

表 題 腎尿細管間質線維化を調節する microRNA の解析

論文の区分 博士課程

著 者 名 金子 昌平

担当指導教員氏名 森下 義幸 教授

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

2023年1月10日申請の学位論文

(背表紙)

腎尿細管間質線維化を調節する microRNA の解析  
氏名 金子 昌平



注：冊子にした時に下 5 センチ必ず空けてください。

## 目次

1. <u>緒言</u> . . . . .	p. 2
2. <u>材料と方法</u> . . . . .	p. 3
2. 1. 倫理審査委員会による承認 . . . . .	p. 3
2. 2. 腎線維化モデルマウスの作成 . . . . .	p. 3
2. 3. マイクロアレイ解析 . . . . .	p. 3
2. 4. 定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) . . . . .	p. 4
2. 5. miR-122-5p mimic/inhibitor . . . . .	p. 5
2. 6. miRNA の腎臓への送達 . . . . .	p. 5
2. 7. 腎線維化の組織学的評価 . . . . .	p. 6
2. 8. 免疫組織化学染色 . . . . .	p. 6
2. 9. 血液検査 . . . . .	p. 7
2. 10. miRNA の命名法 . . . . .	p. 7
2. 11. 統計解析 . . . . .	p. 7
3. <u>結果</u> . . . . .	p. 8
3. 1. 腎線維化で変動する miRNA の解析 . . . . .	p. 8
3. 2. miR-122-5p mimic/inhibitor による腎線維化への影響 . . . . .	p. 16
3. 3. miR-122-5p が腎線維化を調節する機序の解析 . . . . .	p. 20
4. <u>考察</u> . . . . .	p. 26
5. <u>結論</u> . . . . .	p. 31
6. <u>引用論文</u> . . . . .	p. 31

## 1. 緒言

慢性腎臓病 (chronic kidney disease : CKD) は患者の生命予後悪化を招き [1, 2], 心臓冠動脈疾患や脳血管障害の発症に関与する [3]. CKD が進行すると末期腎不全に至り血液透析, 腹膜透析, 腎臓移植といった腎代替療法を要することから医療経済学的な観点からも大きな問題となっている [4]. このような状況にも関わらず CKD 患者数は全世界的に増加傾向にある [4]. CKD の進行を抑制するために様々な治療が行われるが, 進行を阻止出来ずに末期腎不全に至る症例は少なくない [5]. そのため CKD の進行を抑制する特異的治療法の確立が必要とされている.

腎尿細管間質線維化 (腎線維化) は CKD において原疾患に関わらず共通する最終的な病理学的変化である [6-10]. 腎線維化は腎尿細管間質における細胞外マトリックスの増加を特徴とし, 炎症やアポトーシス等の病理学的機序が関与していると考えられている [6-11]. 腎線維化に対する治療は病因を問わず全ての CKD の治療に適用できると考えられるが, 現時点で腎線維化に対する特異的な治療法は存在しない [1, 10].

microRNA (miRNA) は 21-25 塩基長の, non-coding RNA である [12, 13]. miRNA は標的とする messenger RNA (mRNA) の 3' 末端非翻訳領域に結合することで蛋白質の合成を抑制し, 様々な疾患の発症や進行に関与する [12, 13]. miRNA は様々な臓器の線維化に関連することが報告されている [14, 15]. 腎線維化においても miRNA が関与しており, 腎線維化促進性 miRNA, 腎線維化抑制性 miRNA の両者が報告されている [5, 14-21]. これらの報告は miRNA が腎線維化に対する治療標的として有用である可能性を示唆しているが, 現時点では不明な点が多い. 特に, miRNA の発現を外因的に変動させることによる腎線維化への影響を検討した報告は少ない [10, 22-24]. このため, 腎線維化に影響を与える miRNA を検討することは, 将来的に腎線維化に対する新規治療法を開発するためにも重要である.

本研究では腎線維化モデルマウスを使用して, 腎線維化により発現が変動する miRNA を網羅的に解析した. さらに miRNA の発現を外因的に変動させることによる腎線維化への影響を検討した.

## 2. 材料と方法

### 2. 1. 倫理審査委員会による承認

本研究で実施した動物実験のプロトコールは自治医科大学動物実験委員会の承認 (17012-03) を得た。また、全ての動物実験及び動物管理は自治医科大学のガイドラインに遵守し実施した。

### 2. 2. 腎線維化モデルマウスの作成

本研究では腎線維化モデルマウスとして、マウスに片側尿管結紮 (unilateral ureteral obstruction : UUO) を施し UUO マウスを作成した。C57BL/6 マウス (8 週齢, 雄, 体重 20-25 g) を東京実験動物 (Tokyo, Japan) より購入し、マイクロアイソレーター内にて気温 19-21°C, 12 時間明暗周期の環境下で飼育した。UUO 手術のプロトコールは既報の通りである [25-27]。全身麻酔下 (イソフルランによる吸入麻酔) に左尿管 (腎下極レベル) を 4-0 シルク糸で二重結紮した。マウスは UUO 術後 7-10 日に安楽死させた (期間は実験内容による)。水腎症を発症した左腎臓を回収し、下大静脈から血液 (血清) を採取した。コントロールとして C57BL/6 マウス (8 週齢, 雄, 体重 20-25 g) に偽手術を施した sham マウスを用いた。偽手術は UUO 手術から片側尿管結紮を除いた手術を指す。本研究では左側の腎臓を長軸で半割し組織学的評価に使用した。さらに残された腎臓組織を皮質部・髄質部いずれも同比率 (目視) で含まれるように 4 分割し約 20 mg の腎臓サンプルを作成しそれぞれ-70°Cで保管した。

### 2. 3. マイクロアレイ解析

16 匹の C57BL/6 マウスを無作為に 2 群 [UUO 群 (n = 8), sham 群 (n = 8)] に分けた。UUO 術後及び sham 術後 7 日目の腎臓を回収し、腎臓から total RNA を miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands) を用いて抽出した。マイクロアレイ解析は北海道システム・サイエンス (Hokkaido, Japan) に依頼し実施した。Agilent 2100 BioAnalyzer series II (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて total RNA の品質チェックを行い、8 サンプルを選出した [UUO 群 (n = 4), sham 群 (n = 4)]。マイクロアレイ解析の詳細なプロトコールは既報の通りである [28]。total RNA の脱リン酸化とハイブリダイゼーションを miRNA Complete Labeling Reagent and Hyb kit (Agilent Technologies) を用いて行った。スライドグラスを Gene Expression Wash Buffer

(Agilent Technologies) で洗浄した. データスキャンは Agilent Technologies Microarray Scanner (Agilent Technologies) を用いて行った. 得られたデータは Agilent Feature Extraction software 10.7.3.1 (Agilent Technologies) で定量化し, GeneSpring 12.1 (Agilent Technologies) で標準化した. 統計解析として 2 群間の比較に Student's t test を用いた.  $P < 0.05$  を統計的に有意とした.

## 2. 4. 定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR)

miRNA 及び mRNA の発現を定量的に評価するために定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction: qRT-PCR) を実施した. qRT-PCR のプロトコールは既報の通りである [25]. miRNA を対象とした qRT-PCR では, まず miRNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて腎臓から total RNA を抽出した. miScript II RT Kit (Qiagen) を用いて  $1 \mu\text{g}$  の total RNA を complementary DNA (cDNA) へ逆転写させた. miR-511-3p, miR-375-3p, miR-130-3p, miR-127-3p, miR-122-5p, miR-190b-5p, miR-504-3p, miR-363-3p に対する miRNA 特異的プライマー (Qiagen) と miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen) を用いて qRT-PCR を実施した. mRNA を対象とした qRT-PCR では, まず RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて腎臓から mRNA を抽出した. SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて  $1 \mu\text{g}$  の mRNA を cDNA へと逆転写させた.  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), collagen 1A2 (COL1A2), collagen 1A1 (COL1A1), collagen 3A1 (COL3A1), fibronectin 1 (FNI), Transforming growth factor beta receptor II (TGFB2), forkhead box O3 (FOXO3), homeobox protein TGIF1 (TGIF1), CDC42 binding protein kinase beta (CDC42BPB), erythropoietin (EPO), hypoxia-inducible factor 3 alpha (HIF3A), superoxide dismutase 2, mitochondrial (SOD2), catalase (CAT), BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3 (BNIP3), autophagy related 12 (ATG12), microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B (LC3), cathepsin L1 (CTSL), B-cell lymphoma 2 (BCL2), Fas ligand (FASL), TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), Bcl-2-binding component 3 (BBC3), retinoblastoma-like protein 2 (RBL2), cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (CDKN1B), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), glucose-6-phosphatase, catalytic subunit (G6PC), F-box only protein 32 (FBXO32) に対する mRNA 特異的プライマー (タカラバイオ, Shiga, Japan) と PowerUP SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて qRT-PCR を実施した. 核酸増幅装置

として QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific)を用いた. miRNA の内在性コントロールとして U6 small nuclear 2 (*RNU6-2*)を, mRNA の内在性コントロールとして glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*)を使用した. 発現量は  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法で計算した.

## 2. 5. miR-122-5p mimic/inhibitor

miR-122-5p mimic を Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) から購入した. miR-122-5p inhibitor と control miRNA はジーンデザイン (Osaka, Japan) から購入した. miR-122-5p mimic の配列は 5' -[AmC6]CAAAC-CAUUGUCACUCCATT-3' (センス鎖) 及び 5' -UGGAGUGUGACAAUGGUUGUUGTT-3' (アンチセンス鎖) である. miR-122-5p inhibitor の配列は, 5' -GACGGCUAGGAUCAUCAACCAAACCAUUGUCACUCCACAAGUAUUCUGGU-3' (センス鎖) 及び 5' -ACCAGAAACCAAACCAUUGUCACUCCAAGUGAUCUAGCGCCGUC-3' (アンチセンス鎖) である. control miRNA の配列は, 5' -[AmC6]UGAACAGUGUACGUACGAUACC[dT][dT]-3' (センス鎖) 及び 5' -GGUUCGUACGUACACUGUCA[dT][dT]-3' (アンチセンス鎖) である.

## 2. 6. miRNA の腎臓への送達

miRNA ベクターである polyethyleneimine nanoparticles (PEI-NPs) を Polyplus-transfection SA (Illkirch-Graffenstaden, France) から購入した. 非ウイルスベクターとしての PEI-NPs の有用性は既報の通りである[10]. 機序としては PEI-NPs はオリゴ核酸とカチオン性複合体を形成し細胞表面に付着する. エンドサイトーシスにより細胞質に移動した後, エンドソームにおける pH 緩衝作用により核内に移行する[29-31]. PEI-NPs は滅菌水で希釈し窒素残基濃度 150 mmol/L に調整した. PEI-NPs の投与量は腎臓に送達する核酸量 (N/P 比) に応じて決定した. N/P 比は核酸中リン酸あたりの PEI-NPs 中窒素残基の比率を示し, 核酸-PEI-NPs 複合体の安定性や細胞毒性に関連する[32-34]. 本研究では製造元の指示に従い N/P = 6 の比率で PEI-NPs の量を決定した. C57BL/6 マウスを無作為に 5 群 [Sham 群 (n = 4), UUO + no injection 群 (n = 4), UUO + miR-122-5p mimic 群 (n = 4), UUO + miR-122-5p inhibitor 群 (n = 4), UUO + control miRNA 群 (n = 4)] に分けた. miR-122-5p mimic-PEI-NPs (5 nmol miRNA mimic, N/P 比 = 6), miR-122-5p inhibitor-PEI-NPs (5 nmol miRNA inhibitor, N/P 比 = 6), control miRNA-PEI-NPs (5 nmol control miRNA, N/P 比 = 6) は 200  $\mu$ L の 5%ブドウ糖溶液中に溶解し, 尾静脈注射によりマウスに投与した. 試薬の投与は手術 (UUO 手術, sham 手術) 前日, 術後 1, 3, 6 日目に

