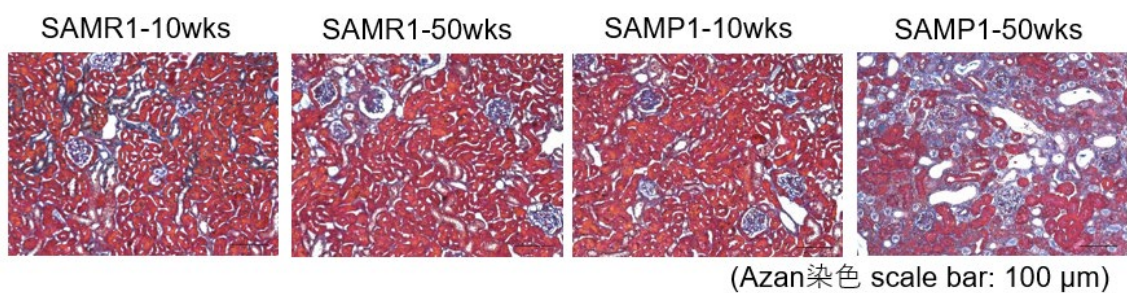
図 1 マウスにおける老化腎障害の評価

SAMR1-10wks 群、SAMR1-50wks 群、SAMP1-10wks 群、SAMP1-50wks 群の腎臓を採取し、組織学的解析、mRNA 発現解析を行った。(A) 尿細管間質線維化を AZAN 染色で評価した。組織像を 200 倍で観察、撮影した。Scale bar : 100 μ m。

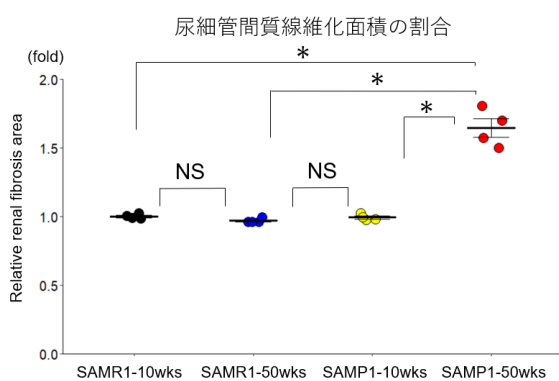
(B) AZAN 染色における腎臓の線維化を尿細管間質線維化の面積で定量化した (n=4)。(C) FSP-1 (左)、Vimentin (右) の mRNA 発現量を qRT-PCR 法で測定した (n=4)。(D) 腎糸球体硬化を PAS 染色で評価した。組織像を 200 倍で観察、撮影した。Scale bar : 50 μ m。(E) PAS 染色における腎糸球体硬化をスコア化で定量化した (n=4)。(F) Podocin の mRNA 発現量を qRT-PCR 法で測定した (n=4)。

データは平均 \pm 標準誤差。*P<0.05、one-way analysis of variance (ANOVA) 分析と Tukey-Kramer 分析。Abbreviation. FSP-1, fibroblast specific-protein-1; miRNA, microRNA; mRNA, messenger RNA; NS, non-significant; PAS, periodic acid staining; SAMP, senescence-accelerated mouse prone; SAMR, senescence-accelerated mouse resistant; wks, weeks-old age

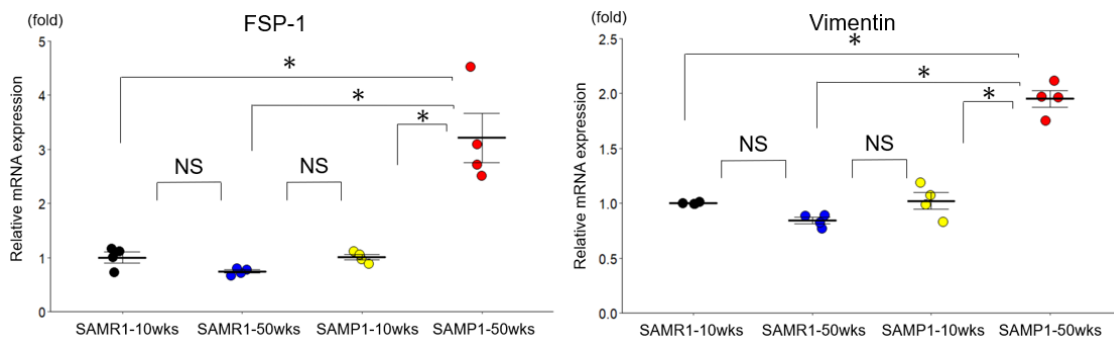
A:各群における腎組織学的変化 (尿細管間質線維化)



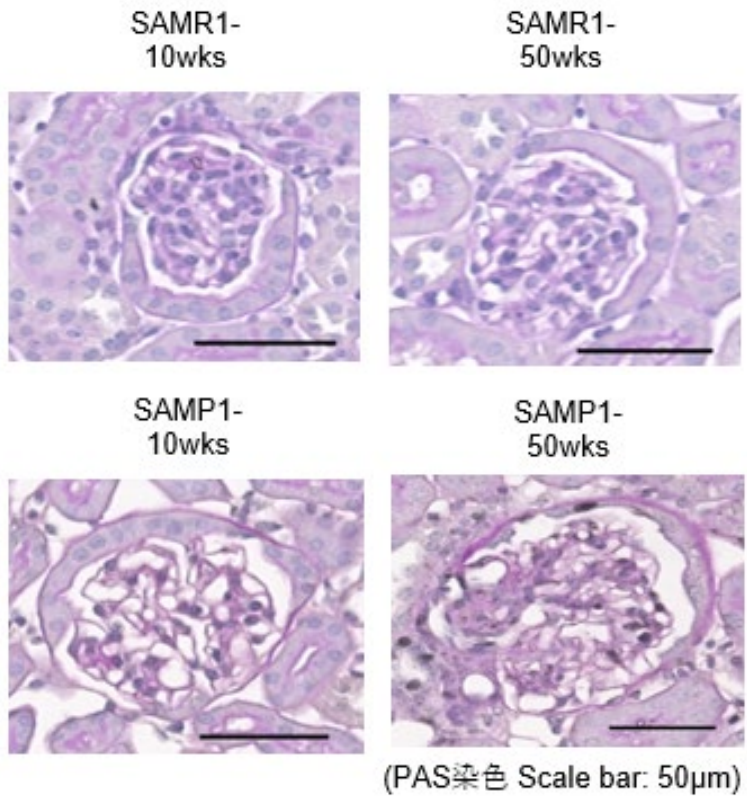
B:各群における尿細管間質線維化スコア



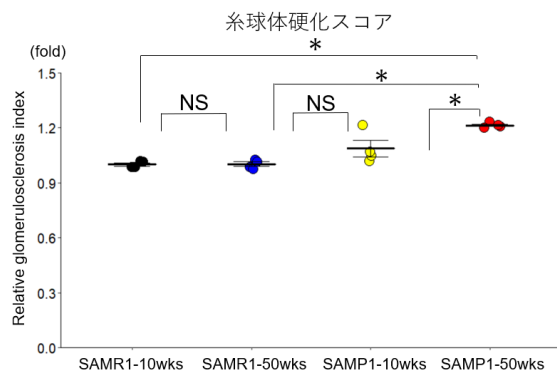
C:各群における腎遺伝子学的変化 (尿細管間質線維化)



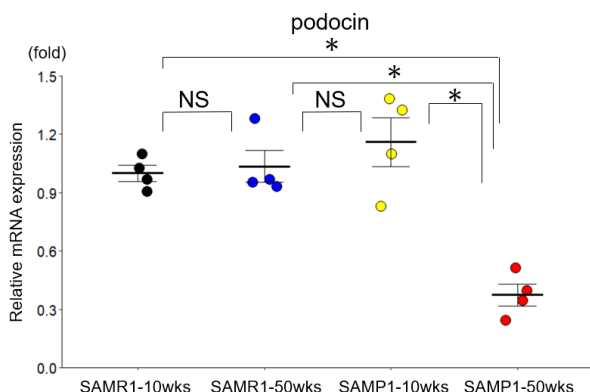
D:各群における腎組織学的変化 (糸球体硬化)



E:各群における腎糸球体硬化スコア



F:各群における腎遺伝子学的変化 (糸球体硬化)



以上の結果から、50 週齢の時点では SAMR1 では老化腎障害は認められず、SAMP1 でのみ老化腎障害が認められることが明らかになった。

2) 老化腎障害モデルマウス腎で変化する miRNA の網羅的解析

老化腎障害で変化する miRNA の解析とバイオマーカーとしての検討を行った。高齢老化促進モデルマウス (SAMP1-50wks)、若年老化促進モデルマウス (SAMP1-10wks)、コントロールマウスとして高齢正常老化モデルマウス (SAMR1-50wks)、若年正常老化モデルマウス (SAMR1-10wks) を用いた。SAMR1-10wks マウス、SAMR1-50wks マウス、SAMP1-10wks マウス、SAMP1-50wks マウスの腎で変化する miRNA をマイクロアレイ法で網羅的に比較検討した。それぞれ、各 SAMR1-10wks マウス (4 匹) と SAMR1-50wks マウス (4 匹)、SAMR1-10wks マウス (4 匹)、SAMP1-50wks マウス (4 匹) の腎臓で 1,881 種類の miRNA のマイクロアレイ解析を行った。解析は、SAMR1-10wks、SAMR1-50wks、SAMP1-10wks、SAMP1-50wks に対して独立変数を週齢 (SAMR1-10wks+SAMP1-10wks vs. SAMR1-50wks+SAMP1-50wks) と種 (SAMR1-10wks+SAMP1-10wks vs. SAMR1-50wks+SAMP1-50wks) とする two-way ANOVA と、one-way ANOVA による 4 群比較 (SAMR1-10wks vs. SAMR1-50wks vs. SAMP1-10wks vs. SAMP1-50wks) で有意差のあった miRNA を選出した。

まず、SAMP1-10wks および SAMP1-50wks マウス腎臓で SAMR1-10wks および SAMR1-50wks 群に比べて 2.0 倍以上変化している miRNA を 11 種類 (図 2A, 表 1)、SAMP1-50wks および SAMR1-50wks マウス腎臓で SAMR1-10wks 群に比べて 2.0 倍以上変化している miRNA を 1 種類 (図 2B, 表 2)、4 群間比較で 2.0 倍以上変化している miRNA を 6 種類 (図 2C, 表 3)、計 16 種類を選出した [図 2-3, 表 1-3]。

選出した 16 種類のうち 4 種類 (miRNA-467a-3p, miRNA-3091-5p, miRNA-

3095-3p、miRNA-6981-5p)の miRNA はヒトでの発現が報告されていないため、残りの 12 種類の miRNA の腎での発現を qRT-PCR 法で確認した (図 4)。その結果 6 種類の miRNA (miRNA-142a-3p, miRNA-142a-5p, miRNA-144-3p, miRNA-155-5p, miRNA-503-5p, miRNA-1231-5p)が、SAMP1-50wks マウス腎臓でコントロール群 (SAMR1-10wks マウス、SAMR1-50wks マウス、SAMP1-10wks マウス)に比較して有意に変化していた (図 4)

このうち miRNA-142a-3p, miRNA-142a-5p, miRNA-144-3p, miRNA-155-5p, miRNA-1231-5p はヒト血清での発現が qRT-PCR 法で同定できなかったため、SAMP1-50wks マウスのみで有意変化を認め、かつヒト血清で発現が qRT-PCR 法で同定可能であった miRNA-503-5p (図 4) に対して以後の研究を進めた。

図 2 SAM マウス腎臓で変化する miRNA のマイクロアレイ法によるクラスタリング図

SAMR1-10wks 群、SAMR1-50wks 群、SAMP1-10wks 群、SAMP1-50wks 群の腎臓を採取し、miRNA 発現解析をマイクロアレイ法により行った。(A) マイクロアレイによる SAMP1 マウス腎臓で SAMR1 マウス腎臓と比較して 2.0 倍以上有意に変化する miRNA (SAMR1-10wks +SAMR1-50wks vs. SAMP1-10wks+SAMP1-50wks) を選出した (n=4)。(B) マイクロアレイによる SAMP1-50wks マウスおよび SAMR1-50wks マウス腎臓で SAMP1-10wks マウスおよび SAMR1-10wks マウス腎臓と比較して 2.0 倍以上有意に変化する miRNA

(SAMR1-50wks +SAMP1-50wks vs. SAMR1-10wks+SAMP1-10wks) を選出した (n=4)。(C) マイクロアレイによる SAMR1-10wks マウス腎臓、SAMR1-50wks マウス腎臓、SAMP1-10wks マウス腎臓、SAMP1-50wks マウス腎臓において 4 群間比較で 2.0 倍以上有意に変化する miRNA (SAMR1-10wks vs. SAMR1-50wks vs. SAMP1-10wks vs. SAMP1-50wks) を選出した (n=4)。Abbreviation. miRNA, microRNA; SAMP, senescence-accelerated mouse prone; SAMR, senescence-accelerated mouse resistant; wks, weeks-old age

A: マイクロアレイによる SAMP1 マウス腎臓で SAMR1 マウス腎臓と比較して 2.0 倍以上有意に変化する miRNA (SAMR1-10wks +SAMR1-50wks vs. SAMP1-10wks+SAMP1-50wks)

