

氏名	矢内克典
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第 666 号
学位授与年月日	令和 4 年 3 月 23 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	老化腎障害を調節する microRNA の同定-新規遺伝子治療法・バイオマーカー開発への応用-
論文審査委員	(委員長) 教授 大森 司 (委員) 教授 齋藤 修 准教授 岩津 好隆

論文内容の要旨

1 研究目的

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。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全く腎機能が低下しない群の 2 つの群に分かれる。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。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。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、血液・尿にも安定して存在し疾患早期から発現変化すること、外因性に人工合成した miRNA-mimic/inhibitor を投与し生体内での発現を変化させ得ること、ヒトとマウスなどの動物でほぼ同じ塩基配列であり動物実験の結果をヒトに応用させやすいことから、治療ターゲットとしての有用性が報告され、すでに癌や炎症疾患分野で臨床応用が検討されている。このことから、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。

2 研究方法

1. 高齢老化促進マウス（SAMP1-50 週齢）の腎臓で変化する miRNA をコントロール群 [若齢（SAMP1-10 週齢）マウス、および高齢正常老化マウス（SAMR1-50 週齢）、若齢正常老化マウス（SAMR1-10 週齢）と比較してマイクロアレイ法で網羅的に解析し qRT-PCR 法で確認し、老化腎障害で変化する miRNA 候補を選出する。

2. 1.の動物実験で選出した miRNA の発現を老化腎障害患者および老化腎障害のない高齢者の血清で発現を qRT-PCR 法で比較し、老化腎障害の新規バイオマーカーとなる miRNA を同定する。
3. 2で選出した老化腎障害の新規バイオマーカーとなる miRNA の inhibitor および mimic を老化促進モデルマウス(SAMP1-20 週齢)へ投与し、効果と機能を解析し、miRNA を標的とした老化腎障害の新規遺伝子治療法を開発する。

3 研究成果

1. 老化腎障害マウス腎における各群の腎障害の評価

高齢老化促進モデルマウス (SAMP1-50 週齢)、若年老化促進モデルマウス (SAMP1-10 週齢)、高齢正常老化モデルマウス (SAMR1-50 週齢)、若年正常老化モデルマウス (SAMR1-10 週齢)を用いて、変化する病理学的変化、分子学的変化について解析した。病理学的変化については SAMP1-50 週齢の腎臓で SAMR1-10 週齢、SAMR1-50 週齢、SAMP1-10 週齢に比べて尿細管間質線維化、糸球体硬化を有意に認めた。また、分子学的変化についても、SAMP1-50 週齢の腎臓で SAMR1-10 週齢、SAMR1-50 週齢、SAMP1-10 週齢に比べて尿細管間質線維化、糸球体硬化を有意に認めた。

2. 老化腎障害で発現変化する miRNA の網羅的解析

SAMP1-50 週齢とコントロール群 (SAMP1-10 週齢、SAMR1-10 週齢、SAMR1-50 週齢) との比較で SAMP1-50 週齢のみで発現上昇している miRNA を同定した (miRNA-503-5p)。

miRNA-503-5p は老化腎障害に関与があることが推察された。従って miRNA-503-5p を老化腎障害のバイオマーカーとなる miRNA の候補として選出した。

3. 老化腎障害のバイオマーカーとなる miRNA の同定

糖尿病性腎症、慢性糸球体腎炎などの明らかな腎疾患のない 65 歳以上の高齢者で尿所見が正常であり、糸球体濾過率が 60ml/min/1.73m² に低下している患者を 13 名 (老化腎障害患者群)、コントロール群として糸球体濾過率 60ml/min/1.73m² 以上で年齢から考慮すると腎機能低下のない 65 歳以上の高齢者 13 名 (高齢健常人群) の血清を用いて miRNA-503-5p の発現を qRT-PCR 法で比較検討したところ、miRNA-503-5p は老化腎障害患者血清で約 2 倍上昇 (p<0.05) していた。このことから血清での miRNA-503-5p は老化腎障害のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