実施した。マウスは術後 10 日目に安楽死させ、左腎臓を回収した。

## 2. 7. 腎線維化の組織学的評価

腎線維化の組織学的評価としてアザン染色，シリウスレッド染色，PAS (Periodic acid Schiff) 染色を行った。手術により採取した腎臓の組織片を 4%パラホルムアルデヒドで固定しパラフィンに包埋した。組織は厚さ 4  $\mu\text{m}$  で切り出し脱パラフィン処理を行い，再水和した。アザン染色では腎臓切片をアザン染色用媒染剤（武藤化学，Tokyo，Japan）で 10 分間媒染し，マロリーアゾカルミン G 染色液（武藤化学）で 90 分間染色した。さらに 5%りんタングステン酸液 5%（武藤化学）で 60 分間インキュベートし，マロリーアニリン青オレンジ G 染色液（武藤化学）で 60 分間染色した。シリウスレッド染色では腎臓切片をシリウスレッド混合液 [(ワンギーソン液 A (武藤化学) 100 mL と 1%シリウスレッド溶液 (武藤化学) 4 mL の割合で混合し調整] で 60 分間染色した。シリウスレッドは特異的に collagen 分子中の塩基性基と反応し赤色に染色する [35]。PAS 染色では，0.5%過ヨウ素酸（武藤化学）で 10 分間インキュベートした後に水洗しシッフ試薬（武藤化学）で 15 分染色した。亜硫酸水（富士フィルム和光純薬，Osaka，Japan）で洗浄した後にマイヤーヘマトキシリン（武藤化学）で 2 分染色し流水で洗浄した。脱水，透徹，封入後，BZ-X710（キーエンス，Osaka，Japan）を用いて顕微鏡観察した。腎線維化の定量的評価として，シリウスレッド染色で赤色に染色された面積を測定した。200 倍の倍率で無作為に 6 枚の画像を取得し，BZ-X Analyzer (version 1.4.0, キーエンス) を用いて赤色面積を測定し比較検討した。

## 2. 8. 免疫組織化学染色

TGFBR2 及び FOXO3 の蛋白発現を解析するために免疫組織学的染色を実施した。手術により採取した腎臓の組織片を 4%パラホルムアルデヒドで固定しパラフィンに包埋した。組織は厚さ 4  $\mu\text{m}$  で切り出し脱パラフィン処理を行い，再水和した。抗原賦活化処理として，プロテインキナーゼ K (Dako, Santa Clara, CA, USA) で 5 分間インキュベート（常温）した。内因性ペルオキシダーゼ活性のブロッキング処理として 0.3%過酸化水素で 20 分間（常温）インキュベートした。[30%過酸化水素（富士フィルム和光純薬）を無水メタノール（富士フィルム和光純薬）に希釈し作成した。]非特異的反応のブロッキング処理としてスキムミルク（雪印メグミルク，Tokyo，Japan）で 30 分間（常温・振盪）インキュベートした。（スキムミルク 30g を 300 mL の蒸留水に希釈し作成した。）TGFBR2 特異



的一次抗体 (Fitzgerald Industries International, Acton, MA, USA) 及び FOXO3 特異的一次抗体 (Bethyl, Waltham, MA, USA) で一晩 (4°C) インキュベートした (TGFB2 特異的一次抗体は 200 倍に希釈し, FOXO3 特異的一次抗体は 1000 倍に希釈した). 洗浄後, ペルオキシダーゼ標識二次抗体 (ニチレイバイオサイエンス, Tokyo, Japan) で 1 時間 (常温) インキュベートした (希釈なし). さらに ImmPACT DAB Substrate Kit (Vector, Newark, CA, USA) で 10 分間 (常温) インキュベートし, 洗浄後, マイヤーヘマトキシリン (武藤化学) で 10 秒間染色した. 洗浄し, 脱水, 透徹, 封入後, BZ-X710 (キーエンス, Osaka, Japan) を用いて顕微鏡観察した. 茶色に染色された免疫組織化学染色陽性の面積を定量的評価した. 200 倍の倍率で無作為に 6 枚の画像を取得し, BZ-X Analyzer (version 1.4.1.1, キーエンス) を用いて茶色 (免疫組織化学染色陽性) の面積を測定し比較検討した.

## 2. 9. 血液検査

血清中の尿素窒素 (blood urea nitrogen: BUN) の測定はエスアールエル (Tokyo, Japan) に委託し実施した.

## 2. 10. miRNA の命名法

miRNA の命名法に関しては既報に基づいている [36].

## 2. 11. 統計解析

全ての値は平均値 ± 標準誤差で示した. 2 群間の統計的比較は Student's t test で解析した. 3 つ以上のグループ間の比較は一元配置分散分析 (analysis of variance: ANOVA), Newman-Keuls 法により解析した.  $P < 0.05$  を統計的に有意とした. 図 4-9 に示される解析は sham 群を除く 4 群間 (UUO + no injection 群, UUO + miR-122-5p mimic 群, UUO + miR-122-5p inhibitor 群, UUO + control miRNA 群) で比較した.

### 3. 結果

#### 3. 1. 腎線維化で変動する miRNA の解析

UUO マウス及び sham マウスの腎臓をサンプルとしたマイクロアレイ解析により 1,915 種類の miRNA の発現を網羅的に解析した。その結果, UUO マウスの腎臓では sham マウス腎臓と比較して 109 種類の miRNA 発現が 2 倍以上に増強し, 113 種類の miRNA の発現が 0.5 倍未満に減弱した (表 1, 図 1)。発現が増強した上位 10 種類の miRNA と発現が減弱した下位 10 種類の miRNA をさらなる解析候補として選出した。選出した 20 種類の miRNA のうち, これまでに腎線維化との関連が報告されている miRNA を除外し, 残り 8 種類の miRNA (miR-511-3p, miR-375-3p, miR-130-3p, miR-127-3p, miR-122-5p, miR-190b-5p, miR-504-3p, miR-363-3p) の発現を qRT-PCR により解析した (図 2)。qRT-PCR の結果, UUO マウスの腎臓では 3 種類の miRNA (miR-511-3p, miR-375-3p, miR-127-3p) の発現が有意に増強し, 3 種類の miRNA (miR-122-5p, miR-504-3p, miR-363-3p) の発現が有意に減弱した。この中で, miR-122-5p の発現が最も大きく減少しており (0.28 倍,  $P < 0.01$ ), 同 miRNA に着目し解析を進めた。

表 1. 腎線維化で変動する miRNA.

microRNA	塩基配列	倍率変化	P
		(UUO mice /sham mice)	
miR-511-3p	AAUGUGUAGCAAAAGACAGGAU	312.3	< 0.01
miR-375-3p	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA	143.0	< 0.01
miR-130b-3p	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU	61.8	< 0.01
miR-127-3p	UCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCU	55.7	< 0.01
miR-466b-3p	AUACAUACACGCACACUAAGA	48.8	< 0.01
miR-7211-3p	UGGAGUGACUGUAGGGAGGAUGC	41.7	< 0.01
miR-6691-5p	AGUUGUGUGUGCAUGUAUAUGU	40.6	< 0.01
miR-214-5p	UGCCUGUCUACACUUGCUGUGC	39.1	< 0.01
miR-6929-3p	AGGGAGGAGCAGCAUCUGUGA	38.9	< 0.01
miR-467b-5p	GUAAGUGCCUGCAUGUAUAUG	35.5	< 0.01
miR-8109	CCCGCGGCCG	33.4	< 0.01
miR-467a-3p	TGTAGGTGTGTGTATGTATA	33.3	< 0.01
miR-136-5p	CCATCATCAAAACAAATGGAGT	30.9	< 0.01
miR-421-3p	GCGCCCAATTAATGTCTG	26.0	< 0.01

miR-467e-5p	ACATATACATGCTCACACT	25.6	< 0.01
miR-290b-3p	TACTCAAACATATGGGGGC	19.0	< 0.01
miR-1907	ACCTCCAGATCCTCTG	17.7	< 0.01
miR-1967	GCATCTTCTCCCCAG	17.7	< 0.01
miR-7687-5p	AGCCTGCGCCTCA	17.4	< 0.01
miR-106b-3p	GCAGCAAGTACCCAC	15.1	< 0.01
miR-379-5p	CCTACGTTCCATAGTC	14.5	< 0.01
miR-3547-5p	TCCCGGGCCCC	14.1	< 0.01
miR-1947-3p	GGAGGGAGAGCTAGC	13.6	< 0.01
miR-3091-5p	GCGGGCCCAACC	13.5	< 0.01
miR-134-5p	CCCCTCTGGTCAA	13.2	< 0.01
miR-31-3p	GATGGCAATATGTTGGCAT	13.2	< 0.01
miR-5099	GGAGCACCACATCG	11.4	< 0.01
miR-141-5p	TCCAACACTGCACTGGA	10.9	< 0.01
miR-15b-3p	TAGAGCAGCAAATAATGATTCG	10.9	< 0.01
miR-300-3p	GAAGAGAGCTTGCCCTTG	10.8	< 0.01
miR-342-5p	CTCAATCACAGATAGCACC	10.4	< 0.01
miR-8095	GGGACAGACAGCAGA	10.2	< 0.01
miR-6984-3p	AGAAAGACAGGAAAGAAAG	10.0	< 0.01
miR-714	GCGACCGACCGGCC	9.6	< 0.01
miR-3472	GGTTCCTTCCAGCTT	9.5	< 0.01
miR-1957a	GTCATATGCTCTACCACT	9.4	< 0.01
miR-5131	GCTCGGGGCTCC	8.8	< 0.01
miR-7047-3p	GGAAGGAGGAAGGGT	8.6	< 0.01
miR-3473c	CTTATTATGGGGGCTGG	8.1	< 0.01
miR-21a-3p	GACAGCCCATCGACT	7.8	< 0.01
miR-6392-3p	AGAGGACCCGGCA	7.2	< 0.01
miR-710	CTCAACTCTCCCCA	7.0	< 0.01
miR-7046-5p	CCTGGCTCCCAGC	6.9	< 0.01
miR-146b-5p	AGCCTATGGAATTCAGTTC	6.4	< 0.01
miR-770-3p	CCAGCTCCACGTC	6.0	< 0.01
miR-6961-5p	GGCCATTTCTTCCC	5.6	< 0.01
miR-376a-3p	ACGTGGATTTTCTCTA	5.5	< 0.01
miR-6354	AGAGACCTGATCCCCA	5.3	< 0.01
miR-1931	GCCATCGCACCAGC	5.2	< 0.01

miR-501-3p	CAAATCCTTGCCCGG	4.9	< 0.01
miR-21a-5p	TCAACATCAGTCTGATAAGC	4.9	< 0.01
miR-132-3p	CGACCATGGCTGTAGA	4.9	< 0.01
miR-468-3p	CAGACACACGCACATCA	4.7	< 0.01
miR-214-3p	ACTGCCTGTCTGT	4.4	< 0.01
miR-7672-5p	TCGCCCCTGTCA	4.4	< 0.01
miR-292b-3p	ATACTCAAAGTGGGGGC	4.0	< 0.01
miR-7063-5p	TGTGCTCAGCCTGC	4.0	< 0.01
miR-5132-5p	CCTGAGTCCACCACC	4.0	< 0.01
miR-3093-3p	CCAACCTCCCACGG	4.0	< 0.01
miR-142a-3p	TCCATAAAGTAGGAAACACTACA	4.0	< 0.01
miR-5121	GGAGATGTCTCATCACA	4.0	< 0.01
miR-223-3p	TGGGGTATTTGACAAACTGAC	3.9	< 0.01
miR-224-5p	AACGGAACCACTAGTGACTTA	3.9	< 0.01
miR-3572-5p	GTCCACCTTGCCCT	3.8	< 0.01
miR-6963-5p	CCAGGTTCTGCCATC	3.8	< 0.01
miR-6921-5p	GCTTCCTACCTCATGC	3.7	< 0.01
miR-467a-5p	CGCATATACATGCAGGCA	3.5	< 0.01
miR-6349	CGCATGCCCTCC	3.5	< 0.01
miR-669b-5p	ACATGCACATGCACACA	3.5	< 0.01
miR-299b-5p	ATGTATGTGGGACGGTAAAC	3.5	< 0.01
miR-7080-3p	AGGGAACGGAGGGG	3.5	< 0.01
miR-142a-5p	AGTAGTGCTTTCTACTTTA	3.4	< 0.01
miR-199a-5p	GAACAGGTAGTCTGAACAC	3.2	< 0.01
miR-8093	CACTCATGCTCTGCTC	3.1	< 0.01
miR-183-5p	AGTGAATTCTACCAGTGCC	3.1	< 0.01
miR-7040-5p	CGCCTCCATCTCCC	3.0	< 0.01
miR-718	CGACACCCGGCCG	3.0	< 0.01
miR-7235-5p	GCCCAGACCCCTC	3.0	< 0.01
miR-762	GCTCTGTCCCAGC	3.0	< 0.01
miR-199a-3p	TAACCAATGTGCAGACTACT	3.0	< 0.01
miR-672-5p	TCACACACAGTACACCA	2.9	< 0.01
miR-18a-5p	CTATCTGCACTAGATGCAC	2.8	< 0.01
miR-3067-3p	CCTCTCCCAGGGC	2.8	< 0.01
miR-292a-5p	CAAAAGAGCCCCAG	2.7	< 0.01