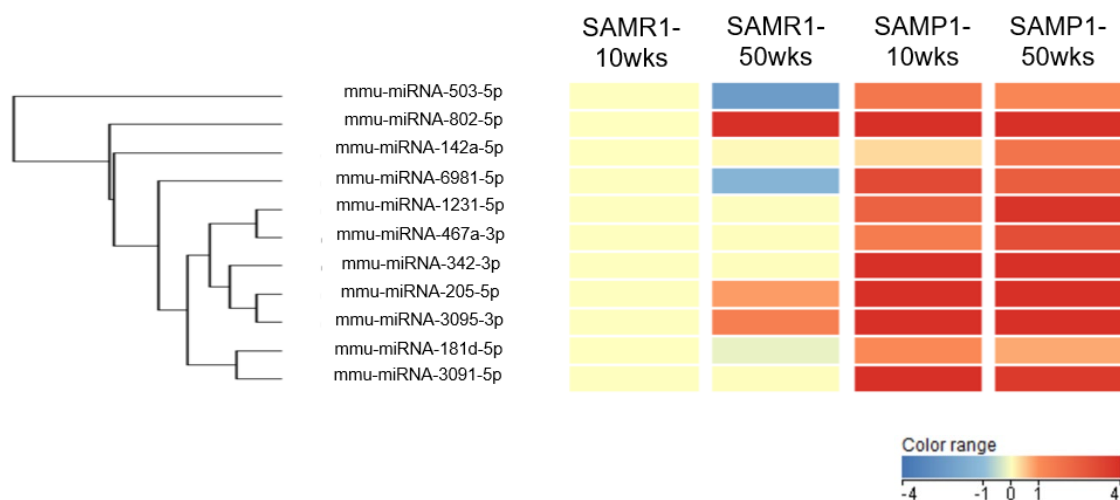


表 1. マイクロアレイによる SAMP1 マウス腎臓で SAMR1 マウス腎臓と比較して 2.0 倍以上有意に変化する miRNA (SAMR1-10wks +SAMR1-50wks vs. SAMP1-10wks+SAMP1-50wks)

microRNA	Sequences	SAMR1-10wks (references)	SAMR1- 50wks	SAMP1- 10wks	SAMP1- 50wks	Fold change (SAMP1 mice/ SAMR1 mice)	P value
miRNA-503-5p	CTGCAGTACT GTTCCC	1.00	0.19	3.22	2.34	6.25※	<0.05
miRNA-802-5p	AAGGATGAA TCTTTGTTAC TGA	1.00	17.0	16.4	18.0	4.16※	<0.05
miRNA-142a-5p	AGTAGTGCTT TCTACTTTA	1.00	1.04	1.26	3.44	2.04※	<0.05
miRNA-6981-5p	GCCTTCAGC CTCTTC	1.00	0.38	9.00	5.73	11.69※	<0.05
miRNA-1231-5p	TCTCTCCTGC AGCTCT	1.00	0.99	5.25	14.5	8.76※	<0.05
miRNA-467a-3p	TGTAGGTGT GTGTATGTAT A	1.00	1.02	2.95	8.05	4.83※	<0.05

miRNA-342-3p	ACGGGTGCG ATTCTGT	1.00	1.02	32.1	61.7	44.15※	<0.05
miRNA-205-5p	CAGACTCCG GTGGAAT	1.00	1.83	23.2	22.4	16.47※	<0.05
miRNA-3095-3p	AAAAGCTCT CTCTCCAGT	1.00	2.72	45.5	69.9	34.20※	<0.05
miRNA-181d-5p	ACCCACCGA CAACAATG	1.00	0.88	2.22	1.68	2.06※	<0.05
miRNA-3091-5p	GCGGGCCCA ACC	1.00	1.02	43.8	12.8	23.51※	<0.05

Abbreviation. miRNA, microRNA; SAMP, senescence-accelerated mouse prone; SAMR, senescence-accelerated mouse resistant; wks, weeks-old age; ※, SAMR1-10wks +SAMR1-50wks に比べて SAMP1-10wks+SAMP1-50wks において Tukey-Kramer analysis で有意差のあった miRNA.

図 2 B: マイクロアレイによる SAMP1-50wks マウスおよび SAMR1-50wks マウス腎臓で SAMP1-10wks マウスおよび SAMR1-10wks マウス腎臓と比較して 2.0 倍以上有意に変化する miRNA (SAMR1-50wks +SAMP1-50wks vs. SAMR1-10wks+SAMP1-10wks)

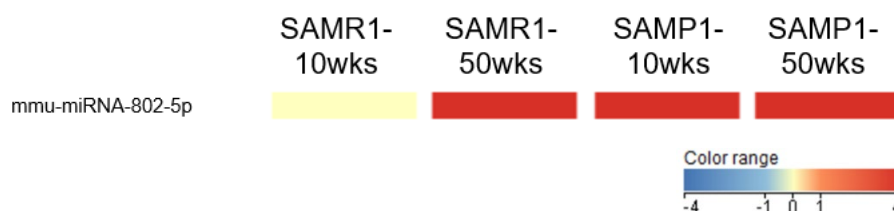


表 2. マイクロアレイによる SAMP1-50wks マウスおよび SAMR1-50wks マウス腎臓で SAMP1-10wks マウスおよび SAMR1-10wks マウス腎臓と比較して 2.0 倍以上有意に変化する miRNA (SAMR1-50wks +SAMP1-50wks vs. SAMR1-10wks+SAMP1-10wks)

microRNA	Sequences	SAMP1-10wks (references)	SAMP1-50wks	SAMP1-10wks	SAMP1-50wks	Fold change (50wks mice / 10wks mice)	P-value (ANOVA)
miRNA-802-5p	AAGGATGAA TCTTTGTTAC TGA	1.00	17.0	16.4	18.0	4.31※	<0.05

Abbreviation. miRNA, microRNA; SAMP, senescence-accelerated mouse prone; SAMR, senescence-accelerated mouse resistant; wks, weeks-old age; ※, SAMR1-10wks +SAMP1-10wks に比べて SAMR1-50wks+SAMP1-50wks において Tukey-Kramer analysis で有意差のあった miRNA.

図 2 C: マイクロアレイによる SAMR1-10wks マウス腎臓、SAMR1-50wks マウス腎臓、SAMP1-10wks マウス腎臓、SAMP1-50wks マウス腎臓において 4 群間比較で 2.0 倍以上有意に変化する miRNA (SAMR1-10wks vs. SAMR1-50wks vs. SAMP1-10wks vs. SAMP1-50wks)

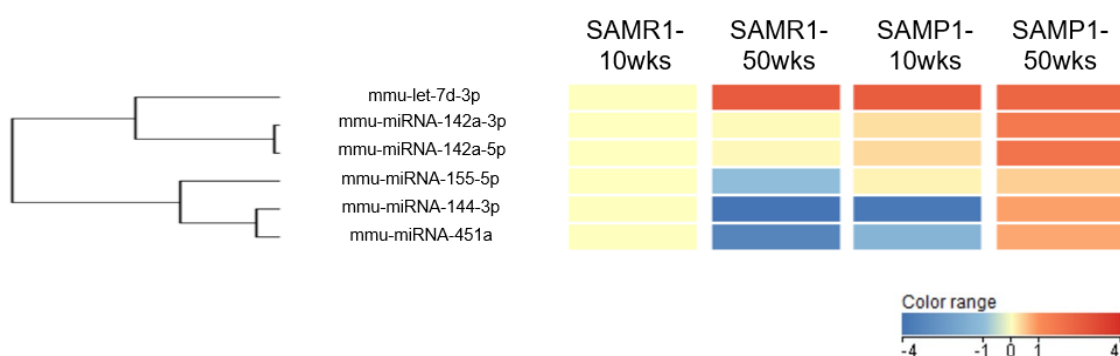


表 3. マイクロアレイによる SAMR1-10wks マウス腎臓、SAMR1-50wks マウス腎臓、SAMP1-10wks マウス腎臓、SAMP1-50wks マウス腎臓において 4 群間比較で 2.0 倍以上有意に変化する miRNA (SAMR1-10wks vs. SAMR1-50wks vs. SAMP1-10wks vs. SAMP1-50wks)

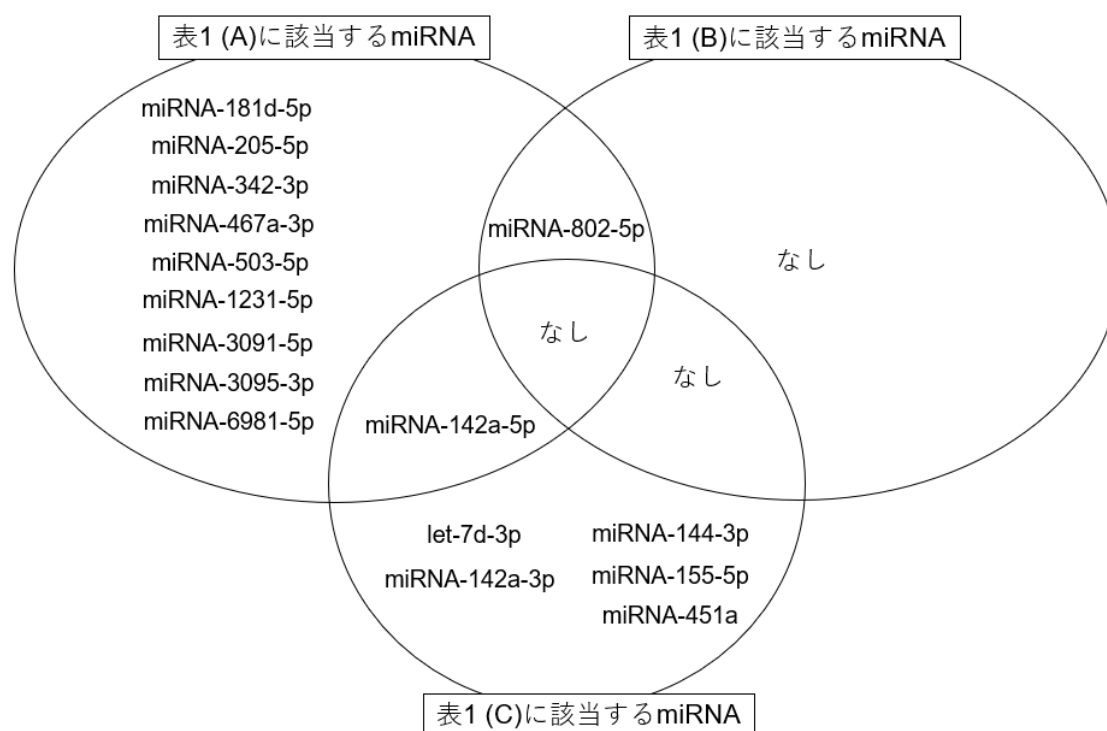
microRN	Sequences	SAMR1-10wks (references)	SAMR1-50wks	SAMP1-10wks	SAMP1-50wks	Fold change	P-value
let-7d-3p	AGAAAG	1.00	6.13	5.80	4.69	5.80※(SAMP1-10wks/SAMR1-10wks)	<0.05
	GCAGCA					6.13※(SAMR1-50wks/SAMR1-10wks)	
	GGTCGT					4.69※(SAMP1-50wks/SAMR1-10wks)	
miRNA-142a-3p	TCCATAA	1.00	1.03	1.22	3.10	3.01※(SAMP1-50wks/SAMR1-50wks)	<0.05
	AGTAGG					2.55※(SAMP1-50wks/SAMP1-50wks)	

	AAACACT ACA					SAMP1-10wks) 3.10※(SAMP1-50wks/ SAMR1-10wks)	
miRNA- 142a-5p	AGTAGTG CTTTCTA CTTTA	1.00	1.04	1.26	3.44	3.31※(SAMP1-50wks/ SAMR1-50wks) 2.72※(SAMP1-50wks/ SAMP1-10wks) 3.44※(SAMP1-50wks/ SAMR1-10wks)	<0.05
miRNA- 155-5p	ACCCCTA TCACAAT TAGC	1.00	0.48	1.08	1.34	2.77※(SAMP1-50wks/ SAMR1-50wks) -2.07※(SAMR1-50wks/ SAMR1-10wks) -2.23※(SAMR1-50wks/ SAMP1-10wks)	<0.05
miRNA- 144-3p	AGTACAT CATCTAT ACTGTA	1.00	0.01	0.07	1.78	-13.8※(SAMP1-10wks/ SAMR1-10wks) 301.0※(SAMP1-50wks/ SAMR1-50wks) 24.62※(SAMP1-50wks/ SAMP1-10wks) -168.8※(SAMR1-50wks/ SAMR1-10wks) -12.2※(SAMR1-50wks/ SAMP1-10wks)	<0.05
miRNA- 451a	AACTCAG TAATGGT AACGGTT T	1.00	0.10	0.37	1.70	-2.68※(SAMP1-10wks/ SAMR1-10wks) -9.79※(SAMR1-50wks/ SAMR1-10wks) 16.64※(SAMP1-50wks/ SAMR1-50wks) 4.55※(SAMP1-50wks/ SAMP1-10wks) -3.66※(SAMR1-50wks/ SAMP1-10wks)	<0.05

Abbreviation. miRNA, microRNA; SAMP, senescence-accelerated mouse prone;

SAMR, senescence-accelerated mouse resistant; wks, weeks-old age; ※, 4 群間比較で Tukey-Kramer analysis で有意差のあった miRNA (SAMR1-10wks vs. SAMR1-50wks vs. SAMP1-10wks vs. SAMP1-50wks).