4. 老化促進モデルマウス(SAMP1-20 週齢)腎に対する miRNA-503-5p-inhibitor の治療薬としての有効性の検討

SAMP1-10 週齢マウス群、SAMP1-20 週齢マウス群、SAMP1-30 週齢マウス群、SAMP1-40 週齢マウス群、SAMP1-50 週齢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、SAMP1-20 週齢マウス群より miRNA-503-5p の発現量の上昇を認めた。また、糸球体硬化マーカーである podocin の発現量も SAMP1-20 週齢マウスより有意な低下を認め、組織学的評価としては SAMP1-40 週齢マウスより有意に糸球体硬化を認めた。線維化については 50 週齢より線維化マーカー (FSP-1、Vimentin) の発現量上昇を認め、組織学的に 50 週齢より線維化の進行を認めた。従って、治療薬の有効性の検討については、SAMP1-20 週齢マウスに miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs および negative control-miRNA-PEI-NPs を週 1 回尾静脈投与し、30 週齢で各群より腎臓を採取して検討した。その結果、組織学的評価では、SAMP1-30 週齢マウス群+miRNA-503-5p-i

nhibitor-PEI-NPs マウス群では SAMP1-30 週齢マウス群、SAMP1-30 週齢マウス+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。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、SAMP1-30 週齢マウス+miRNA-503-5p-inhibitor-PEI-NPs マウス群では SAMP1-30 週齢マウス群と SAMP1-30 週齢マウス+negative control-miRNA-PEI-NPs マウス群と比較して、有意差を認めなかった。

5. 腎線維化(UUO)モデルマウス腎に対する miRNA-503-5p-inhibitor の治療薬としての有効性の検討

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, $P < 0.05$)。UUO における腎線維化評価分子 (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。組織学的評価においても、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、有意に組織学的に腎線維化の軽減を認めた。

6. アドリアマイシン誘導性糸球体硬化モデルマウス腎に対する miRNA-503-5p-inhibitor の治療薬としての有効性の検討

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, $P < 0.05$)。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。

4 考察

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、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症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。

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。

論文審査の結果の要旨

本研究において申請者らはマウス老化腎障害モデルを用いて、老化腎障害で発現が変化する miRNA を解析し、老化腎障害のバイオマーカーや治療標的としての miRNA の同定を試みた。論文の骨子は以下の通りである。

マウス老化腎障害モデルを用いて、老化腎障害で発現が変化する miRNA を解析し、複数の miRNA を同定した。その中でヒト血清中にも発現が確認できた miRNA-503-5p に着目し、そのバイオマーカーとしての重要性や治療ターゲットとしての可能性を検証した。miRNA-503-5p の発現上昇は尿管結紮マウスモデル、アドリアマイシン誘導腎障害マウスでも認めた。老化腎障害患者血清においても miRNA-503-5p の上昇を認めた。miRNA-503-5p の阻害は老化腎障害における糸球体硬化、尿細管線維化を抑制しなかったが、尿管結紮による間質線維化やアドリアマイシン投与後の糸球体硬化を抑制することを見出した。

本研究は、老化により生じるとされる糸球体硬化や尿細管間質の線維化に対する病態を多面的に検証しており、新たに同定した miRNA の結果に組織学的な検討を加え、そこから得られた結果をヒトのサンプルを用いて検証している点など新規性に富み、独創性も優れている。

研究成果は、すでに原著論文の形で投稿中であり、学位論文として十分な質を有しており、若干の文章の修正や追記をもって合格とした。

最終試験の結果の要旨

申請者は学位論文の順にそって研究内容の発表を行った。臨床的な背景から研究の必要性、その目的を述べ、得られた研究成果を評価委員に十分に理解できるように説明し、結果から得られる考察を適切に述べた。発表の具体的な内容は論文審査の結果に述べた通りである。

審査員からは以下のような質問や修正点が挙げられた。

- 1) 老化モデルマウスの具体的な特徴を考察に追記した方がよい。これにより miRNA-503p が老化腎障害にどのように影響するのが明確にできる。
- 2) 糖尿病性腎症の治療効果を検討していないため削除し、miRNA が上昇した腎障害モデルで、その阻害薬を検討した、という流れが好ましい。
- 3) 腎臓のどの部分を用いたのかも含め、組織学的な解析の評価方法の詳細を記載してほしい。また、尿細管が染色されないシリウスレッド染色は割愛した方がよい。

4) PAS 染色の代わりに、本来はポドシンなど糸球体上皮細胞に発現する物質の免疫染色が望ましい。これについて考察に触れてほしい。

5) その他、図や図の説明の修正や生命倫理に対するチェックについての修正について指摘。

申請者は上記についての的確に返答することができ、かつ指摘された点に対して、適切に論文を修正した。

以上より、発表、質疑応答の内容、及び修正された学位論文から研究者として十分な資質を有しており、医学博士号に値すると判断し、最終試験に合格とした。