miR-342-3p	ACGGGTGCGATTTCTGT	2.7	< 0.01
miR-20a-3p	CTTTAAGTGCTCGTAATGCA	2.7	< 0.01
miR-let-7i-3p	AGCAAGGCAGTAGCTT	2.6	< 0.01
miR-290a-3p	GGGCTTAAACTAGGCGGC	2.6	< 0.01
miR-182-5p	CGGTGTGAGTTCTACC	2.5	< 0.01
miR-149-3p	GCACCGCCCCC	2.5	< 0.01
miR-877-5p	CCCTGCGCCATCT	2.5	< 0.01
miR-1949	AACTATGCTGACATCCTG	2.5	< 0.01
miR-674-5p	TACACCACTCCCAT	2.5	< 0.01
miR-199b-5p	GAACAGGTAGTCTAAACACTGG	2.5	< 0.01
miR-31-5p	CAGCTATGCCAGCATCT	2.4	< 0.01
miR-125a-3p	GGCTCCCAAGAACCTC	2.4	< 0.01
miR-721	TTCCCCCTTTTAATT	2.4	< 0.01
miR-7115-3p	CTGTGGGGGAGG	2.3	< 0.01
miR-3474	GAATCCACGTCTCCTC	2.3	< 0.01
miR-28a-3p	TCCAGCAGCTCACA	2.2	< 0.01
miR-3075-5p	GTCCTTGGCTGCTC	2.2	< 0.01
miR-5126	CCCCGCCCCG	2.2	< 0.01
miR-155-5p	ACCCCTATCACAATTAGC	2.1	< 0.01
miR-2861	CCGCCCGCCG	2.1	< 0.01
miR-5128	AGCCATCTCGCCAGC	2.1	< 0.01
miR-135a-1-3p	CGCCACGGCTCCA	2.1	< 0.01
miR-8110	CCCCCCCCCA	2.1	< 0.01
miR-211-3p	GCCCCCTTTGCT	2.0	< 0.01
miR-7118-5p	GTTCCCTCTCCCGC	2.0	< 0.01
miR-6975-5p	GCUGGGGAGAAAGGGUUUGGCA	-253.2	< 0.01
miR-6918-5p	UGCUGAGGACGGGAUUAGGUUCU	-252.2	< 0.01
miR-6904-5p	UCCUGGGGUUAGAGUUGAGUGG	-194.5	< 0.01
miR-122-5p	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	-183.2	< 0.01
miR-7682-3p	CCUGUGGGUUGGGUUGGCUUU	-164.8	< 0.01
miR-129b-5p	GCUUUUUGGGGUAAGGGCUUCC	-134.9	< 0.01
miR-190b-5p	UGAUUGUUUGAUUUGGGUUG	-107.9	< 0.01
miR-504-3p	AGGGAGAGCAGGGCAGGGUUUC	-104.0	< 0.01

miR-363-3p	AAUUGCACGGUAUCCAUCUGUA	-89.6	< 0.01
miR-7218-5p	UGCAGGGUUUAGUGUAGAGGG	-85.3	< 0.01
miR-8119	GACCCTAGCTCCCTC	-70.6	< 0.01
miR-7080-5p	CCAAACCCACCTCC	-67.1	< 0.01
miR-1927	TCAGTCCCTAACATCCA	-57.8	< 0.01
miR-6990-5p	AGAGCCCTGACTCACC	-56.3	< 0.01
miR-7234-3p	CCTTCTACCCTAGAAAGA	-51.7	< 0.01
miR-6905-5p	TCATTCAACCCAACCTG	-49.6	< 0.01
miR-7055-5p	CCAACTCAGATAACCCA	-46.6	< 0.01
miR-190a-3p	AGGAATATGCTTGATATATAGT	-42.8	< 0.01
miR-6401	ACCCGACACCACTG	-42.2	< 0.01
miR-7233-5p	CATCTATCTGTCCCTAACT	-41.4	< 0.01
miR-7657-5p	TTACCTAACTATCCAATATT	-36.4	< 0.01
miR-3078-3p	CCTAAAGACTACCCAG	-35.4	< 0.01
miR-7664-3p	ATTAGTTAACCCAGCCTAA	-33.4	< 0.01
miR-7086-5p	TGCCCAAACCTTTCTC	-33.1	< 0.01
miR-6902-3p	CTGAACCCACACATCA	-32.7	< 0.01
miR-188-3p	TGCAAACCTGCATGTG	-31.2	< 0.01
miR-7028-5p	CTCCTGACCCAAGC	-27.7	< 0.01
miR-6481	CATCTAAGCATTTTCAGTG	-25.8	< 0.01
miR-302c-5p	GCAGGTAACCCCAT	-24.6	< 0.01
miR-6980-5p	CTAACCTAGCCTCCCC	-24.2	< 0.01
miR-467b-3p	GTGTTGGTGTGTAT	-23.8	< 0.01
miR-7219-3p	AGTGTGTTAGAAACCCG	-21.1	< 0.01
miR-194-2-3p	CAGATAACAGCAGCCC	-19.6	< 0.01
miR-7074-5p	ACTGGAGCCCTAGCC	-19.0	< 0.01
miR-6998-5p	AGTCACTTTGCCCTCT	-18.2	< 0.01
miR-874-5p	CTTACCCTGGTGCG	-17.4	< 0.01
miR-6923-5p	ACACCCCAATCCTCC	-16.4	< 0.01
miR-327	ATCCTCATGCCCT	-15.7	< 0.01
miR-1188-3p	GCAGGGTGTGGTGG	-15.7	< 0.01
miR-3070-2-3p	TCTACCCCTGACCATAG	-14.9	< 0.01
miR-101a-5p	GCATCAGCACTGTGAT	-10.9	< 0.01

miR-3070-3p	TCTACCCCTGACGGT	-10.5	< 0.01
miR-6926-5p	TCACCATCCCTCACC	-8.8	< 0.01
miR-6981-5p	GCCTTCAGCCTCTTC	-8.6	< 0.01
miR-3063-3p	GGCGAGAGATCAGGA	-8.6	< 0.01
miR-6236	CCTGACTGCCGGC	-7.2	< 0.01
miR-30c-1-3p	GGAGTAAACAACCCTCTCC	-6.0	< 0.01
miR-883b-5p	TGACTGCTACCCATT	-5.6	< 0.01
miR-26b-3p	GAGCCAAGTAATGGAGAACA	-5.3	< 0.01
miR-744-3p	AGGTTGAGGTTAGTGGCA	-5.1	< 0.01
miR-6988-5p	TGGGCCTCAGCTCT	-4.9	< 0.01
miR-376b-3p	AAGTGGATGTTCTCTAT	-4.3	< 0.01
miR-6393	ACTCAGTGTGCTTCGT	-4.1	< 0.01
miR-7094b-2-5p	TCAGACCCTGTATCCTC	-3.9	< 0.01
miR-7056-5p	AACCTCTCTGTCCTCC	-3.9	< 0.01
miR-6971-5p	AGCCTCTACACCCTCC	-3.9	< 0.01
miR-497b	CCACGTCCAAACCA	-3.9	< 0.01
miR-874-3p	TCGGTCCCTCGGG	-3.6	< 0.01
miR-192-3p	CTGTGACCTATGGAATTG	-3.5	< 0.01
miR-873b	GTGTGCATTTGCAGGA	-3.5	< 0.01
miR-7075-5p	AAAACCATGTCTCCTC	-3.4	< 0.01
miR-703	TTCTTTCCTTCTGAAGGTT	-3.3	< 0.01
miR-193a-5p	TCATCTTGCCCGCA	-3.3	< 0.01
miR-7670-5p	TTCCAATCTGCCCA	-3.2	< 0.01
miR-8094	TCTTCTCGTTGTCCTTC	-3.2	< 0.01
miR-144-5p	ACTTACAGTATATGATGATATCC	-3.2	< 0.01
miR-669c-3p	TTACTTGTGTGTGTGTG	-3.0	< 0.01
miR-193a-3p	ACTGGGACTTTGTAGGC	-3.0	< 0.01
miR-190a-5p	ACCTAATATATCAAACATATCA	-3.0	< 0.01
miR-30e-5p	CTTCCAGTCAAGGATGT	-2.9	< 0.01
miR-302c-3p	CCACTGAAACATGGAAGCAC	-2.8	< 0.01
miR-192-5p	GGCTGTCAATTCATAGGTC	-2.7	< 0.01
miR-30e-3p	GCTGTAAACATCCGACTG	-2.7	< 0.01
miR-681	AGCTGCCTGCCAG	-2.6	< 0.01

miR-376c-3p	ACGTGAAATTTCTCTATGTT	-2.6	< 0.01
miR-466g	TGTGTGTGCATGTGTC	-2.6	< 0.01
miR-30c-5p	GCTGAGAGTGTAGGATGT	-2.6	< 0.01
miR-194-5p	TCCACATGGAGTTGCT	-2.6	< 0.01
miR-802-5p	AAGGATGAATCTTTGTTACTGA	-2.6	< 0.01
miR-365-3p	ATAAGGATTTTTAGGGGCATTA	-2.5	< 0.01
miR-378a-5p	ACACAGGACCTGGAGTCA	-2.5	< 0.01
miR-7211-5p	GGTGGAGTGGCAGA	-2.5	< 0.01
miR-5113	ACAGGATCTCTCTCCTC	-2.5	< 0.01
miR-378b	TCTTCTGACTCCAAGTC	-2.5	< 0.01
miR-29c-5p	GAACACCAGGAGAAATCGGTC	-2.4	< 0.01
miR-378d	ACCTTCTGACTCCAAGG	-2.4	< 0.01
miR-185-5p	TCAGGAAGTGCCTTTCT	-2.4	< 0.01
miR-378a-3p	CCTTCTGACTCCAA	-2.4	< 0.01
miR-7219-5p	TCTCAACCCTGAGCTC	-2.3	< 0.01
miR-29c-3p	TAACCGATTTCAAATGGTGCTA	-2.3	< 0.01
miR-378c	GCTTCTGACTCCAAGT	-2.3	< 0.01
miR-3473b	CTGAGCCATCTCTCCA	-2.3	< 0.01
miR-30a-3p	GCTGCAAACATCCGACT	-2.3	< 0.01
miR-let-7f-1-3p	GGGAAGGCAATAGATTGTAT	-2.3	< 0.01
miR-203-3p	CTAGTGGTCCTAAACATT	-2.3	< 0.01
miR-101c	TCAGTTATCACAGTACTGT	-2.2	< 0.01
miR-129-1-3p	ATACTTTTTGGGGTAAGGG	-2.2	< 0.01
miR-144-3p	AGTACATCATCTATACTGTA	-2.2	< 0.01
miR-455-5p	CGATGTAGTCCAAAGGCA	-2.2	< 0.01
miR-451a	AACTCAGTAATGGTAACGGTTT	-2.2	< 0.01
miR-3095-3p	AAAAGCTCTCTCTCCAGT	-2.2	< 0.01
miR-690	TTTGGTTGTGAGCCTA	-2.2	< 0.01
miR-455-3p	GTGTATATGCCCCGTGG	-2.1	< 0.01
miR-466q	ACGTATGTGTGTGTGTG	-2.1	< 0.01
miR-3099-3p	TCCCCAACCTCTCTC	-2.1	< 0.01
miR-760-3p	TCCCCACAGACCCA	-2.1	< 0.01
miR-3473a	TGCTGAGCCATCTCTC	-2.1	< 0.01