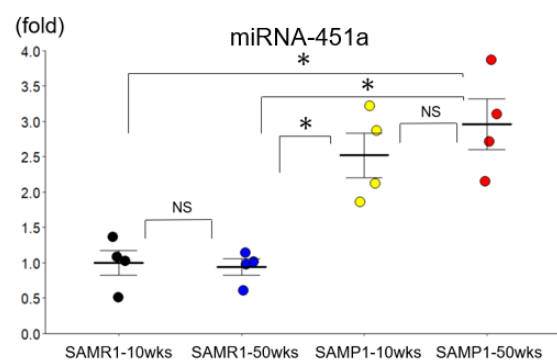
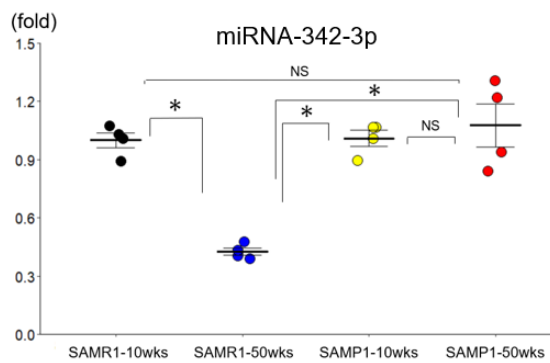
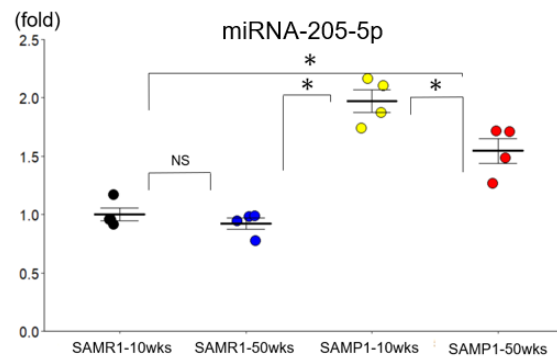
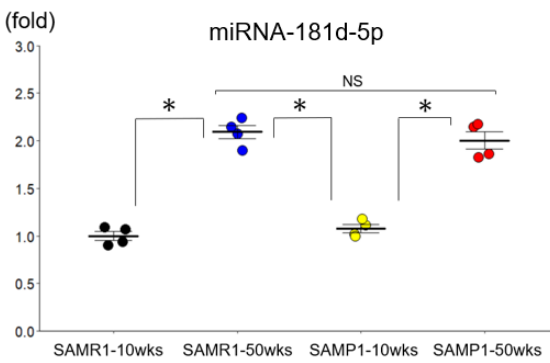
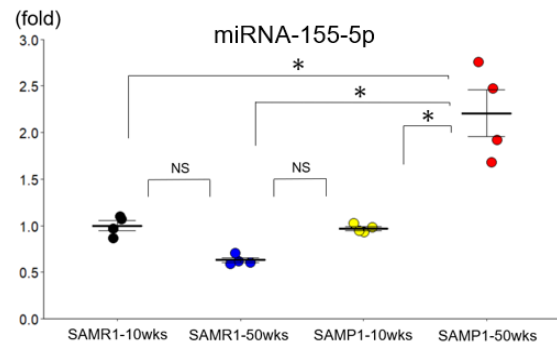
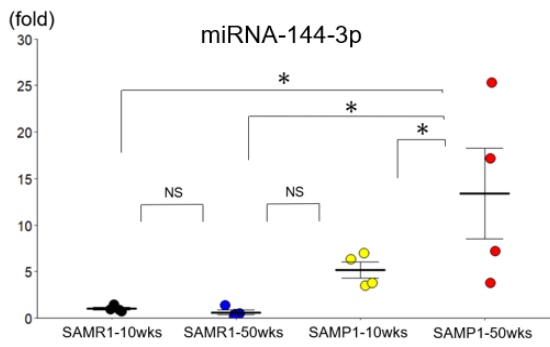
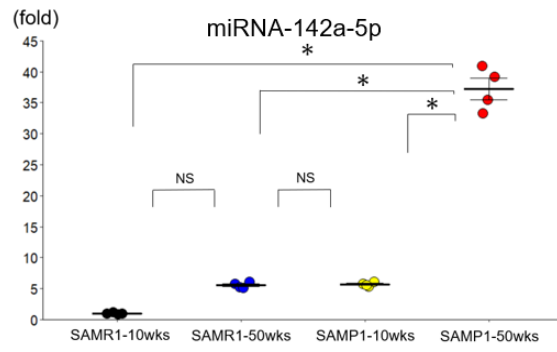
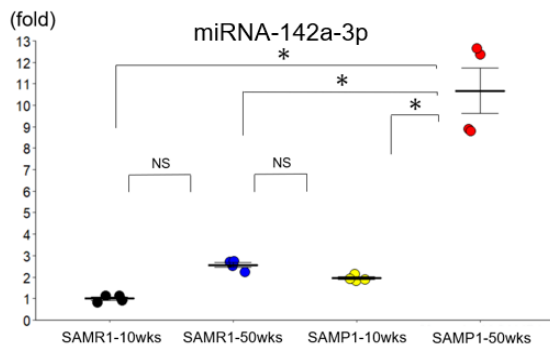
図 3: SAM マウス腎臓で変化する miRNA

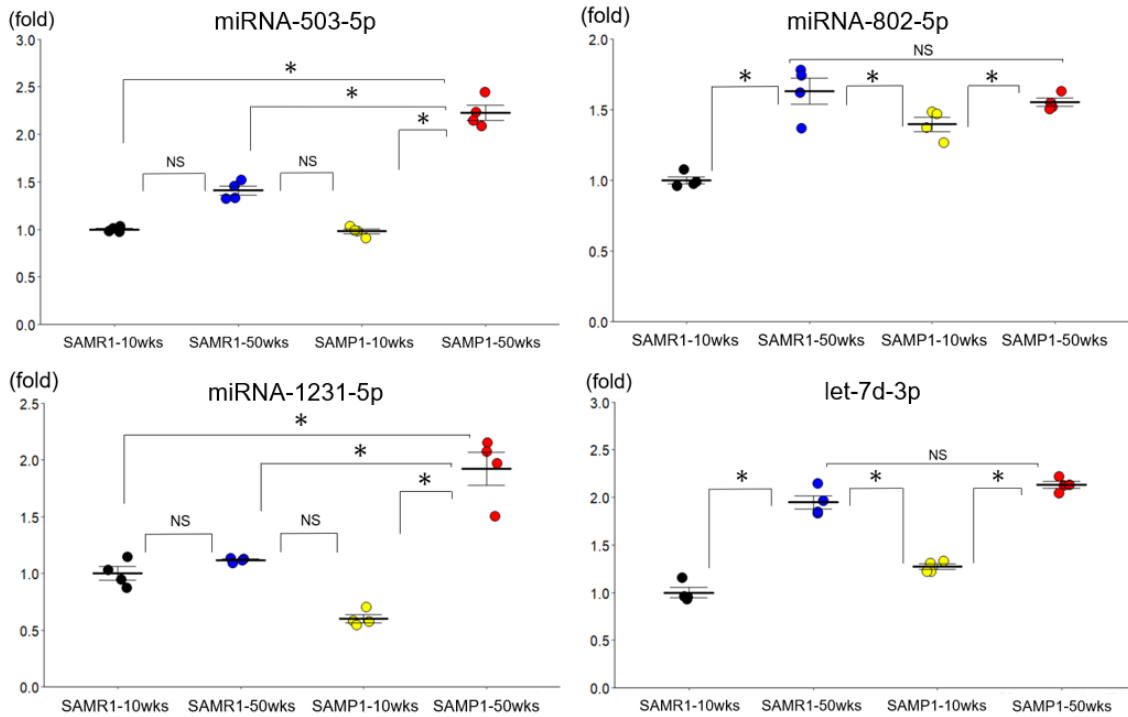


Abbreviation. miRNA, microRNA

図 4 SAM マウス腎臓で変化する miRNA の qRT-PCR 法による検証

SAMR1-10wks 群、SAMR1-50wks 群、SAMP1-10wks 群、SAMP1-50wks 群の腎臓を採取し、マイクロアレイ法で選出した miRNA について qRT-PCR 法で発現量を解析した (n=4)。 **Abbreviation.** miRNA, microRNA; NS, non-significant; SAMP, senescence-accelerated mouse prone; SAMR, senescence-accelerated mouse resistant; wks, weeks-old age, 平均±標準誤差, * P<0.05, one-way analysis of variance (ANOVA) analysis, Tukey-Kramer analysis





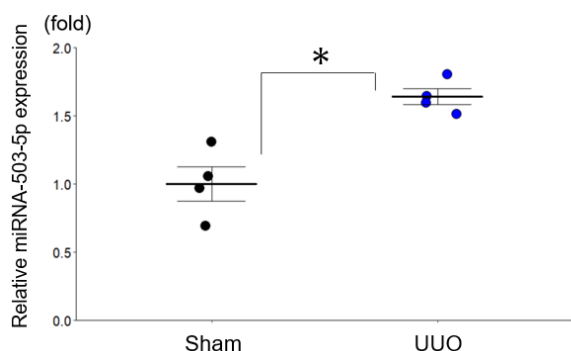
3) その他の腎疾患モデルマウスにおける miRNA-503-5p の腎臓での発現評価

尿細管間質線維化モデルマウス (UO マウス)、巣状糸球体硬化モデルマウス (Adriamycin 誘導マウス) の腎臓における miRNA-503-5p の発現レベルは、それぞれのコントロールマウスと比較して、有意差を認めたが、IgA 腎症モデルマウス (HIGA マウス)、虚血再灌流急性腎障害マウスモデル (IRI-AKI マウス) の腎臓における miRNA-503-5p の発現レベルは、それぞれのコントロールマウスと比較して、有意差を認めなかった (図 5)

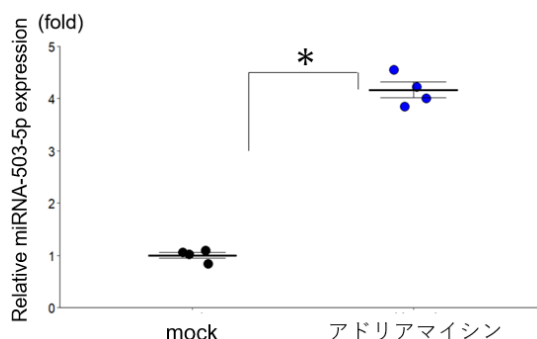
図 5 その他の腎疾患モデルマウス腎における miRNA-503-5p の変化

尿細管間質線維化 (UO)マウス、巣状糸球体硬化 (Adriamycin 誘導)マウス、IgA 腎症 (HIGA)マウス、虚血再灌流急性腎障害 (IRI-AKI)マウスにおける miRNA-503-5p の発現量を qRT-PCR 法により比較解析した。(A) 尿細管間質線維化 (UO)マウス腎における miRNA-503-5p の発現量を比較解析した (n=4)。(B) 巣状糸球体硬化マウス腎における miRNA-503-5p の発現量を比較解析した (n=4)。(C) IgA 腎症 (HIGA)マウス腎における miRNA-503-5p の発現量を比較解析した (n=4)。(D) 虚血再灌流急性腎障害 (IRI-AKI)マウス腎における miRNA-503-5p の発現量を比較解析した (n=4)。 **Abbreviation.** HIGA, high-immunoglobulin A; IRI, ischemia-reperfusion injury induced; miRNA, microRNA; NS, non-significant; UO, unilateral ureteral obstruction。平均±標準誤差, * P<0.05, student's t test

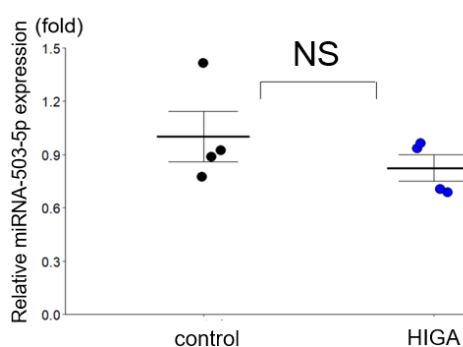
A: 尿細管間質線維化 (UUO)マウス



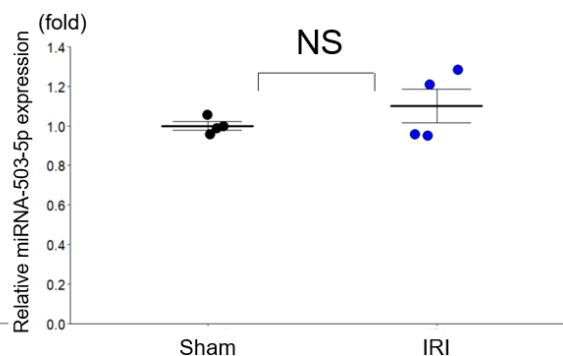
B: 巣状糸球体硬化 (Adriamycin 誘導)マウス



C: IgA 腎症 (HIGA)マウス



D: 虚血再灌流急性腎障害 (IRI-AKI)マウス



4) ヒト血清での老化腎障害における miRNA-503-5p のバイオマーカーとしての有用性の検討

老化腎障害患者 (13 例)(尿蛋白陰性、尿潜血陰性、eGFR $cys < 60 \text{ ml/min/1.73m}^2$ により臨床診断)での血清 miRNA-503-5p の発現量を健常人 (13 例)と qRT-PCR 法で比較検討した (表 4-5)。老化腎障害患者では、健常人と比較して miRNA-503-5p の相対発現量は統計学的有意差を持って上昇していた (老化腎障害 $2.10 \pm 0.27 \text{ fold}$ vs 高齢健常人 1.00 ± 0.28 , $P < 0.05$) (図 6)。以上の結果から血清 miRNA-503-5p は老化腎障害の診断バイオマーカーとして有効である可能性が示唆された。