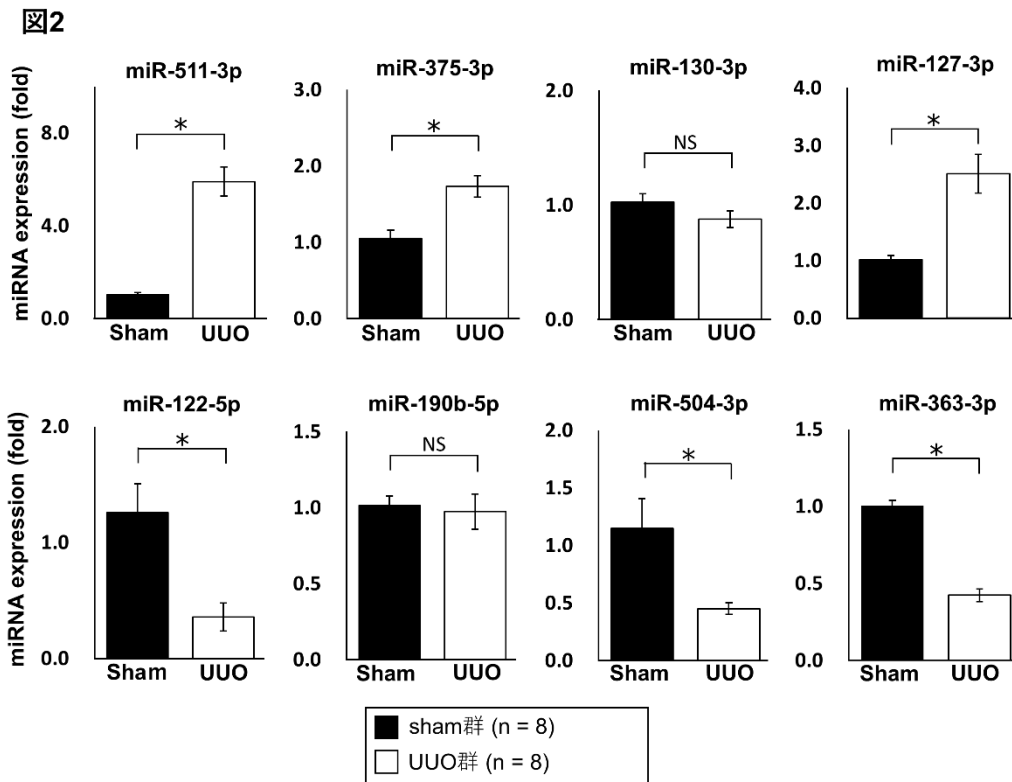


図2. 腎線維化におけるmiRNA発現のqRT-PCR解析結果. UUOマウス群 (n = 8) とshamマウス群 (n = 8) におけるmiRNA (miR-511-3p, miR-375-3p, miR-130-3p, miR-127-3p, miR-122-5p, miR-190b-5p, miR-504-3p, miR-363-3p) の相対的発現量を比較検討した. 相対的発現量は平均値及び標準誤差で示した.

Abbreviations: miR, microRNA; UUO, unilateral ureteral obstruction; qRT-PCR, quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction; NS, not significant. \* p < 0.05.

### 3. 2. miR-122-5p-mimic/inhibitorによる腎線維化への影響

miR-122-5p mimic/inhibitor投与によるmiR-122-5pの発現変動をqRT-PCRにより解析した. UUO + miR-122-5p mimic群ではUUO + control miRNA群及びUUO + no injection群と比較しmiR-122-5pの発現が有意に増強した. 一方, UUO + miR-122-5p inhibitor群ではUUO + control miRNA群及びUUO + no injection群と比較しmiR-122-5pの発現が有意に減弱した (図3). 次に5種類の線維化関連遺伝子 (*COL1A2*, *FNI*,  $\alpha$ -*SMA*, *COL1A1*, *COL3A1*) の発現をqRT-PCRにより解析した. *COL1A2*と*FNI*の発現は, UUO + miR-122-5p mimic群においてUUO + control miRNA群及びUUO + no injection群と比較して増強した. 一方, UUO + miR-122-5p inhibitor群ではUUO + control miRNA群及びUUO + no

injection 群と比較して減弱した (図 4).  $\alpha$ -SMA, COL1A1, COL3A1 の発現も同様の傾向が観察されたが有意差は認められなかった. アザン染色及びシリウスレッド染色による評価では, UUO + miR-122-5p mimic 群で腎線維化が促進され, UUO + miR-122-5p inhibitor 群では腎線維化が抑制された (図 5). PAS 染色では, UUO 手術による尿細管構造の破綻 (尿細管の拡張や刷子縁の消失) が認められ, 同所見は miR + miR-122-5p inhibitor 群でわずかに軽減していた (図 5). UUO + miR-122-5p mimic 群における腎線維化面積は UUO + control miRNA 群及び UUO + no injection 群と比較し有意に大きく, UUO + miR-122-5p inhibitor 群における腎線維化面積は有意に小さかった (図 5). UUO + miR-122-5p mimic 群における血清 BUN 濃度は UUO + control miRNA 群及び UUO + no injection 群と比較し有意に上昇した (図 6). UUO + miR-122-5p inhibitor 群における血清 BUN 濃度は減少傾向がみられたが, UUO + control miRNA 群及び UUO + no injection 群との間に有意差は認められなかった (図 6).

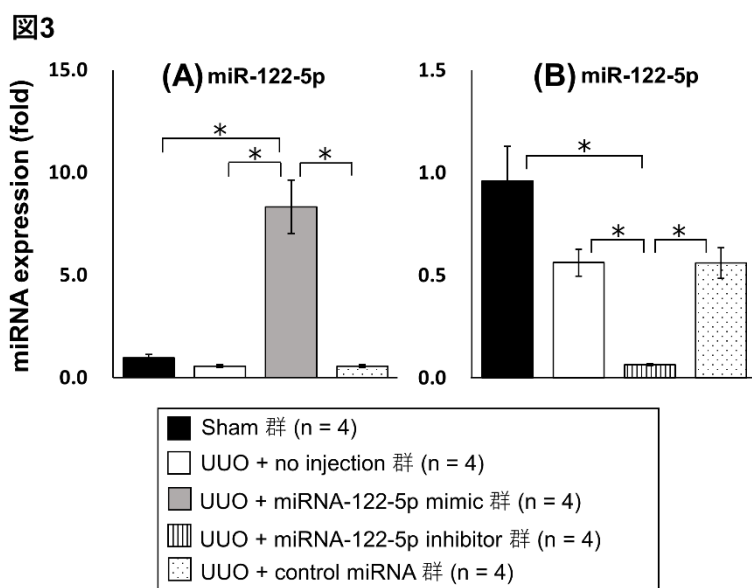


図 3. miR-122-5p mimic/inhibitor による miR-122-5p の調節効果. (A) miR-122-5p の相対的発現量を 4 群 [sham 群 (n = 4), UUO + no injection 群 (n = 4), UUO + miR-122-5p mimic 群 (n = 4), UUO + control miRNA 群 (n = 4)] 間で比較した. (B) miR-122-5p の相対的発現量を 4 群 [sham 群 (n = 4), UUO + no injection 群 (n = 4), UUO + miR-122-5p inhibitor 群 (n = 4), UUO + control miRNA 群 (n = 4)] 間で比較した. 相対的発現量は平均値及び標準誤差で示した. Abbreviations: miR, microRNA; UUO, unilateral ureteral obstruction; qRT-PCR, quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. \* p < 0.05.

図4

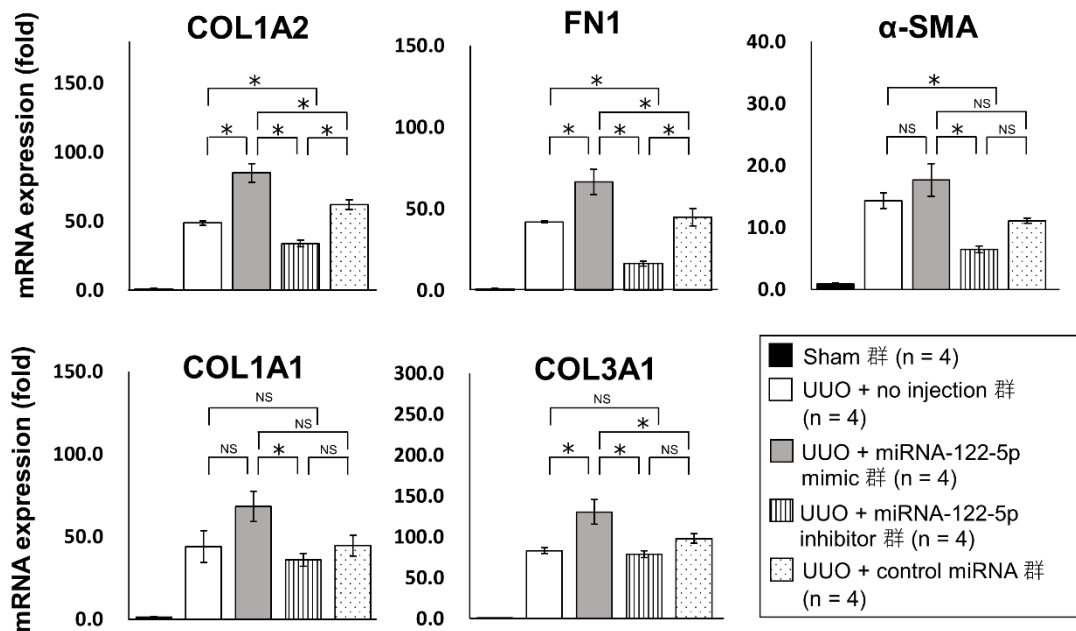


図4. miR-122-5p mimic/inhibitor による線維化関連遺伝子への影響. 5種類の線維化関連遺伝子 (*COL1A2*, *FN1*,  $\alpha$ -*SMA*, *COL1A1*, *COL3A1*) の発現を qRT-PCR により解析した. 遺伝子の相対的発現量を4群 [UUO + no injection 群 (n = 4), UUO + miR-122-5p mimic 群 (n = 4), UUO + miR-122-5p inhibitor 群 (n = 4), UUO + control miRNA 群 (n = 4)] 間で比較した. 遺伝子の相対的発現量は平均値及び標準誤差で示した.

Abbreviations: miR, microRNA; UUO, unilateral ureteral obstruction; mRNA, messenger RNA; COL1A2, collagen 1A2; FN1, fibronectin 1;  $\alpha$ -SMA,  $\alpha$ -smooth muscle actin; COL1A1, collagen 1A1; COL3A1, collagen 3A1; qRT-PCR, quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. NS, not significant. \* p < 0.05.

図5

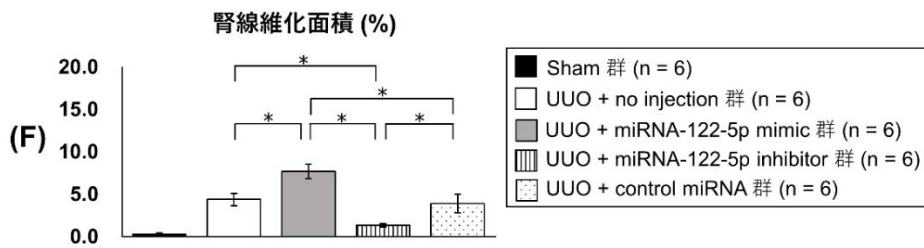
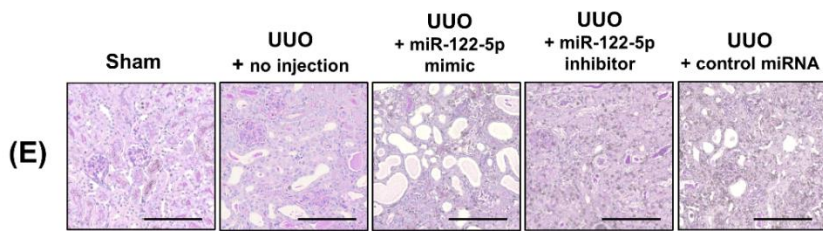
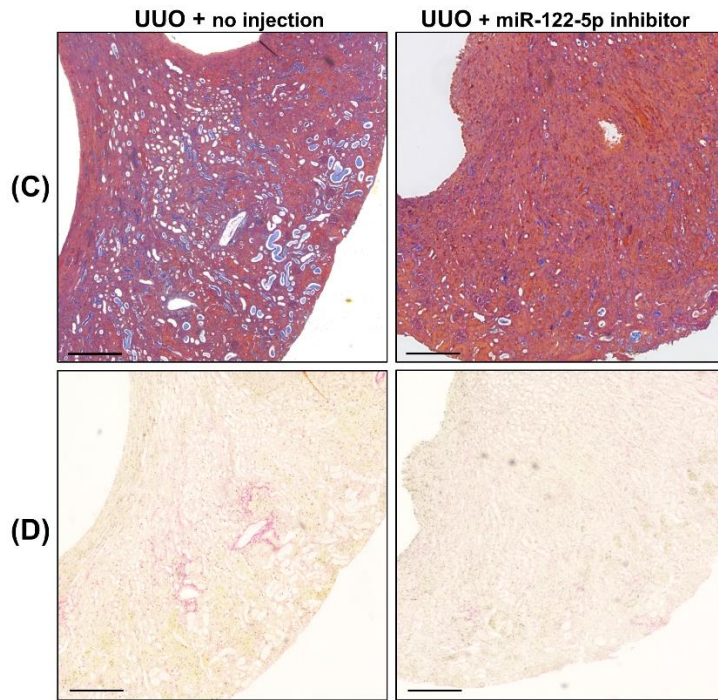
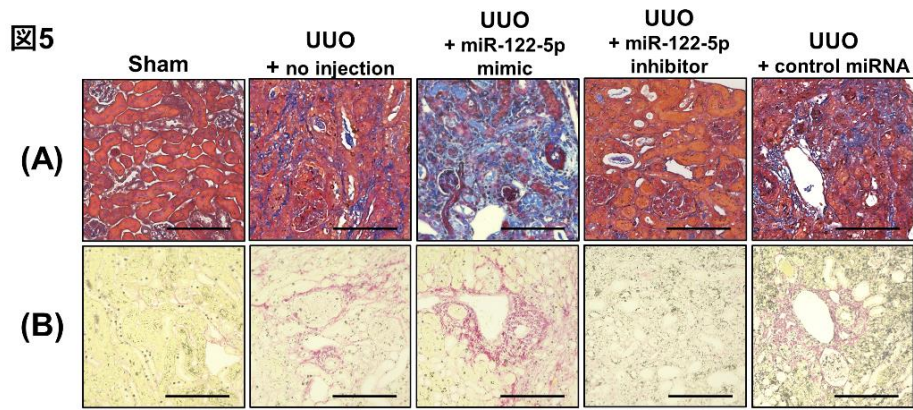