表 4. 患者背景

患者背景	老化腎障害 (n=13)	高齢健常人 (n=13)
Age (years)	69.4±4.07	69.6±4.48
Male/Female	12/1	13/0
eGFR cys (ml/min/1.73m ²)	40.5±12.0	80.9±13.2

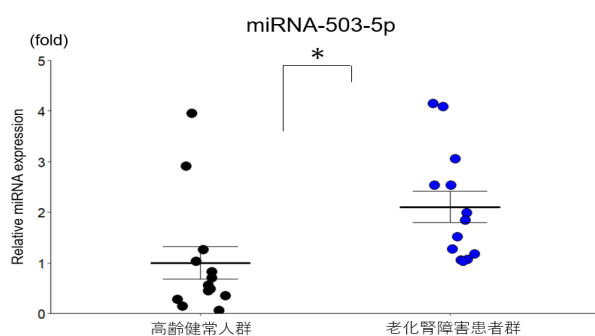
Abbreviations: eGFR, estimated glomerular filtration rate

表 5. Propensity score matching の結果

老化腎障害患者群					高齢健常人群				
症例	Age (years)	Sex	eGFR (ml/min/1.73m ²)	Propensity score	症例	Age (years)	Sex	eGFR (ml/min/1.73m ²)	Propensity score
5	70	Male	37.7	0.52	105	69	Male	81.8	0.43
10	68	Male	58.3	0.35	87	67	Male	63.5	0.27
16	65	Male	47.7	0.16	111	65	Male	72.1	0.16
26	76	Male	23.8	0.90	93	76	Male	87.1	0.90
28	66	Male	36.4	0.21	104	66	Male	79.5	0.27
30	76	Female	14.9	0.97	90	80	Male	89.2	0.97
42	73	Male	35.9	0.75	95	73	Male	84.7	0.75
53	72	Male	45.4	0.68	102	71	Male	94.1	0.60
61	68	Male	48.2	0.35	100	68	Male	64.5	0.35
64	66	Male	55.6	0.21	94	66	Male	112.1	0.21
66	65	Male	46.5	0.16	103	66	Male	69.5	0.21
67	65	Male	36.3	0.16	99	66	Male	74.3	0.21
71	72	Male	40.3	0.68	91	71	Male	79.1	0.60

Abbreviations: eGFR, estimated glomerular filtration rate

図6 老化腎障害 (検尿正常、eGFR $\text{cys} < 60 \text{ ml/min/1.73m}^2$ で臨床診断)における血清中のmiRNA-503-5pの発現量をqRT-PCR法により高齢健常人と比較解析した (n=13)。平均 \pm 標準誤差, * $P < 0.05$, Student's t test. **Abbreviations:** miRNA, microRNA



5) miRNA-503-5p の老化腎障害の治療薬としての有効性の検討

材料と方法で記したように SAMP1-10wks マウス群、SAMP1-20wks マウス群、SAMP1-30wks マウス群、SAMP1-40wks マウス群、SAMP1-50wks マウス群より腎臓を採取して miRNA-503-5p の発現量を比較検討した。その結果、SAMP1-20wks マウス群より miRNA-503-5p の発現量の上昇を認めた (図 7)。また、糸球体硬化マーカーである podocin の発現量も SAMP1-20wks マウスより有意な低下を認め (図 8A)、組織学的評価としては SAMP1-40wks マウスより有意に糸球体硬化を認めた (図 8B-C)。線維化については 50wks より線維化マーカー (FSP-1、Vimentin) の発現量上昇を認め (図 8D)、組織学的に 50wks より線維化の進行を認めた (図 8E, F)。従って、治療薬の有効性の検討については、SAMP1-20wks マウスに miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs および negative control-miRNA-PEI-NPs を週 1 回尾静脈投与し、30wks で各群より腎臓を採取して検討した。その結果、SAMP1-30wks マウス+miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs マウス群で他群に対して、腎臓での miRNA-503-5p の相対的な発現量が統計的に有意に低下した (SAMP1-30wks+miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs マウス群 0.11 ± 0.001 fold vs SAMP1-30wks マウス群 1.00 ± 0.63 fold, $P < 0.05$) (図 9)。組織学的評価では、SAMP1-30wks マウス群+miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs マウス群では SAMP1-30wks マウス群、SAMP1-30wks マウス+negative control-miRNA-PEI-NPs マウス群と比較して、糸球体硬化の改善を認めなかった (図 10A-B)。また糸球体硬化マーカー、線維化マーカーの腎での相対発現量に関して、SAMP1-30wks マウス+miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs マウス群では SAMP1-30wks マウス群と SAMP1-30wks マウス+negative control-miRNA-PEI-NPs マウス群と比較して、有意差を認めなかった (図 10C-F)。

図 7 SAMP1 マウスの各週齢における腎での miRNA-503-5p の相対発現量の比較
 SAMP1-10wks 群、SAMP1-20wks 群、SAMP1-30wks 群、SAMP1-40wks 群、SAMP1-
 50wks 群の腎臓を採取し、miRNA-503-5p の発現量を qRT-PCR 法により比較解析
 を行った (n=4)。データは平均±標準誤差。*P<0.05、one-way analysis of variance
 (ANOVA) 分析と Tukey-Kramer 分析。Abbreviation. miRNA, microRNA; SAMP,
 senescence-accelerated mouse prone; wks, weeks-old age

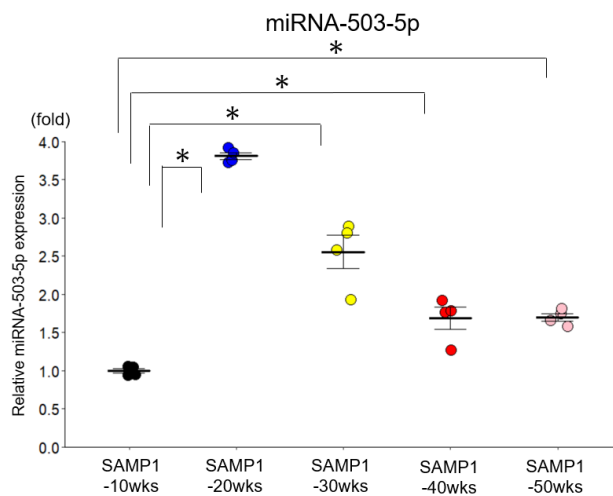
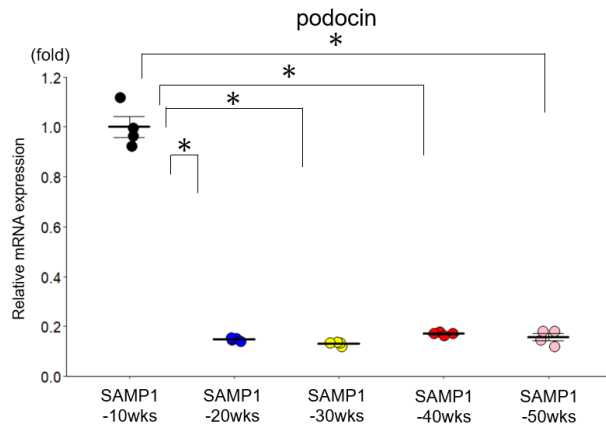
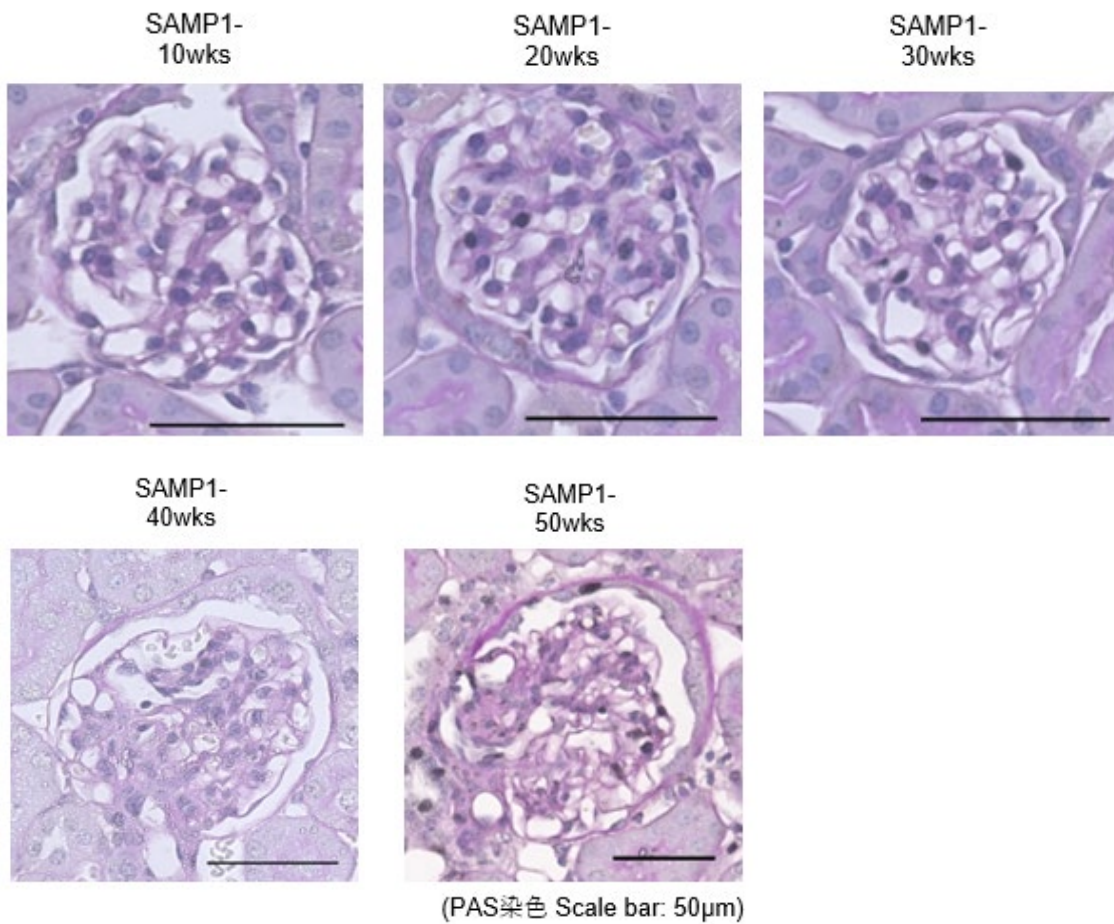


図 8 SAMP1 マウスの各週齢における腎障害の評価
 SAMP1-10wks 群、SAMP1-20wks 群、SAMP1-30wks 群、SAMP1-40wks 群、SAMP1-
 50wks 群の腎臓を採取し、組織学的解析、mRNA 発現解析を行った。(A) podocin
 の mRNA 発現量を qRT-PCR 法で測定した (n=4)。(B) 腎糸球体硬化を PAS 染色
 で評価した。組織像を 200 倍で観察、撮影した。Scale bar : 50 μ m。(C) PAS 染色
 における腎糸球体硬化をスコア化で定量化した (n=4)。(D) FSP-1 (左)、Vimentin
 (右) の mRNA 発現量を qRT-PCR 法で測定した (n=4)。(E) 尿細管間質線維化
 を AZAN 染色で評価した。組織像を 200 倍で観察、撮影した。Scale bar : 100 μ m。
 (F) AZAN 染色における腎臓の線維化を尿細管間質線維化の面積の割合で定量化
 した (n=4)。データは平均±標準誤差。*P<0.05、one-way analysis of variance
 (ANOVA) 分析と Tukey-Kramer 分析。Abbreviation. FSP-1, fibroblast specific-
 protein-1; miRNA, microRNA; mRNA, messenger RNA; NS, non-significant; PAS,
 periodic acid staining; SAMP, senescence-accelerated mouse prone; wks, weeks-old age

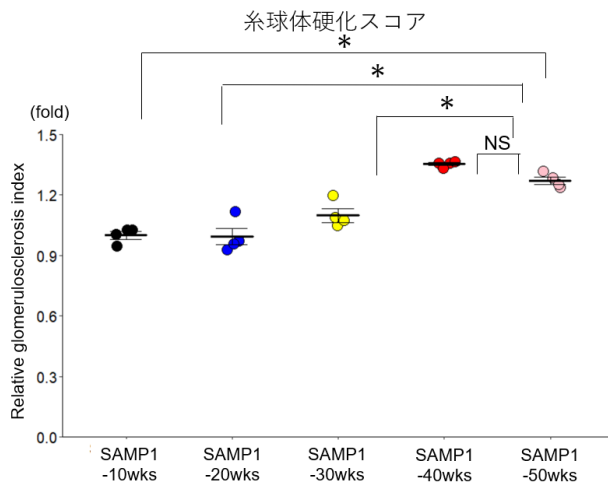
A: 各週齢における分子学的腎障害の評価 (糸球体硬化)