図5. 腎線維化の組織学的評価. (A)アザン染色による評価. (B)シリウスレッド染色による評価. (C)アザン染色 (40倍). (D)シリウスレッド染色 (40倍). (E) PAS 染色による評価. (F) シリウスレッド染色による腎線維化面積の解析. 腎線維化面積を4群 [UUO + no injection 群 (n = 6), UUO + miR-122-5p mimic 群 (n = 6), UUO + miR-122-5p inhibitor 群 (n = 6), UUO + control miRNA 群 (n = 6)] 間で比較した. 腎線維化面積は平均値及び標準誤差で示した. Abbreviations: miR, microRNA; UUO, unilateral ureteral obstruction. Scale bar = 100  $\mu$ m (A, B, E), 200  $\mu$ m (C, D) . \* p < 0.05.

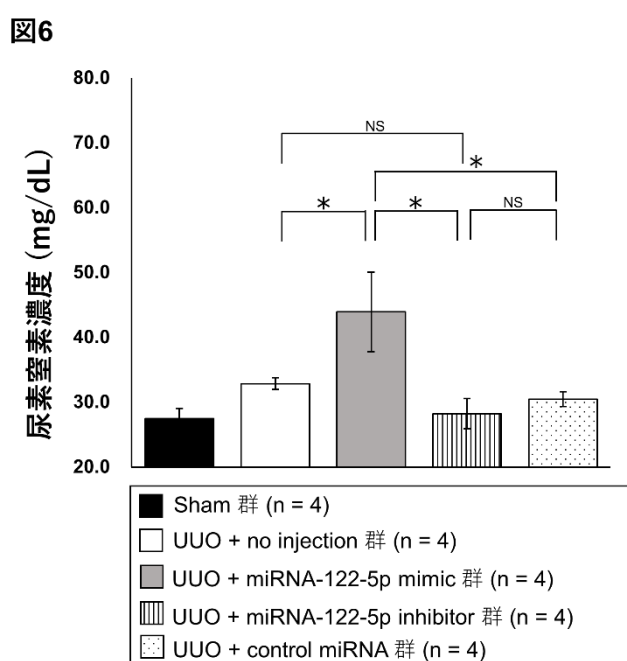


図6. 血清尿素窒素濃度. 血清尿素窒素濃度 (mg/dL) を4群 [UUO + no injection 群 (n = 6), UUO + miR-122-5p mimic 群 (n = 6), UUO + miR-122-5p inhibitor 群 (n = 6), UUO + control miRNA 群 (n = 6)] 間で比較した. 血清尿素窒素濃度は平均値及び標準誤差で示した. Abbreviations: miR, microRNA; UUO, unilateral ureteral obstruction; NS, not significant. \* p < 0.05.

### 3. 3. miR-122-5p が腎線維化を調節する機序の解析

miR-122-5p が腎線維化を調節する機序を解析するために, miR-122-5p が標的とする mRNA を TargetScan [[http://www.targetscan.org/vert\\_72/](http://www.targetscan.org/vert_72/) (アクセス日: 2020年5月21日)] を用いて調査した. その結果, 5種類の mRNA (*FOXO3*, *TGIF1*,

*CDC42BPB*, *EPO*, *HIF3A*) を miR-122-5p の標的候補として選出した。さらに *TGFBR2* が miR-122-5p の標的であり骨格筋線維化に関与することから [37], 本研究においても標的候補として追加した。合計 6 種類の mRNA の発現を qRT-PCR により解析した (図 7)。UUO + miR-122-5p mimic 群における *TGFBR2* (線維化促進因子) の発現は UUO + control miRNA 群及び UUO + no injection 群と比較して有意に増強した。また UUO + miR-122-5p inhibitor 群における *FOXO3* (線維化抑制因子) の発現は UUO + no injection 群と比較して有意に増強した。UUO + control miRNA 群との比較では UUO + miR-122-5p inhibitor 群において上昇傾向はみられたが、有意差は認められなかった。免疫組織化学染色により *TGFBR2* 及び *FOXO3* の蛋白発現を解析した。本研究では、*FOXO3* も糸球体、尿細管間質に発現しており、細胞内局在としては糸球体でも尿細管でもユビキタスに検出された (図 8)。UUO + miR-122-5p mimic 群における *TGFBR2* 発現は UUO + control miRNA 群及び UUO + no injection 群と比較して有意に増強した。また UUO + miR-122-5p inhibitor 群における *FOXO3* 発現は UUO + control miRNA 群及び UUO + no injection 群と比較して有意に増強した。*FOXO3* は組織線維化に対して抑制的な役割を有すると考えられていることから [38-41], *FOXO3* に着目し解析を進めた。KEGG PATHWAY Database [<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html> (アクセス日: 2021 年 8 月 3 日)] を用いて、*FOXO3* 単独での解析は不可能であったため、*FOXO* ファミリー分子 (*FOXO1*, *FOXO3*, *FOXO4*, *FOXO6*) の下流に存在すると予測されている mRNA を解析し 15 種類の mRNA (*SOD2*, *CAT*, *BNIP3*, *ATG12*, *LC3*, *CTSL*, *BCL2*, *FASL*, *TRAIL*, *BBC3*, *RBL2*, *CDKN1B*, *PEPCK*, *G6PC*, *FBXO32*) を選出し、それらの発現を qRT-PCR で解析した。UUO + miR-122-5p inhibitor 群における *LC3*(オートファジー関連遺伝子) の発現は UUO + control miRNA 群及び UUO + no injection 群と比較して有意に増強した (図 9)。*SOD2* (抗酸化関連遺伝子) の発現に関しては UUO + miR-122-5p inhibitor 群と UUO + control miRNA 群及び UUO + no injection 群との間に有意差は認められなかったが、UUO + miR-122-5p inhibitor 群と UUO + miR-122-5p mimic 群との間に有意差が認められた。

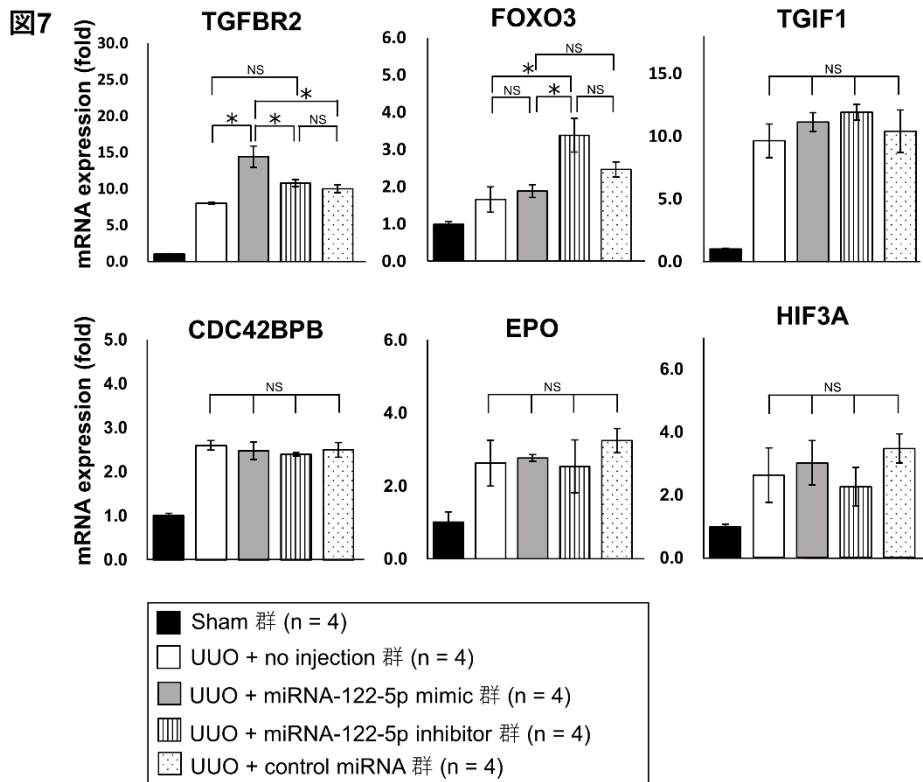


図7. miR-122-5pによる腎線線維化関連遺伝子の発現調節. 6種類のmRNA (*TGFBR2*, *FOXO3*, *TGIF1*, *CDC42BPB*, *EPO*, *HIF3A*)の相対的発現量をqRT-PCRにより解析した. mRNAの相対的発現量を4群 [UUO + no injection 群 (n = 4), UUO + miR-122-5p mimic 群 (n = 4), UUO + miR-122-5p inhibitor 群 (n = 4), UUO + control miRNA 群 (n = 4)]間で比較した. 相対的発現量は平均値及び標準誤差で示した.

Abbreviations: miR, microRNA; mRNA, messenger RNA; UUO, unilateral ureteral obstruction; qRT-PCR, quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction; TGFBR2, transforming growth factor, beta receptor II; FOXO3, forkhead box O3; TGIF1, Homeobox protein TGIF1; CDC42BPB, CDC42 binding protein kinase beta; EPO, erythropoietin; HIF3A, hypoxia-inducible factor 3 alpha; NS, not significant. \* p < 0.05.