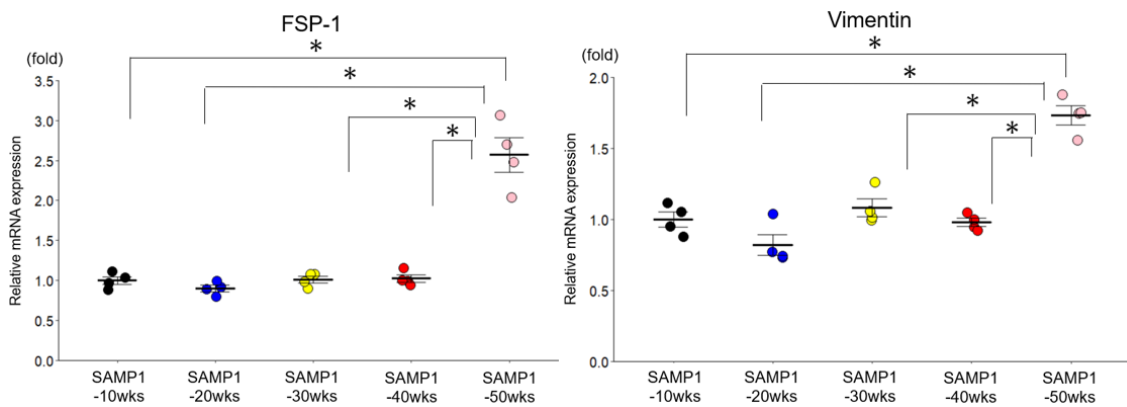
B: 各週齢における腎組織学的変化 (糸球体硬化)



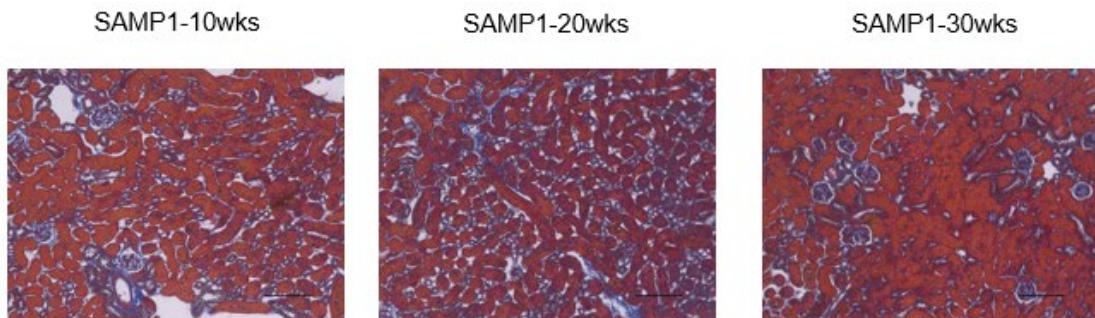
C:各週齢における腎系球体硬化スコア



D: 各週齢における分子学的腎障害の評価 (尿管間質線維化)



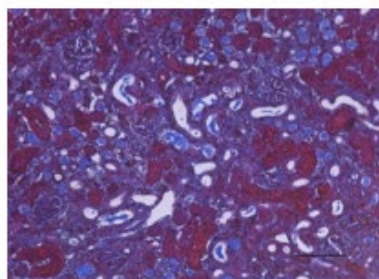
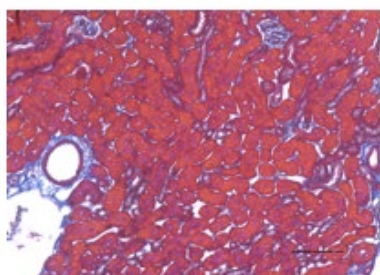
E:各週齢における腎組織学的変化 (尿管間質線維化)



(Azan染色 scale bar: 100 μm)

SAMP1-40wks

SAMP1-50wks



(Azan染色 scale bar: 100 μm)

F:各週齢における尿細管線維化面積の割合

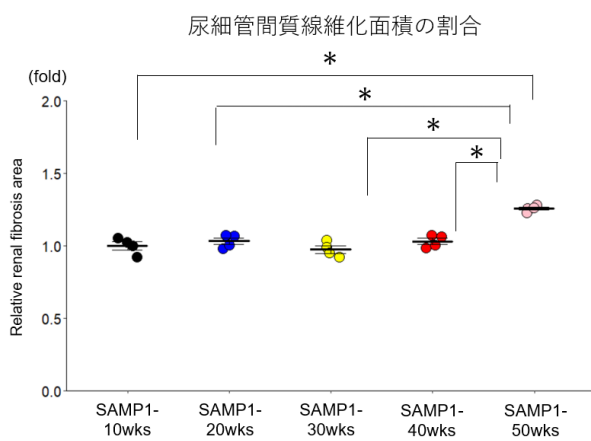


図9 miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs の治療的投与での各群における miRNA-503-5p の相対発現量の比較

SAMP1-30wks 群、SAMP1-30wks+miRNA-503-5p-inhibitor 群、SAMP1-30wks+negative control miRNA 群の腎臓を採取し、miRNA-503-5p の発現量を qRT-PCR 法により比較解析を行った (n=4)。データは平均±標準誤差。*P<0.05、one-way analysis of variance (ANOVA) 分析と Tukey-Kramer 分析。Abbreviation. miRNA, microRNA; NS, non-significant; SAMP, senescence-accelerated mouse prone; wks, weeks-old age

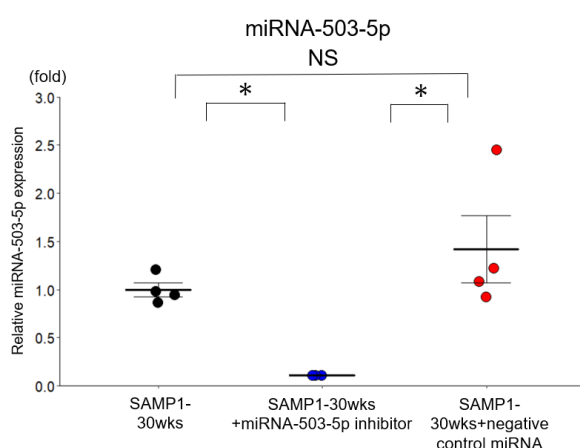
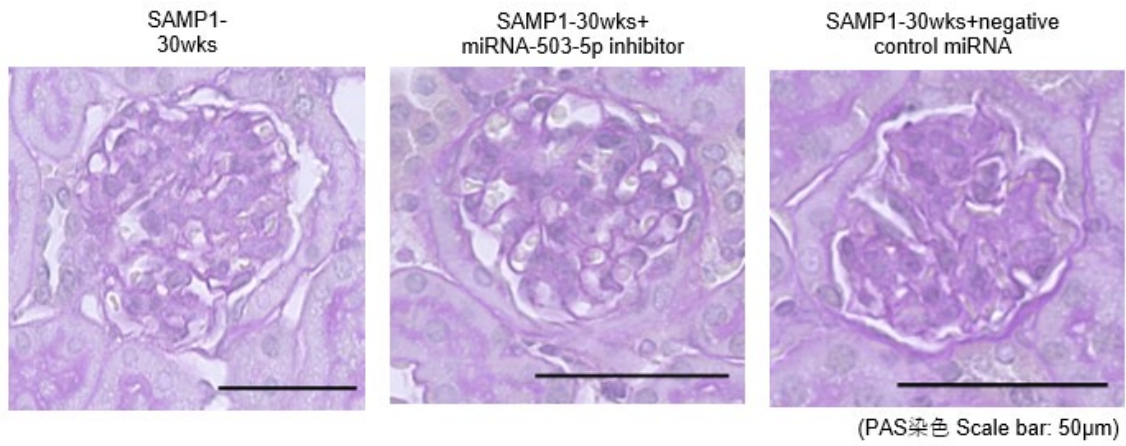
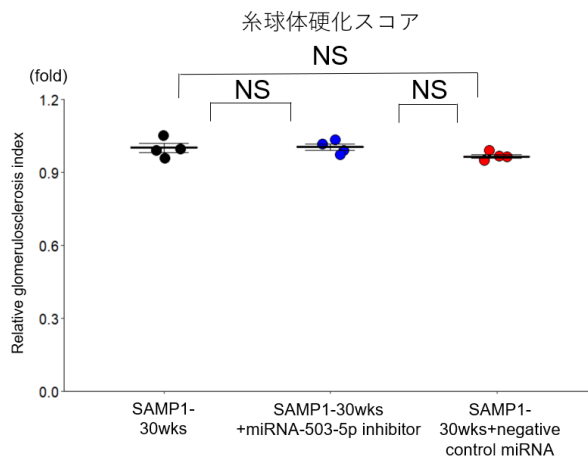


図10 miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs 投与による各群における治療効果の評価
SAMP1-30wks 群、SAMP1-30wks+miRNA-503-5p-inhibitor 群、SAMP1-30wks+negative control miRNA 群の腎臓を採取し、組織学的解析、mRNA 発現解析を行った。(A) 腎糸球体硬化を PAS 染色で評価した。組織像を 200 倍で観察、撮影した。Scale bar : 50 μ m。(B) PAS 染色における腎糸球体硬化をスコア化で定量化した (n=4)。(C) 尿細管間質線維化を AZAN 染色で評価した。組織像を 200 倍で観察、撮影した。Scale bar : 100 μ m。(D) AZAN 染色における腎臓の線維化を尿細管間質線維化の面積の割合で定量化した (n=4)。(E) podocin の mRNA 発現量を qRT-PCR 法で測定した (n=4)。(F) FSP-1 の mRNA 発現量を qRT-PCR 法で測定した (n=4)。データは平均±標準誤差。*P<0.05、one-way analysis of variance (ANOVA) 分析と Tukey-Kramer 分析。Abbreviation. FSP-1, fibroblast specific-protein-1; miRNA, microRNA; mRNA, messenger RNA; NS, non-significant; PAS, periodic acid staining; SAMP, senescence-accelerated mouse prone; wks, weeks-old age

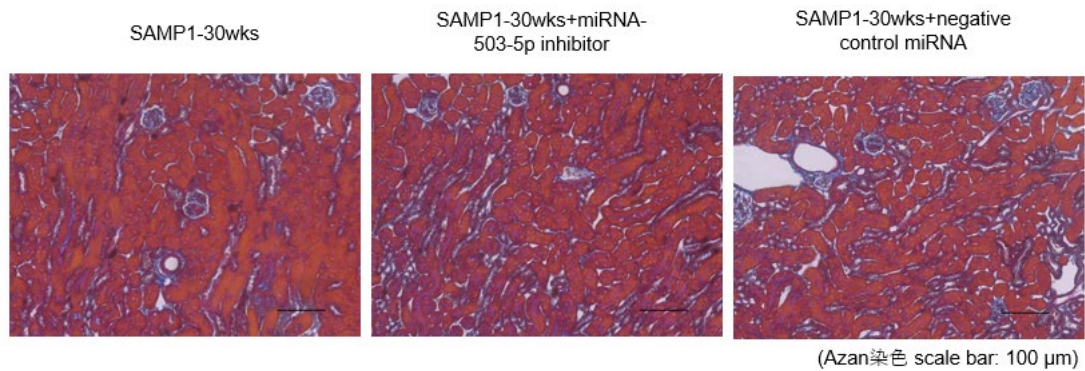
A: 各群における腎組織学的変化 (糸球体硬化)



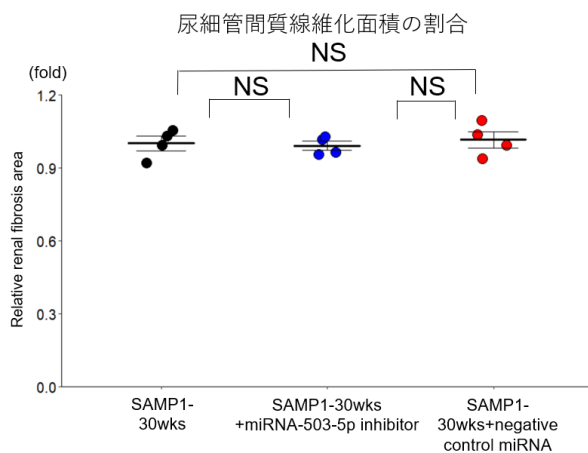
B: 各群における腎糸球体硬化スコア



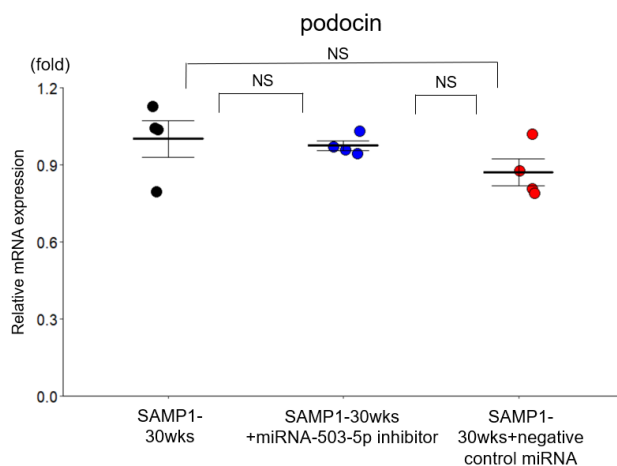
C: 各群における腎組織学的変化 (尿細管間質線維化)