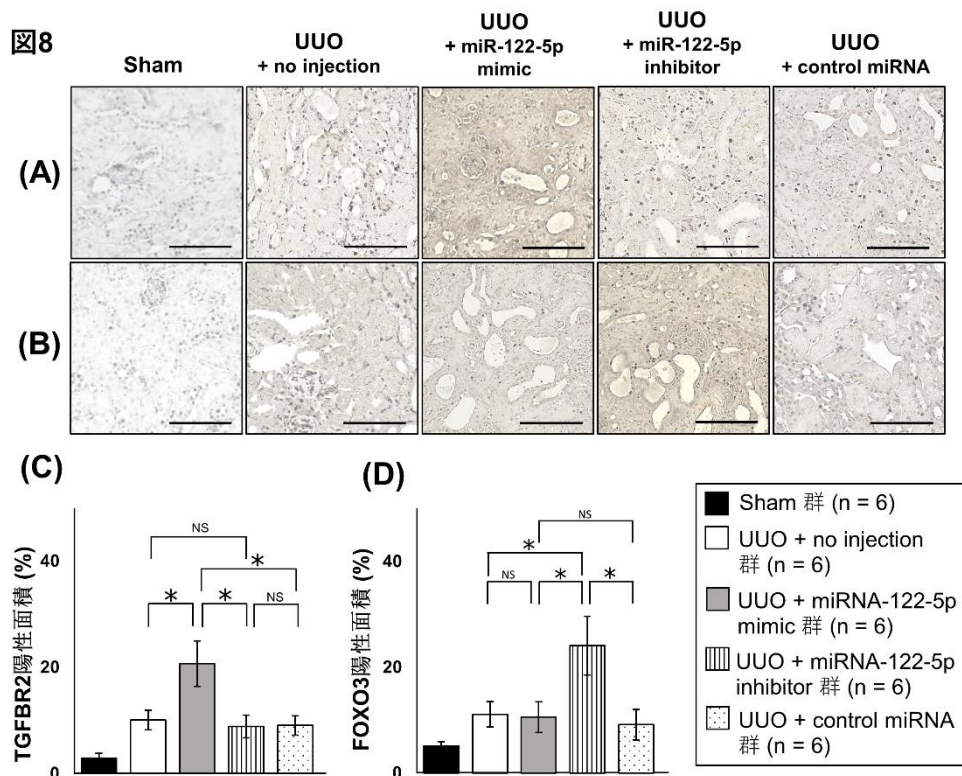


図 8. 免疫組織化学染色. TGFBR2 及び FOXO3 の蛋白発現を免疫組織化学染色により解析した. (A) TGFBR2 を標的抗原とした免疫組織化学染色. (B) FOXO3 を標的抗原とした免疫組織化学染色. (C) TGFBR2 陽性面積の比較. (D) FOXO3 陽性面積の比較. 免疫組織化学染色陽性面積を 4 群 [UUO + no injection 群 (n = 6), UUO + miR-122-5p mimic 群 (n = 6), UUO + miR-122-5p inhibitor 群 (n = 6), UUO + control miRNA 群 (n = 6)] 間で比較した. 陽性面積は平均値及び標準誤差で示した.

Abbreviations: miR, microRNA; UUO, unilateral ureteral obstruction; TGFBR2, transforming growth factor, beta receptor II; FOXO3, forkhead box 03. Scale bar = 100  $\mu$ m. \*  $p < 0.05$ .

図9

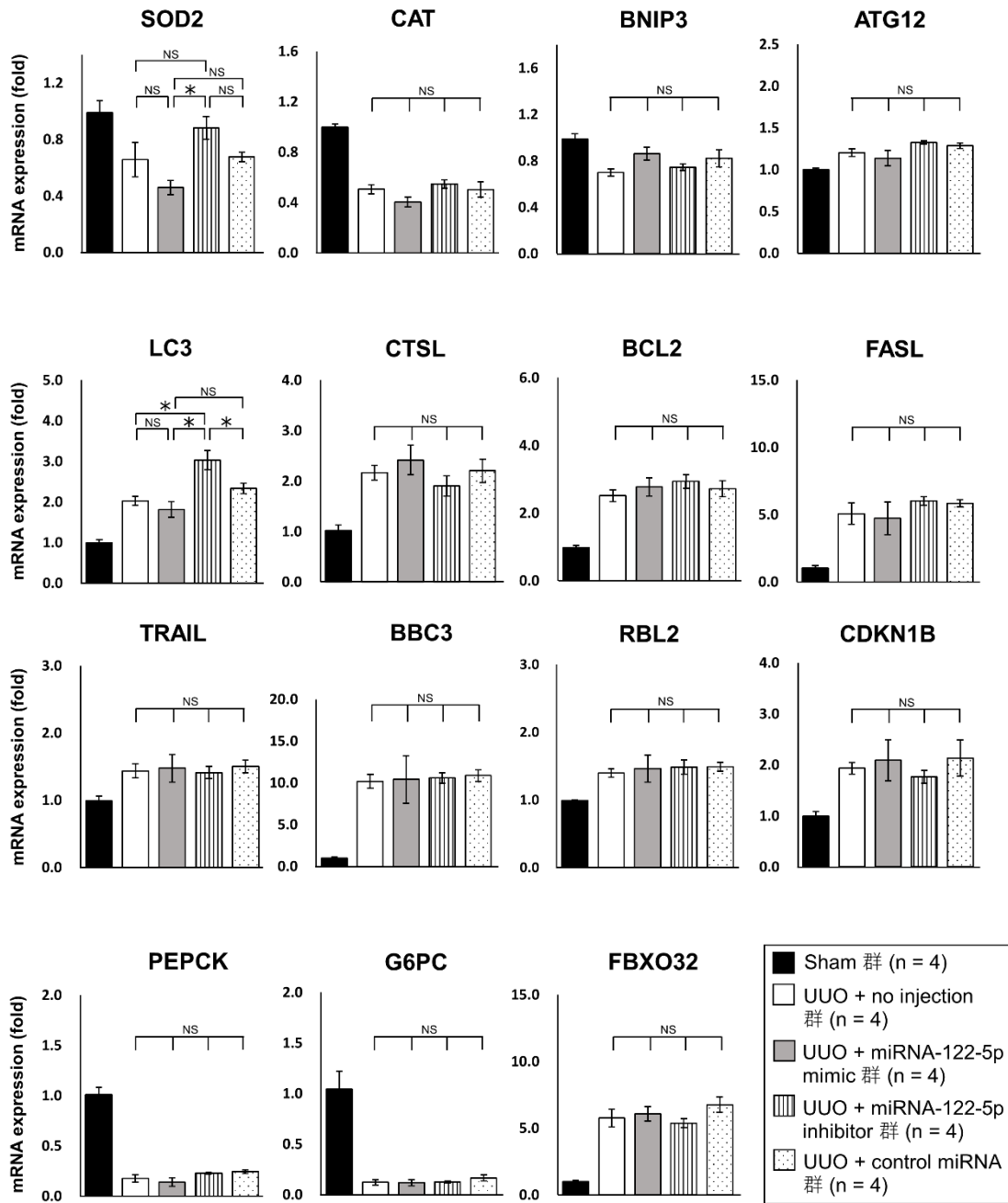


図9. FOXOファミリー分子の下流に存在する遺伝子の解析. 15種類の遺伝子 (*SOD2*, *CAT*, *BNIP3*, *ATG12*, *LC3*, *CTSL*, *BCL2*, *FASL*, *TRAIL*, *BBC3*, *RBL2*, *CDKN1B*, *PEPCK*, *G6PC*, *FBXO32*) の相対的発現量を qRT-PCR により解析した. mRNA の相対的発現量を 4 群 [UUO + no injection 群 (n = 4), UUO + miR-122-5p mimic 群 (n = 4), UUO + miR-122-5p inhibitor 群 (n = 4), UUO + control miRNA 群 (n = 4)] 間で比較した. 相対的発現量は平均値及び標準誤差で示した.

Abbreviations: miR, microRNA; UUO, unilateral ureteral obstruction; qRT-

PCR, quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction; SOD2, superoxide dismutase 2, mitochondrial; CAT, catalase; BNIP, BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3; ATG12, autophagy related 12; LC3, microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B; CTSL, cathepsin L1; BCL2, B-cell lymphoma 2; FASL, fas ligand; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand; BBC3, Bcl-2-binding component 3; RBL2, retinoblastoma-like protein 2; CDKN1B, cyclin-dependent kinase inhibitor 1B; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; G6PC, glucose-6-phosphatase, catalytic subunit; FBX032, F-box only protein 32; NS, not significant. \*  $p < 0.05$ .

#### 4. 考察

本研究では選出した miRNA (miR-122-5p) の mimic または inhibitor 投与することで miR-122-5p の発現を変化させることを外因性発現変化と定義した。本研究では miR-122-5p の外因性発現変動が腎線維化を調節することを明らかにした。また, miR-122-5p mimic 投与により TGFBR2 (線維化促進因子) の発現が有意に増強され腎線維化を促進した。一方, miR-122-5p inhibitor 投与により FOXO3 (線維化抑制因子) の発現が有意に増強され腎線維化を抑制した。腎線維化と miRNA の関連性はこれまでも報告されているが, miRNA の外因性発現変動による腎線維化への影響を検討した報告は少ない[5, 14-21]。その為, miR-122-5p の外因性発現変動による腎線維化への影響を検討した本報告は重要であると考えられる。

これまでも miRNA と腎線維化の関連は多く報告されている[5, 14-19]。miR-21, miR-22, miR-135a, miR-150, miR-155, miR-184, miR-214, miR-215, miR-216a, miR-324, miR-433, miR-1207 の発現は腎線維化で上昇すると報告されている[19, 42-45]。一方, let-7, miR-29, miR-30, miR-34, miR-152, miR-181, miR-194, miR-200, miR-455 の発現は腎線維化で低下すると報告されている[19, 22, 46-48]。本研究では, 3 種類の miRNA (miR-511-3p, miR-375-3p, miR-127-3p) の発現が線維化腎にて有意に増強し, 3 種類の miRNA (miR-122-5p, miR-504-3p, miR-363-3p) の発現が有意に減弱した。これらの miRNA と腎線維化との関連はこれまで報告されていない。腎線維化で影響を受ける miRNA が新規に発見された理由として, 実験デザインの違い (in vivo か in vitro), UUO 手術から腎臓回収までの期間, マイクロアレイ解析に用いたデータセットの違い, 採取した腎臓の領域 (皮質部, 髄質部) などが考えられた。本研究では miR-122-5p をさらなる詳細な解析対象として選出した。miR-122-5p は腎臓以外の臓器における線維化に関与していることが報告されている[37, 49]。Sun らは線維化骨格筋において miR-122-5p の発現が減弱し, さらに miR-122-5p の外因性発現増強は骨格筋線維化を抑制することを報告している[37]。また, Halász らは miR-122-5p の発現と肝線維化重症度との間に負の相関があることを報告している[49]。本研究で腎線維化との関与が予測された miR-122-5p 以外の miRNA (miR-511-3p, miR-375-3p, miR-127-3p, miR-504-3p, miR-363-3p) について, miR-375-3p は肝線維化や心筋線維化に関連すること[50, 51], miR-127-3p は虚血性腎症モデルにおける組織修復に関与している可能性があることが報告されており[52], これらの miRNA の腎線維化への治療効果についても今後検討する価値があると考えられ今後の研究課題としたい。

本研究では PEI-NPs を用いた miR-122-5p mimic/inhibitor の腎臓への送達

腎線維化を調節した。さらには、miR-122-5p mimic/inhibitor が TGFBR2 と FOXO3 の発現を調節した。TGFBR2 は TGF- $\beta$  /Smad シグナル経路における重要な構成要素であり、組織線維化において中心的な役割を担っている [53]。骨格筋線維化では外因性の miR-122-5p 発現増強に伴い TGFBR2 の発現が減弱し、線維性変化を抑制することが報告されている [37]。本研究では事前の予想と異なり miR-122-5p mimic が TGFBR2 の発現を増強させ腎線維化を促進した。この結果は、miR-122-5p が異なる臓器で異なる役割を持つ可能性を示唆している。また、miRNA は遺伝子発現を抑制する機能を持つが [12, 13]、本研究では miRNA-122-5p mimic が TGFBR2 の発現を増強させた。これは miR-122-5p と TGFBR2 の間に未同定の介在経路が存在する可能性が考えられた。FOXO3 は腎臓を含む様々な臓器で抗線維化作用を有することが報告されている [40, 54]。本研究では、miRNA-122-5p inhibitor 投与により FOXO3 の発現増強を介して腎線維化を抑制したと考えられた。FOXO3 はコンピュータ解析 (TargetScan) により miR-122-5p の標的として同定されたが、miR-122-5p mimic は FOXO3 の発現を抑制しなかった。この理由として腎線維化において miR-122-5p と FOXO3 の間に未同定の経路が存在する可能性が考えられた。本研究では、FOXO3 も糸球体、尿細管間質に発現しており、細胞内局在としては糸球体でも尿細管でもユビキタスに検出された。UUO モデルを対象に FOXO3 及び TGFBR2 の発現を免疫組織学的評価で検討した過去の報告はなく、今回の検討と比較することは困難であった。しかし過去の研究で FOXO3 が尿細管、糸球体を含む腎組織にユビキタスに発現していると報告されており [38, 55]、本研究の結果もこれらの報告と一致していた。TGFBR2 においても尿細管、糸球体に発現することが報告されており [56, 57]、過去の文献からは、主に上皮系細胞 (尿細管上皮細胞や足細胞) の細胞膜に発現していることが推察される [58-61]。一方で TGFBR2 は細胞質に輸送されることも報告されている [62]。今回の検討では FOXO3 同様に糸球体、尿細管間質に発現しており、細胞内局在としては糸球体でも尿細管でもユビキタスに検出された。