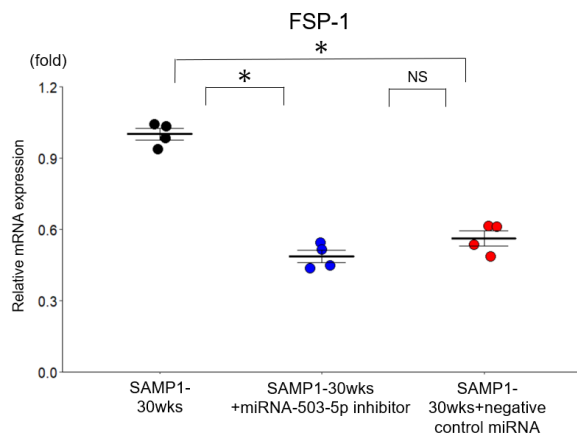
D:各群における尿細管間質線維化の割合



E:各群における腎系球体硬化に関連する分子学的評価



F:各群における尿細管間質線維化に関連する分子学的評価



次に miRNA-503-5p-inhibitor により老化腎障害で認められた病変（尿細管間質線維化、糸球体硬化）への効果について異なったモデルマウスを用いてその効果（尿細管間質線維化、糸球体硬化）を検証した。

6) miRNA-503-5p-inhibitor の尿細管間質線維化の治療薬としての有効性とその機序の検討

材料と方法で記したように Sham マウス群、UUO マウス群、UUO+miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs マウス群、UUO+negative control-miRNA-PEI-NPs マウス群では UUO 手術 1 日前、1 日後、3 日後に miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs および negative control-miRNA-PEI-NPs を投与し、術後 8 日後に各群より左腎臓を採取して検討した。その結果、UUO+miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs マウス群で他群に対して、腎臓での miRNA-503-5p の相対的な発現量が統計的に有意に減少した（UUO+miRNA-503-5p-inhibitor+PEI-NPs マウス群 0.61 ± 0.14 fold vs UUO マウス群 1.66 ± 0.05 fold, $P < 0.05$ ）（図 11）。組織学的評価では、UUO+miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs マウス群では UUO マウス群と UUO+negative control-miRNA-PEI-NPs マウス群と比較して、有意に組織学的に尿細管間質線維化の軽減を認めた（図 12A-B）。また UUO における尿細管間質線維化評価分子（I型コラーゲン、 α -SMA）の腎での相対発現量に関して、UUO+miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs マウス群では UUO マウス群と UUO+negative control-miRNA-PEI-NPs マウス群と比較して、有意低下を認めた（図 13A）。 α -SMA は各群で有意な変化は認められなかった（図 13B）。

図 11 UUO における miRNA-503-5p-inhibitor+PEI-NPs の投与での各群における腎臓での miRNA-503-5p の相対発現量の比較

Sham 群、UUO 群、UUO+miRNA-503-5p-inhibitor 群、UUO+negative control miRNA 群の腎臓を採取し、miRNA-503-5p の発現量を qRT-PCR 法により比較解析を行った (n=4)。データは平均±標準誤差。*P<0.05、one-way analysis of variance (ANOVA) 分析と Tukey-Kramer 分析。Abbreviation. miRNA, microRNA; NS, non-significant; UUO, unilateral ureteral obstruction

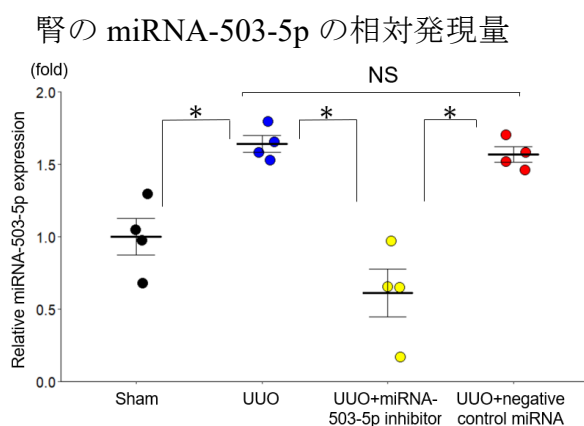
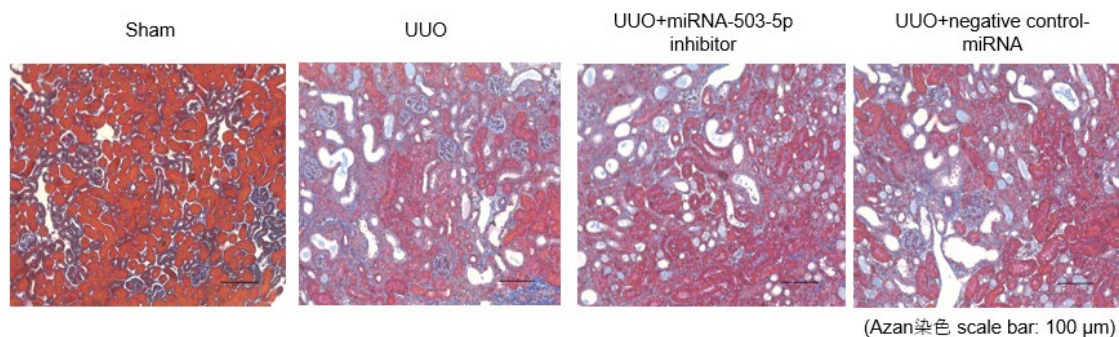


図 12 UUO における miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs の投与での各群の腎障害の評価

Sham 群、UUO 群、UUO+miRNA-503-5p inhibitor 群、UUO+negative control miRNA 群の腎臓を採取し、組織学的解析を行った。(A) 尿細管間質線維化を AZAN 染色で評価した。組織像を 200 倍で観察、撮影した。Scale bar : 100 μ m。(B) AZAN 染色における腎臓の線維化を尿細管間質線維化の面積の割合で定量化した (n=4)。データは平均±標準誤差。*P<0.05、one-way analysis of variance (ANOVA) 分析と Tukey-Kramer 分析。Abbreviation. miRNA, microRNA; NS, non-significant; UUO, unilateral ureteral obstruction

A:各群における腎組織学的変化



B:各群における尿細管間質線維化障害スコア

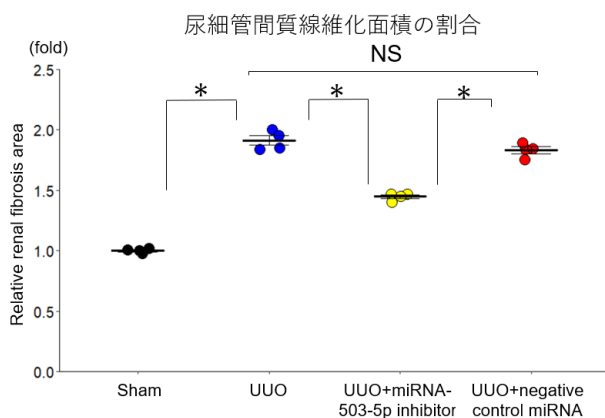
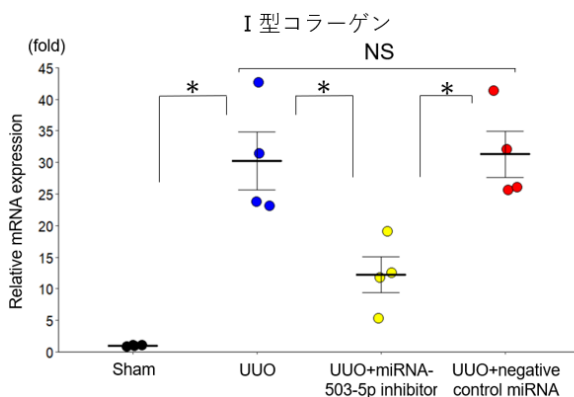


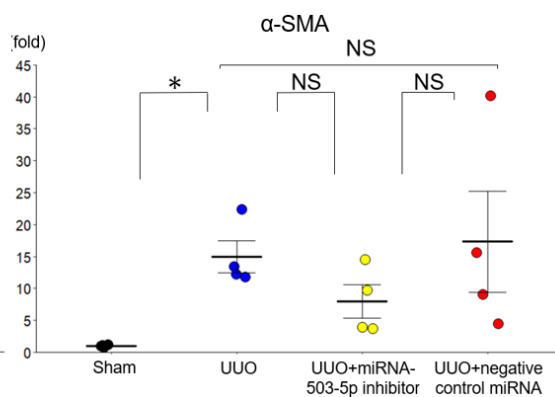
図 13 各群における分子学的腎障害評価

Sham 群、UUO 群、UUO+miRNA-503-5p-inhibitor 群、UUO+negative control miRNA 群の腎臓を採取し、mRNA 発現解析を行った。(A) I 型コラーゲンの mRNA 発現量を qRT-PCR 法で測定した (n=4)。(B) α -SMA の mRNA 発現量を qRT-PCR 法で測定した (n=4)。データは平均 \pm 標準誤差。*P<0.05、one-way analysis of variance (ANOVA) 分析と Tukey-Kramer 分析。**Abbreviation.** α -SMA, α -smooth muscle actin; miRNA, microRNA; mRNA, messenger RNA; NS, non-significant; UUO, unilateral ureteral obstruction

A: 腎のI型コラーゲンの相対発現量



B: 腎の α -SMA の相対発現量

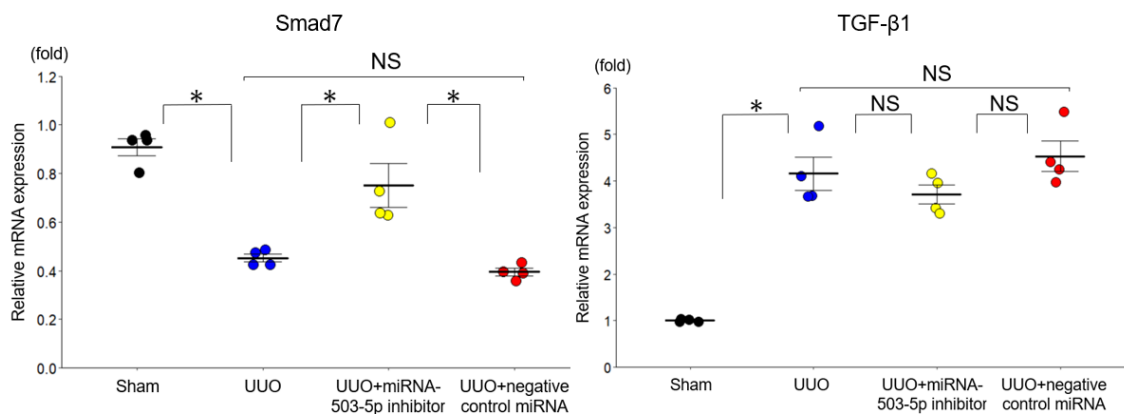


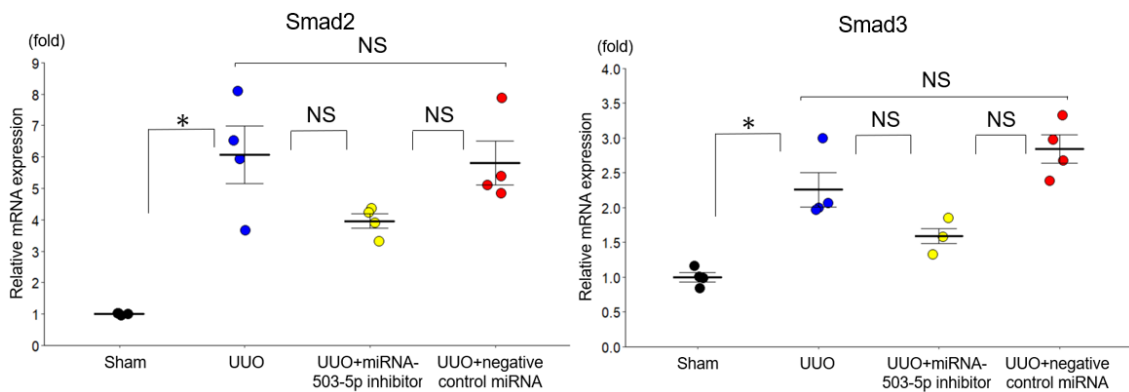
miRNA-503-5p-inhibitor の尿細管間質線維化進展抑制機序の解析

Sham マウス群、UUO マウス群、UUO+miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs マウス群、UUO+negative control-miRNA-PEI-NPs マウス群の腎臓で Target scan (http://www.targetscan.org/vert_72/)を用いて尿細管間質線維化進展抑制機序の解析を行った。miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs は Smad7 の発現量を上昇させることで尿細管間質線維化の進展を抑制する可能性があることが示唆された (図 14)。