FOXO3 は組織線維化に対する抑制因子である [38-41]。FOXO3 は細胞ストレス、インスリンシグナル、成長因子、低酸素により発現が調節される [40, 63, 64]。FOXO3 の抗線維化作用は、抗酸化反応、オートファジー、筋線維芽細胞の増殖抑制を介すると考えられる [39-41]。しかし肝線維化や肺線維化と異なり、腎線維化における FOXO3 の影響に関する報告は少数である [54]。本研究では FOXO ファミリー分子 (FOXO1, FOXO3, FOXO4, FOXO6) の下流に存在すると予測された mRNA を解析し、FOXO ファミリー分子 (FOXO1, FOXO3, FOXO4, FOXO6) 下流遺伝子として、15 種類の mRNA (*SOD2*, *CAT*, *BNIP3*, *ATG12*, *LC3*, *CTSL*, *BCL2*, *FASL*, *TRAIL*, *BBC3*, *RBL2*, *CDKN1B*, *PEPCK*, *G6PC*, *FBXO32*) を選出し、これらの発現を qRT-PCR で解析した結果、UUO + miR-122-5p-inhibitor 群において *LC3* が有意に増強さ

れた。LC3はオートファジーの重要な制御因子である[65]。オートファジーは腎線維化で誘導され、線維化に対して抑制的な役割を有すると考えられている[66, 67]。さらにオートファジー欠損 (LC3 欠損) により腎線維化が促進されることも報告されている[65]。オートファジーが腎線維化を抑制する機序として、ポドサイトの自己修復への関与が示唆されているが、その詳細は未だ不明である[65, 68]。オートファジーの外因的な増強は腎線維化に対する治療標的として有望である可能性があり、今後の研究対象として興味深い[69]。SOD2の発現はUUO + miR-122-5p inhibitor 群とUUO + miR-122-5p mimic 群との間に有意差が認められた。本研究のコントロールである、UUO + control miRNA 群及びUUO + no injection 群との間に有意差が認められなかったことから結論に至らないものの、本結果はmiR-122-5pがSOD2を調節した可能性を示唆していると考えられた。SOD2は酸化ストレスを軽減する抗酸化遺伝子として広く知られており腎線維化に対する抑制因子である[54]。YoonらはTEMPOL(化学合成された抗酸化物質)がFOXO3及びSOD2の発現を増強し、UUOマウスの腎線維化を改善することを報告した[39]。さらにYangらはfucoxanthin(海洋性カロテノイド)が培養メサンギウム細胞においてFOXO3発現を増強しSOD2を増加させることを報告した[70]。これらの報告は本研究と矛盾しない。miR-122-5p inhibitorとSOD2の関係性を明らかにするためには今後さらなる検討が必要である。LC3及びSOD2以外の遺伝子には変動を認めなかった。本研究ではFOXOファミリー分子(FOXO1, FOXO3, FOXO4, FOXO6)の下流に存在すると予測されたmRNAを解析したため、本研究で変動がみられなかった下流遺伝子はFOXO3以外の同ファミリー分子(FOXO1, FOXO4, FOXO6)やその他の上流分子により調整を受けている可能性があると考えられた[71]。

LC3とSOD2に関してはヒトを対象とした研究でも、CKD及びその原因疾患との関連性が示されている(表2)。

表2. CKD及びその原因疾患におけるSOD2とLC3の関連を示したこれまでの研究。

標的	著者	国	年	患者	結果	引用
SOD2	Möllsten ら	スウェー デン	2009	1型糖尿病患者 (n = 411)	SOD2遺伝子多型は1型糖尿病 病患者における糖尿病性腎 症の発症と関連した。	[72]
SOD2	Prunotto ら	イタリア	2010	膜性腎症患者 (n = 24)	抗SOD2抗体が特発性膜性腎 症患者の血清及びポドサイ トから特異的に検出され た。	[73]

SOD2	Olsson ら	スウェーデン	2011	慢性腎臓病患者 (n = 30)	慢性腎臓病患者の好中球における SOD2 発現はコントロールと比較して有意に減弱した。	[74]
SOD2	Zaza ら	イタリア	2013	腹膜透析患者 (n = 15)	腹膜透析患者における血漿マロンジアルデヒド濃度(酸化マーカー)は上昇しており SOD2 の発現増強を伴った。	[75]
SOD2	Mohammedi ら	フランス	2014	1 型糖尿病患者 (n = 1, 285)	SOD2 遺伝子変異は 1 型糖尿病患者における糖尿病性腎症の発症の進行に関連した。	[76]
SOD2	Krueger ら	デンマーク, ドイツ	2016	慢性腎臓病患者 (n = 120) 血液透析患者 (n = 81)	単球中 SOD2 蛋白発現は慢性腎臓病の進行に伴って減弱した。血液透析導入後は増強に転じた。	[77]
SOD2	Jerotic ら	セルビア	2019	血液透析患者 (n = 256)	SOD2 遺伝子多型は末期腎不全に至るリスクに関連した。	[78]
SOD2	Corredor ら	スペイン	2020	慢性腎臓病 (n = 548)	SOD2 遺伝子多型は腎性貧血におけるエリスロポエチン抵抗性に関連した。	[79]
LC3	Miyazaki ら	日本	2014	IgA 腎症患者 (n = 48)	IgA 腎症患者の尿細管細胞においてプロレニン受容体の発現と LC3 発現は一致した。	[80]
LC3	Xiong ら	米国	2019	糖尿病性腎症患者 (n = 12)	糖尿病性腎症患者の尿中幹細胞において LC3 蛋白発現が減弱した。	[81]
LC3	Liu ら	中国	2019	糖尿病性腎症患者 (n = 11)	糖尿病性腎症患者のポドサイトにおいて LC3 陽性の液胞が認められた。	[82]
LC3	Ogawa-Akiyama ら	日本	2020	微小変化型ネフローゼ症候群患者 (n = 41)	LC3 は微小変化型ネフローゼ症候群患者のポドサイトに沈着し, オートファジーの	[83]

					局在性を示した.	
LC3	da Silva ら	ブラジル	2020	巣状糸球体硬化症 患者 (n = 22) 微小変化型ネフロ ーゼ症候群患者 (n = 27)	微小変化型ネフローゼ症候 群患者における LC3 陽性の ポドサイトは、巣状糸球体 硬化症患者よりも高密度で あった.	[84]

Abbreviations: SOD2, superoxide dismutase 2, mitochondrial; LC3, microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B.

本研究の結果のみでは FOXO3 が腎線維化を抑制させたと結論づけることは困難である。しかし、FOXO3 は抗線維化作用を持つことがこれまでに多く報告されており、本研究の結果もこれまでの報告を支持するものであった[38]。

本研究の限界として、小さなサンプルサイズであること、miR-122-5p mimic による TGFBR2 の発現増強に関する詳細な機序を明らかにしなかったこと、腎臓以外の臓器への影響については検討していないこと、サンプル量の限界から、BUN 以外の血中腎機能マーカー（クレアチニン、シスタチン C 等）を測定できていないことが挙げられる。また、FOXO3 及び TGFBR2 の蛋白発現の解析では Western blot を試みたが、様々な施行条件においても特異的な蛋白発現を示すバンドを得ることが出来なかった。その為免疫組織学的評価による解析を行った。さらに、シリウスレッド染色では非特異的な黒色点状沈着物が観察された。この原因として脱水や透徹に用いた試薬や研究過程が影響した可能性が考えられる。シリウスレッド染色により線維化面積を測定したことからこの影響は無視できず、今後の検討課題としたい。また、本研究で用いた腎臓サンプルは腎臓全体であり皮質部、髓質部に分離して解析することが出来ていない。UUO モデルでは皮質部尿細管間質線維化が主であると考えられており[85]、腎臓内の領域の違い（皮質部と髓質部の違い）は線維化を検討する上で重要である。本研究のテーマは尿細管間質であるが、皮質が含まれることから糸球体の要因を完全に除外出来ていない。UUO モデルは尿細管間質線維化を評価するモデルであり糸球体への影響は少ないと考えられているが[85]、今後の研究課題として、腎臓の皮質部・髓質部を完全に分離して解析することや、さらにはレーザーマイクロダイレクション法を用いて糸球体や尿細管セグメントを分離し解析することが必要であると考えられる[86]。腎線維化に対する miR-122-5p の治療効果について今後の大規模な研究において検討する必要がある。



## 5. 結論

腎線維化モデルマウスの腎臓において miR-122-5p の発現が減弱した。miR-122-5p mimic は TGFBR2 (線維化促進因子) の発現を増強させ腎線維化を促進させた。一方, miR-122-5p inhibitor は FOXO3 (線維化抑制因子) 及び下流遺伝子の LC3 (オートファジー関連遺伝子) の発現を増強させ腎線維化を抑制させた。これらの結果から miR-122-5p が腎線維化において重要な役割を果たすことが明らかになった。

## 6. 引用論文

1. Nogueira, A.; Pires, M.J.; Oliveira, P.A. Pathophysiological Mechanisms of Renal Fibrosis: A Review of Animal Models and Therapeutic Strategies. *In vivo (Athens, Greece)*, 31, 1-22, 2017.
2. Bülow, R.D.; Boor, P. Extracellular Matrix in Kidney Fibrosis: More Than Just a Scaffold. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 67, 643-661, 2019.
3. Schefold, J.C.; Filippatos, G.; Hasenfuss, G.; Anker, S.D.; von Haehling, S. Heart failure and kidney dysfunction: epidemiology, mechanisms and management. *Nat Rev Nephrol*, 12, 610-623, 2016.
4. Obrador, G.T.; Levin, A. CKD Hotspots: Challenges and Areas of Opportunity. *Seminars in nephrology*, 39, 308-314, 2019.
5. Lv, W.; Fan, F.; Wang, Y.; Gonzalez-Fernandez, E.; Wang, C.; Yang, L.; Booz, G.W.; Roman, R.J. Therapeutic potential of microRNAs for the treatment of renal fibrosis and CKD. *Physiological genomics*, 50, 20-34, 2018.
6. Wang, H.; Wang, B.; Zhang, A.; Hassounah, F.; Seow, Y.; Wood, M.; Ma, F.; Klein, J.D.; Price, S.R.; Wang, X.H. Exosome-Mediated miR-29 Transfer Reduces Muscle Atrophy and Kidney Fibrosis in Mice. *Mol Ther*, 27, 571-583, 2019.
7. Campanholle, G.; Ligresti, G.; Gharib, S.A.; Duffield, J.S. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 3. Novel mechanisms of kidney fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 304, 591-603, 2013.
8. Cho, M.H. Renal fibrosis. *Korean J Pediatr*, 53, 735-740, 2010.
9. Humphreys, B.D. Mechanisms of Renal Fibrosis. *Annu Rev Physiol*,

- 80, 309–326, 2018.
10. 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. *Int J Nanomedicine*, 10, 3475–3488, 2015.
  11. Fu, Y.; Tang, C.; Cai, J.; Chen, G.; Zhang, D.; Dong, Z. Rodent models of AKI-CKD transition. *Am J Physiol Renal Physiol*, 315, 1098–1106, 2018.
  12. Rupaimoole, R.; Slack, F.J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 16, 203–222, 2017.
  13. Vishnoi, A.; Rani, S. MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1509, 1–10, 2017.
  14. Meng, X.M.; Tang, P.M.; Li, J.; Lan, H.Y. TGF- $\beta$ /Smad signaling in renal fibrosis. *Frontiers in physiology*, 6, 82, 2015.
  15. Gomez, I.G.; Nakagawa, N.; Duffield, J.S. MicroRNAs as novel therapeutic targets to treat kidney injury and fibrosis. *American journal of physiology. Renal physiology*, 310, 931–944, 2016.
  16. Patel, V.; Nouredine, L. MicroRNAs and fibrosis. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 21, 410–416, 2012.
  17. Wang, B.; Ricardo, S. Role of microRNA machinery in kidney fibrosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 41, 543–550, 2014.
  18. Meng, X.M.; Nikolic-Paterson, D.J.; Lan, H.Y. TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol*, 12, 325–338, 2016.
  19. Van der Hauwaert, C.; Glowacki, F.; Pottier, N.; Cauffiez, C. Non-Coding RNAs as New Therapeutic Targets in the Context of Renal Fibrosis. *International journal of molecular sciences*, 20, 1977, 2019.
  20. Fierro-Fernández, M.; Miguel, V.; Márquez-Expósito, L.; Nuevo-Tapióles, C.; Herrero, J.I.; Blanco-Ruiz, E.; Tituaña, J.; Castillo, C.; Cannata, P.; Monsalve, M.; Ruiz-Ortega M.; Ramos R.; Lamos S. MiR-9-5p protects from kidney fibrosis by metabolic reprogramming. *Faseb j*, 34, 410–431, 2020.
  21. Glowacki, F.; Savary, G.; Gnemmi, V.; Buob, D.; Van der Hauwaert, C.; Lo-Guidice, J.M.; Bouyé, S.; Hazzan, M.; Pottier, N.; Perrais,