図 14 miRNA-503-5p-inhibitor の尿細管間質線維化抑制機序の検討

Sham 群、UUO 群、UUO+miRNA-503-5p-inhibitor 群、UUO+negative control miRNA 群の腎臓を採取し、Smad7、TGF- β 1、Smad2、Smad3 の mRNA 発現解析を qRT-PCR 法により行った。(n=4)。データは平均 \pm 標準誤差。*P<0.05、one-way analysis of variance (ANOVA) 分析と Tukey-Kramer 分析。**Abbreviation.** miRNA, microRNA; mRNA, messenger RNA; NS, non-significant; Smad, mothers against decapentaplegic; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1; UUO, unilateral ureteral obstruction





6) miRNA-503-5p-inhibitor の腎糸球体硬化の治療薬としての有効性とその機序の検討

材料と方法で記したように mock マウス群、アドリアマイシンマウス群、アドリアマイシン+miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs マウス群、アドリアマイシン+negative control-miRNA-PEI-NPs マウス群ではアドリアマイシン投与 1 日前、1 日後、4 日後、7 日後、10 日後に miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs および negative control-miRNA-PEI-NPs を投与し、アドリアマイシン投与 2 週間後に各群より左腎臓を採取して検討した。その結果、アドリアマイシン+miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs マウス群で他群に対して、腎臓での miRNA-503-5p の相対的な発現量が統計的に有意に減少した(アドリアマイシン+miRNA-503-5p-inhibitor+PEI-NPs マウス群 0.38 ± 0.03 fold vs アドリアマイシンマウス群 4.16 ± 0.13 fold, $P < 0.05$) (図 15)。組織学的評価では、アドリアマイシン+miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs マウス群ではアドリアマイシンマウス群とアドリアマイシン+negative control-miRNA-PEI-NPs マウス群と比較して、有意に組織学的に腎糸球体硬化の軽減を認めた (図 16A-B)。またアドリアマイシンマウスにおける腎糸球体硬化評価分子 (desmin) の腎での相対発現量に関して、アドリアマイシン+miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs マウス群ではアドリアマイシン+negative control-miRNA-PEI-NPs マウス群と比較して、低下傾向にあったが、有意差は認めなかった (図 17)。

図 15 アドリアマイシンマウスにおける miRNA-503-5p-inhibitor+PEI-NPs の投与での各群における腎臓での miRNA-503-5p の相対発現量の比較

mock 群、アドリアマイシン群、アドリアマイシン+miRNA-503-5p-inhibitor 群、アドリアマイシン+negative control miRNA 群の腎臓を採取し、miRNA-503-5p の発現量を qRT-PCR 法により比較解析を行った (n=4)。データは平均±標準誤差。*P<0.05、one-way analysis of variance (ANOVA) 分析と Tukey-Kramer 分析。

Abbreviation. miRNA, microRNA; NS, non-significant

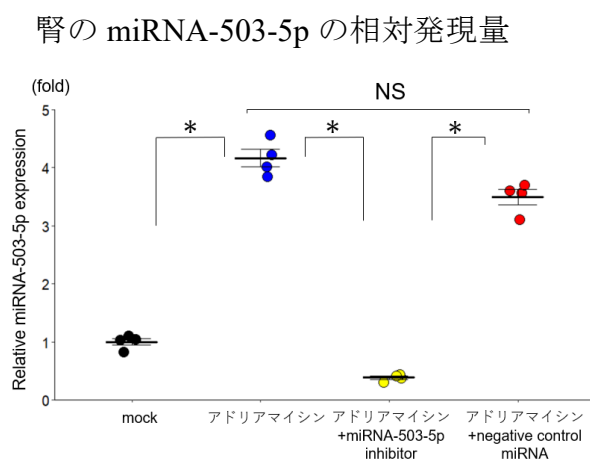
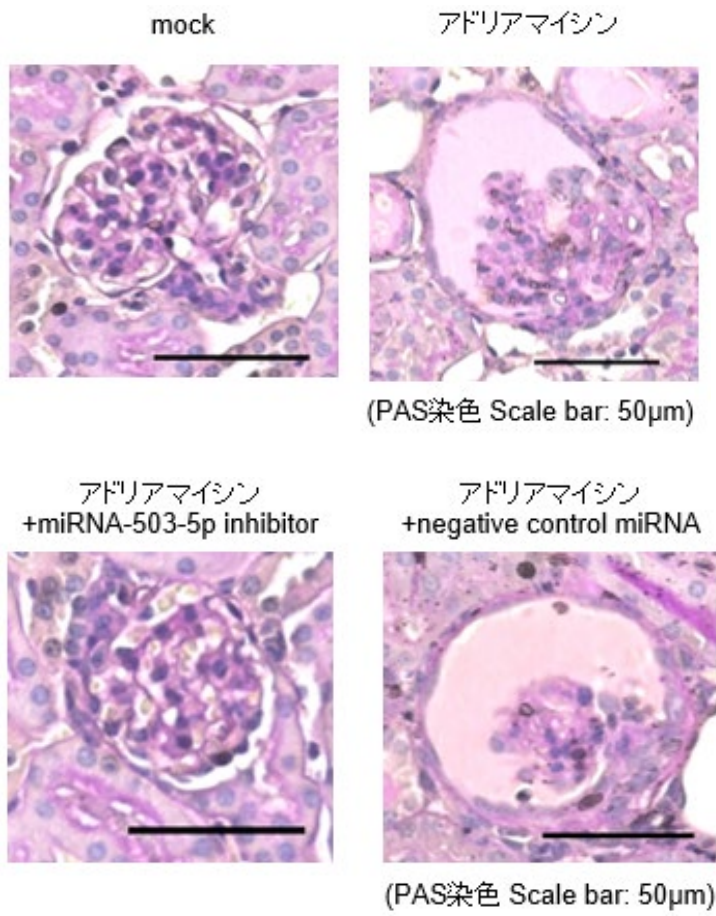


図 16 アドリアマイシンマウスにおける miRNA-503-5p-inhibitor+PEI-NPs の投与による各群の腎障害の評価

mock 群、アドリアマイシン群、アドリアマイシン+miRNA-503-5p inhibitor 群、アドリアマイシン+negative control miRNA 群の腎臓を採取し、組織学的解析を行った。(A) 腎糸球体硬化を PAS 染色で評価した。組織像を 200 倍で観察、撮影した。Scale bar : 50 μ m。 (B) PAS 染色における腎糸球体硬化をスコア化で定量化した (n=4)。データは平均±標準誤差。*P<0.05、one-way analysis of variance (ANOVA) 分析と Tukey-Kramer 分析。 **Abbreviation.** miRNA, microRNA; NS, non-significant; PAS, periodic acid staining

A:各群における腎組織学的変化



B:各群における腎糸球体硬化スコア

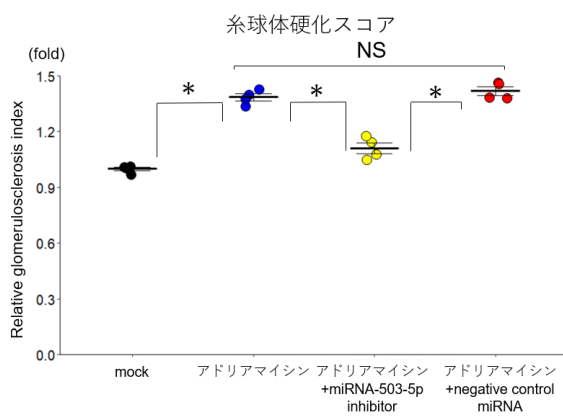
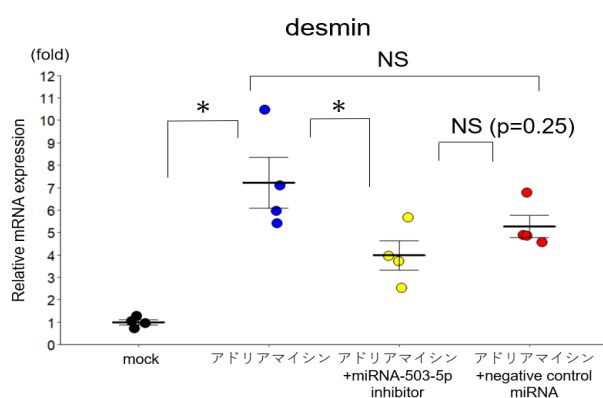


図 17 各群における腎糸球体硬化に関する分子学的腎障害評価

mock 群、アドリアマイシン群、アドリアマイシン+miRNA-503-5p inhibitor 群、アドリアマイシン+negative control miRNA 群の腎臓を採取し、desmin の mRNA 発現解析を行った (n=4)。データは平均±標準誤差。*P<0.05、one-way analysis of variance (ANOVA) 分析と Tukey-Kramer 分析。Abbreviation. miRNA, microRNA; mRNA, messenger RNA; NS, non-significant

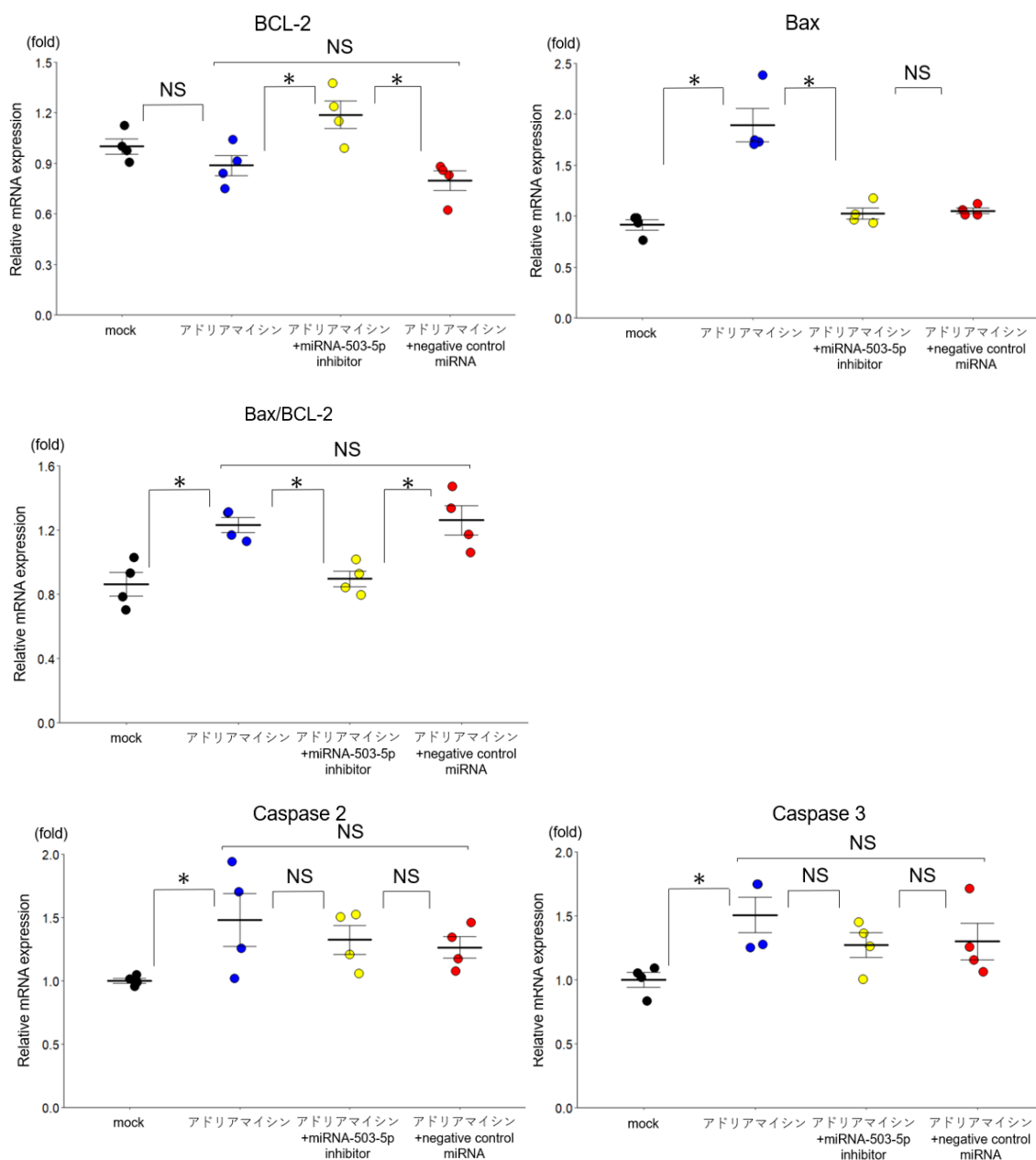


miRNA-503-5p-inhibitor の腎糸球体硬化進展抑制機序の解析

mock マウス群、アドリアマイシンマウス群、アドリアマイシン+miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs マウス群、アドリアマイシン+negative control-miRNA-PEI-NPs マウス群の腎臓で Target scan (http://www.targetscan.org/vert_72/)を用いて腎糸球体硬化進展抑制機序の解析を行った。miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs は BCL-2 の発現量を上昇させることで腎糸球体硬化の進展を抑制する可能性があることが示唆された (図 18)

図 18 miRNA-503-5p-inhibitor の腎系球体硬化抑制機序の検討

mock 群、アドリアマイシン群、アドリアマイシン+miRNA-503-5p inhibitor 群、アドリアマイシン+negative control miRNA 群の腎臓を採取し、mRNA 発現解析を行った (n=4)。データは平均±標準誤差。*P<0.05、one-way analysis of variance (ANOVA) 分析と Tukey-Kramer 分析。Abbreviation. BCL-2, B-cell lymphoma-2; miRNA, microRNA; mRNA, messenger RNA; NS, non-significant



4. 考察

本研究では、血清 miRNA-503-5p 発現レベルが老化腎障害のバイオマーカーとして有望である可能性が示唆された。また、miRNA-503-5p-inhibitor 投与により、老化腎障害 (SAMP1) の進展抑制効果は認められなかったものの、miRNA-503-5p-inhibitor 投与により異なった誘導法 (UUO による尿細管間質線維化、アドリアマイシン投与による糸球体硬化症) ではこれらの病変 (尿細管間質線維化、糸球体硬化症) の抑制効果を示した。本研究結果から血清 miRNA-503-5p は老化腎障害のバイオマーカーとなり得ること、また、老化腎障害そのものを抑制することはできなかったが、尿細管間質線維化および糸球体硬化抑制作用に効果があることが明らかになった。

過去の研究では、マウスの培養尿細管間質線維芽細胞において miRNA-503-5p の発現を抑制することで、線維化を抑制したことが報告されている (Mann et al., 2019)。また、別の報告では、ヒトの培養近位尿細管細胞において、miRNA-503-5p の発現を抑制することでアポトーシス抑制を介して糖尿病性腎症の抑制に関与したことが報告されている (Cao and Fan, 2020)。しかし、老化腎障害のバイオマーカーとしての miRNA の可能性に関してこれまで報告はされておらず本研究が初めての報告である。本研究では、まず 4 種類のモデルマウス (若年正常老化モデルマウス、高齢正常老化モデルマウス、若年老化促進モデルマウス、高齢老化促進モデルマウス) において腎で変化する miRNA をマイクロアレイ法で網羅的にスクリーニング (カットオフ値 2.0 倍以上、0.5 倍以下)、その後、ヒトで報告されていない 4 種類 (miRNA-467a-3p, miRNA-3091-5p, miRNA-3095-3p, miRNA-6981-5p) を除いて、その後 qRT-PCR 法で確認し、老化腎障害のバイオマーカー候補として miRNA-142a-3p, miRNA-142a-5p, miRNA-144-3p, miRNA-155-5p, miRNA-503-5p, miRNA-1231-5p を選出した。その後、老化腎障害群老化腎障害患者 (尿蛋白陰性、尿潜血陰性、eGFR cys<60 ml/min/1.73m²により臨床診断) と年齢、性別をマッチさせた、腎機能正常群の血清で miRNA の発現レベルを qRT-PCR 法で検討したところ、miRNA-503-5p のみが老化腎障害群で、2 倍程度に有意に上昇を認めた (図 5)。これらの結果から、miRNA-503-5p の血清発現レベルが老化腎障害の診断バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。しかし、症例数が少ないため今後症例数を増やしてさらなる検証が必要である。

次に、miRNA-503-5p-inhibitor 投与により、老化腎障害 (SAMP1) の進展抑制効果は認められなかったものの、miRNA-503-5p-inhibitor 投与により異なった方法 (UUO による尿細管間質線維化、アドリアマイシン投与による糸球体硬化症) ではこれらの病変 (尿細管間質線維化および糸球体硬化) 抑制効果を示した。

miRNA-503-5p-inhibitor が老化腎障害で抑制効果を示さなかった原因として、老化腎障害の進展には尿細管間質線維化、糸球体硬化だけでなく、動脈硬化、アミロイドの沈着など複雑で多彩な病態が関連しているとされていることが報告されており (Tauchi et al., 1971; Muhlberg and Platt, 1999; Zhou et al., 2008; van der Heijden et al., 2015)、miRNA-503-5p-inhibitor のみではこれら病態をすべて調整し、老化腎障害を抑制するのは困難であった可能性が考えられた。また本研究では SAMP1 マウスにおいて腎で miRNA-503-5p の発現レベルが上昇すると同時に、糸球体硬化マーカーである podocin の低下する 20-30 週まで miRNA-503-5p-inhibitor を投与して、老化腎障害の進展抑制の評価をしたが、投与時期および評価時期についてさらなる検討が必要である可能性も考えられた。

一方で miRNA-503-5p-inhibitor 投与により、老化腎障害で認められた、尿細管間質線維化および、糸球体硬化については、異なった病態誘導モデル (UUO による尿細管間質線維化、アドリアマイシン投与による糸球体硬化症) では尿細管間質線維化、糸球体硬化症抑制効果を認めたことから miRNA-503-5p は腎臓の尿細管間質線維化および糸球体硬化発展など老化腎障害で認められる病変を少なくとも一部は調整している可能性は否定できないと考えられ、今後 SAMP1 マウスにおける miRNA-503-5p-inhibitor の投与期間や評価時期を変えて検討していきたいと考えている。

元々 PAS 染色では糸球体上皮細胞は染色されないため、糸球体上皮細胞の脱落を示すのには適切ではないとされている。しかし、本研究では、SAMP1 マウスにおける糸球体硬化の評価として、PAS 染色による病理学的評価を用いた。これは糸球体硬化スコアが糸球体上皮細胞の脱落で規定されるものではなく、PAS 染色による糸球体内メサンギウム細胞増加、分節性硬化、全節性硬化により規定されるからである。しかし、本研究において 50 週齢 SAMP1 マウス腎で糸球体硬化マーカーの podocin の発現低下を認めたことから、糸球体上皮細胞の脱落を示す評価として、SAMP1 マウス、SAMR1 マウスにおける podocin の免疫染色も今後検討していきたいと考えている。

本研究では、miRNA-503-5p の発現抑制によって尿細管間質線維化とアポトーシスにおいて、過去に報告されている miRNA-503-5p の標的 mRNA である Smad7、BCL-2 は上昇していた。この結果は、miRNA-503-5p は少なくとも機序の一部として Smad7 の上昇を介して尿細管間質線維化を抑制し、BCL-2 の上昇を介して糸球体硬化を抑制している可能性が示唆される。今後の研究で老化腎障害治療薬開発のために miRNA-503-5p のメカニズムの詳細についてさらに明らかにする必要があると考えられた。

本研究では、miRNA-503-5p を発現抑制させるために、miRNA-503-5p-inhibitor を投与する際の非ウイルス性キャリアとして、ナノサイズのポリカチオンであ

る PEI-NPs を使用した。PEI-NPs は、生体適合性、安定性、トランスフェクション能力に優れており、腎臓での標的遺伝子発現を調節するためのオリゴヌクレオチドを効果的に送達することが報告されており、非ウイルス性キャリアとして優れていると考えられている (Morishita et al., 2015)。本研究でも PEI-NPs、miRNA-503-5p-inhibitor 投与により、SAMP1 マウス、UUO マウス、アドリアマイシン投与による糸球体硬化症マウスで有意な miRNA-503-5p の抑制効果が得られた。

本研究の limitation としては、結果の分析はサンプルサイズによって制限されている可能性が否定できないこと、老化腎障害患者の腎障害ステージによる miRNA 発現の変化の分析はされていないこと、また他の臓器における miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs の影響は検討されていないことがある、これらは今後さらに検討する必要がある。

5. 結論

miRNA-503-5p は老化腎障害の新規診断バイオマーカーとなる可能性がある。miRNA-503-5p-inhibitor は老化腎障害に対する治療効果については効果を認めなかったが、UUO で誘導した尿細管間質線維化、アドリアマイシン投与で誘導した糸球体硬化に対して治療効果を認めた。

引用文献 Uncategorized References

- Aomatsu, A., Hirai, K., Ishii, H., Yanai, K., Kaneko, S., and Morishita, Y. (2020). A Quantitative Detection Method for MicroRNAs in the Kidney of an Ischemic Kidney Injury Mouse Model. *J Vis Exp* (163). doi: 10.3791/61378.
- Benfey, P.N. (2003). Molecular biology: microRNA is here to stay. *Nature* 425(6955), 244-245. doi: 10.1038/425244a.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55(4), 611-622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.
- Cao, X., and Fan, Q.L. (2020). LncRNA MIR503HG Promotes High-Glucose-Induced Proximal Tubular Cell Apoptosis by Targeting miR-503-5p/Bcl-2 Pathway. *Diabetes Metab Syndr Obes* 13, 4507-4517. doi: 10.2147/DMSO.S277869.
- Dasgupta, I., Porter, C., Innes, A., and Burden, R. (2007). "Benign" hypertensive nephrosclerosis. *QJM* 100(2), 113-119. doi: 10.1093/qjmed/hcl139.
- Didiano, D., and Hobert, O. (2006). Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions. *Nat Struct Mol Biol* 13(9), 849-851. doi: 10.1038/nsmb1138.
- Hesketh, E.E., Vernon, M.A., Ding, P., Clay, S., Borthwick, G., Conway, B., et al. (2014). A murine model of irreversible and reversible unilateral ureteric obstruction. *J Vis Exp* (94). doi: 10.3791/52559.
- Jiang, Q., He, X., Zou, Y., Ding, Y., Li, H., and Chen, H. (2018). Altered gut microbiome promotes proteinuria in mice induced by Adriamycin. *AMB Express* 8(1), 31. doi: 10.1186/s13568-018-0558-7.
- Kanda, Y. (2013). Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 48(3), 452-458. doi: 10.1038/bmt.2012.244.
- Kaneko, S., Yanai, K., Ishii, H., Aomatsu, A., Ito, K., Hirai, K., et al. (2020). Detection

- of microRNA Expression in the Kidneys of Immunoglobulin a Nephropathic Mice. *J Vis Exp* (161). doi: 10.3791/61535.
- Levey, A.S., de Jong, P.E., Coresh, J., El Nahas, M., Astor, B.C., Matsushita, K., et al. (2011). The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int* 80(1), 17-28. doi: 10.1038/ki.2010.483.
- Lewis, A., Mehta, S., Hanna, L.N., Rogalski, L.A., Jeffery, R., Nijhuis, A., et al. (2015). Low Serum Levels of MicroRNA-19 Are Associated with a Stricturing Crohn's Disease Phenotype. *Inflamm Bowel Dis* 21(8), 1926-1934. doi: 10.1097/MIB.0000000000000443.
- Liu, X., Zhang, L., Cheng, K., Wang, X., Ren, G., and Xie, P. (2014). Identification of suitable plasma-based reference genes for miRNAome analysis of major depressive disorder. *J Affect Disord* 163, 133-139. doi: 10.1016/j.jad.2013.12.035.
- Mann, C., Kaistha, B.P., Kacik, M., Stiewe, T., and Hoyer, J. (2019). Downregulation of miR-503 in Activated Kidney Fibroblasts Disinhibits KCNN4 in an in Vitro Model of Kidney Fibrosis. *Kidney Blood Press Res* 44(1), 113-122. doi: 10.1159/000498875.
- Morishita, Y., Imai, T., Yoshizawa, H., Watanabe, M., Ishibashi, K., Muto, S., et al. (2015). Delivery of microRNA-146a with polyethylenimine nanoparticles inhibits renal fibrosis in vivo. *Int J Nanomedicine* 10, 3475-3488. doi: 10.2147/IJN.S82587.
- Morishita, Y., Yoshizawa, H., Watanabe, M., Imai, R., Imai, T., Hirahara, I., et al. (2016). MicroRNA expression profiling in peritoneal fibrosis. *Transl Res* 169, 47-66. doi: 10.1016/j.trsl.2015.10.009.
- Muhlberg, W., and Platt, D. (1999). Age-dependent changes of the kidneys: pharmacological implications. *Gerontology* 45(5), 243-253. doi: 10.1159/000022097.
- Raij, L., Azar, S., and Keane, W. (1984). Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int* 26(2), 137-143. doi: 10.1038/ki.1984.147.
- Takeda, T., Matsushita, T., Kurozumi, M., Takemura, K., Higuchi, K., and Hosokawa, M. (1997). Pathobiology of the senescence-accelerated mouse (SAM). *Exp Gerontol* 32(1-2), 117-127. doi: 10.1016/s0531-5565(96)00068-x.
- Tauchi, H., Tsuboi, K., and Okutomi, J. (1971). Age changes in the human kidney of the different races. *Gerontologia* 17(2), 87-97. doi: 10.1159/000211811.
- van der Burgh, A.C., Rizopoulos, D., Ikram, M.A., Hoorn, E.J., and Chaker, L. (2021). Determinants of the Evolution of Kidney Function With Age. *Kidney Int Rep*

6(12), 3054-3063. doi: 10.1016/j.ekir.2021.10.006.

van der Heijden, R.A., Bijzet, J., Meijers, W.C., Yakala, G.K., Kleemann, R., Nguyen, T.Q., et al. (2015). Obesity-induced chronic inflammation in high fat diet challenged C57BL/6J mice is associated with acceleration of age-dependent renal amyloidosis. *Sci Rep* 5, 16474. doi: 10.1038/srep16474.

Zhou, X.J., Rakheja, D., Yu, X., Saxena, R., Vaziri, N.D., and Silva, F.G. (2008). The aging kidney. *Kidney Int* 74(6), 710-720. doi: 10.1038/ki.2008.319.