- M.; Aubert M.; Cauffiez C. Increased circulating miR-21 levels are associated with kidney fibrosis. *PLoS one*, 8, e58014, 2013.
22. Morizane, R.; Fujii, S.; Monkawa, T.; Hiratsuka, K.; Yamaguchi, S.; Homma, K.; Itoh, H. miR-34c attenuates epithelial-mesenchymal transition and kidney fibrosis with ureteral obstruction. *Scientific reports*, 4, 4578, 2014.
  23. Zeisberg, M.; Kalluri, R. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med (Berl)*, 82, 175-181, 2004.
  24. Zhong, X.; Chung, A.C.; Chen, H.Y.; Meng, X.M.; Lan, H.Y. Smad3-mediated upregulation of miR-21 promotes renal fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 22, 1668-1681, 2011.
  25. Yanai, K.; Kaneko, S.; Ishii, H.; Aomatsu, A.; Ito, K.; Hirai, K.; Ookawara, S.; Ishibashi, K.; Morishita, Y. Quantitative Real-Time PCR Evaluation of microRNA Expressions in Mouse Kidney with Unilateral Ureteral Obstruction. *J Vis Exp*, 27, 2020.
  26. Chevalier, R.L.; Forbes, M.S.; Thornhill, B.A. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney international*, 75, 1145-1152, 2009.
  27. Martínez-Klimova, E.; Aparicio-Trejo, O.E.; Tapia, E.; Pedraza-Chaverri, J. Unilateral Ureteral Obstruction as a Model to Investigate Fibrosis-Attenuating Treatments. *Biomolecules*, 9, 141, 2019.
  28. 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.
  29. Godbey, W.T.; Wu, K.K.; Mikos, A.G. Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 5177-5181, 1999.
  30. Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M.A.; Mergny, M.D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J.P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 7297-7301, 1995.
  31. Akinc, A.; Thomas, M.; Klibanov, A.M.; Langer, R. Exploring

- polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *J Gene Med*, 7, 657–663, 2005.
32. Zhao, Q.Q.; Chen, J.L.; Lv, T.F.; He, C.X.; Tang, G.P.; Liang, W.Q.; Tabata, Y.; Gao, J.Q. N/P ratio significantly influences the transfection efficiency and cytotoxicity of a polyethylenimine/chitosan/DNA complex. *Biol Pharm Bull*, 32, 706–710, 2009.
  33. Hao, F.; Li, Y.; Zhu, J.; Sun, J.; Marshall, B.; Lee, R.J.; Teng, L.; Yang, Z.; Xie, J. Polyethylenimine-based Formulations for Delivery of Oligonucleotides. *Curr Med Chem*, 26, 2264–2284, 2019.
  34. Huang, X.; Hartley, A.V.; Yin, Y.; Herskowitz, J.H.; Lah, J.J.; Ressler, K.J. AAV2 production with optimized N/P ratio and PEI-mediated transfection results in low toxicity and high titer for in vitro and in vivo applications. *J Virol Methods*, 193, 270–277, 2013.
  35. Junqueira, L.C.; Bignolas, G.; Brentani, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical journal*, 11, 447–455, 1979.
  36. Griffiths-Jones, S.; Saini, H.K.; van Dongen, S.; Enright, A.J. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*, 36, D154–158, 2008.
  37. Sun, Y.; Wang, H.; Li, Y.; Liu, S.; Chen, J.; Ying, H. miR-24 and miR-122 Negatively Regulate the Transforming Growth Factor- $\beta$ /Smad Signaling Pathway in Skeletal Muscle Fibrosis. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 11, 528–537, 2018.
  38. Lin, F. Molecular regulation and function of FoxO3 in chronic kidney disease. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 29, 439–445, 2020.
  39. Yoon, H.E.; Kim, S.J.; Kim, S.J.; Chung, S.; Shin, S.J. Tempol attenuates renal fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction: the role of PI3K-Akt-FoxO3a signaling. *J Korean Med Sci*, 29, 230–237, 2014.
  40. Li, L.; Kang, H.; Zhang, Q.; D'Agati, V.D.; Al-Awqati, Q.; Lin, F. FoxO3 activation in hypoxic tubules prevents chronic kidney disease. *The Journal of clinical investigation*, 129, 2374–2389,

- 2019.
41. Bijkerk, R.; de Bruin, R.G.; van Solingen, C.; van Gils, J.M.; Duijs, J.M.; van der Veer, E.P.; Rabelink, T.J.; Humphreys, B.D.; van Zonneveld, A.J. Silencing of microRNA-132 reduces renal fibrosis by selectively inhibiting myofibroblast proliferation. *Kidney international*, 89, 1268–1280, 2016.
  42. Zhou, H.; Hasni, S.A.; Perez, P.; Tandon, M.; Jang, S.I.; Zheng, C.; Kopp, J.B.; Austin, H., 3rd; Balow, J.E.; Alevizos, I.; Illei, G.G. miR-150 promotes renal fibrosis in lupus nephritis by downregulating SOCS1. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 24, 1073–1087, 2013.
  43. He, F.; Peng, F.; Xia, X.; Zhao, C.; Luo, Q.; Guan, W.; Li, Z.; Yu, X.; Huang, F. MiR-135a promotes renal fibrosis in diabetic nephropathy by regulating TRPC1. *Diabetologia*, 57, 1726–1736, 2014.
  44. Zhang, Y.; Zhao, S.; Wu, D.; Liu, X.; Shi, M.; Wang, Y.; Zhang, F.; Ding, J.; Xiao, Y.; Guo, B. MicroRNA-22 Promotes Renal Tubulointerstitial Fibrosis by Targeting PTEN and Suppressing Autophagy in Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res*, 2018, 4728645, 2018.
  45. Alvarez, M.L.; Khosroheidari, M.; Eddy, E.; Kiefer, J. Role of microRNA 1207-5P and its host gene, the long non-coding RNA Pvt1, as mediators of extracellular matrix accumulation in the kidney: implications for diabetic nephropathy. *PLoS one*, 8, e77468, 2013.
  46. Shen, Y.; Zhao, Y.; Wang, L.; Zhang, W.; Liu, C.; Yin, A. MicroRNA-194 overexpression protects against hypoxia/reperfusion-induced HK-2 cell injury through direct targeting Rheb. *J Cell Biochem*, 120, 8311–8318, 2019.
  47. Zhang, X.; Yang, Z.; Heng, Y.; Miao, C. MicroRNA-181 exerts an inhibitory role during renal fibrosis by targeting early growth response factor-1 and attenuating the expression of profibrotic markers. *Mol Med Rep*, 19, 3305–3313, 2019.
  48. Ning, Y.X.; Wang, X.Y.; Wang, J.Q.; Zeng, R.; Wang, G.Q. miR-152 regulates TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition by targeting HPIP in tubular epithelial cells. *Mol Med Rep*, 17, 7973–7979, 2018.

49. Halász, T.; Horváth, G.; Pár, G.; Werling, K.; Kiss, A.; Schaff, Z.; Lendvai, G. miR-122 negatively correlates with liver fibrosis as detected by histology and FibroScan. *World J Gastroenterol*, 21, 7814-7823, 2015.
50. Zhuang, Y.; Yang, D.; Shi, S.; Wang, L.; Yu, M.; Meng, X.; Fan, Y.; Zhou, R.; Wang, F. MiR-375-3p Promotes Cardiac Fibrosis by Regulating the Ferroptosis Mediated by GPX4. *Computational intelligence and neuroscience*, 2022, 9629158, 2022.
51. Yang, Y.Z.; Zhao, X.J.; Xu, H.J.; Wang, S.C.; Pan, Y.; Wang, S.J.; Xu, Q.; Jiao, R.Q.; Gu, H.M.; Kong, L.D. Author Correction: Magnesium isoglycyrrhizinate ameliorates high fructose-induced liver fibrosis in rat by increasing miR-375-3p to suppress JAK2/STAT3 pathway and TGF- $\beta$ 1/Smad signaling. *Acta pharmacologica Sinica*, 43, 1616, 2021.
52. Conde, E.; Giménez-Moyano, S.; Martín-Gómez, L.; Rodríguez, M.; Ramos, M.E.; Aguado-Fraile, E.; Blanco-Sanchez, I.; Saiz, A.; García-Bermejo, M.L. HIF-1 $\alpha$  induction during reperfusion avoids maladaptive repair after renal ischemia/reperfusion involving miR127-3p. *Scientific reports*, 7, 41099, 2017.
53. Biernacka, A.; Dobaczewski, M.; Frangogiannis, N.G. TGF- $\beta$  signaling in fibrosis. *Growth Factors*, 29, 196-202, 2011.
54. Xin, Z.; Ma, Z.; Hu, W.; Jiang, S.; Yang, Z.; Li, T.; Chen, F.; Jia, G.; Yang, Y. FOXO1/3: Potential suppressors of fibrosis. *Ageing research reviews*, 41, 42-52, 2018.
55. Chen, X.; Liu, W.; Xiao, J.; Zhang, Y.; Chen, Y.; Luo, C.; Huang, Q.; Peng, F.; Gong, W.; Li, S.; He, X.; Zhuang, Y.; Wu, N.; Liu, X.; Wang, Y. FOXO3a accumulation and activation accelerate oxidative stress-induced podocyte injury. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 34, 13300-13316, 2020.
56. Yang, Q.; Ren, G.L.; Wei, B.; Jin, J.; Huang, X.R.; Shao, W.; Li, J.; Meng, X.M.; Lan, H.Y. Conditional knockout of TGF- $\beta$  RII /Smad2 signals protects against acute renal injury by alleviating cell necroptosis, apoptosis and inflammation. *Theranostics*, 9, 8277-8293, 2019.
57. Yamamoto, T.; Watanabe, T.; Ikegaya, N.; Fujigaki, Y.; Matsui,

- K. ; Masaoka, H. ; Nagase, M. ; Hishida, A. Expression of types I, II, and III TGF-beta receptors in human glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 9, 2253-2261, 1998.
58. López-Hernández, F.J. ; López-Novoa, J.M. Role of TGF- $\beta$  in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects. *Cell and tissue research*, 347, 141-154, 2012.
59. Lin, Z. ; Chen, A. ; Cui, H. ; Shang, R. ; Su, T. ; Li, X. ; Wang, K. ; Yang, J. ; Gao, K. ; Lv, J. ; Shen, J. ; Wang, S. ; Qi, Y. ; Guo, M. ; Zhu, Y. Renal tubular epithelial cell necroptosis promotes tubulointerstitial fibrosis in patients with chronic kidney disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 36, e22625, 2022.
60. Heldin, C.H. ; Miyazono, K. ; ten Dijke, P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 390, 465-471, 1997.
61. Morikawa, M. ; Derynck, R. ; Miyazono, K. TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8, a021873, 2016.
62. Yakymovych, I. ; Yakymovych, M. ; Heldin, C.H. Intracellular trafficking of transforming growth factor  $\beta$  receptors. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 50, 3-11, 2018.
63. Sanese, P. ; Forte, G. ; Disciglio, V. ; Grossi, V. ; Simone, C. FOXO3 on the Road to Longevity: Lessons From SNPs and Chromatin Hubs. *Comput Struct Biotechnol J*, 17, 737-745, 2019.
64. Morris, B.J. ; Willcox, D.C. ; Donlon, T.A. ; Willcox, B.J. FOXO3: A Major Gene for Human Longevity--A Mini-Review. *Gerontology*, 61, 515-525, 2015.
65. Ding, Y. ; Kim, S. ; Lee, S.Y. ; Koo, J.K. ; Wang, Z. ; Choi, M.E. Autophagy regulates TGF- $\beta$  expression and suppresses kidney fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 25, 2835-2846, 2014.
66. Kim, Y.A. ; Kim, H.J. ; Gwon, M.G. ; Gu, H. ; An, H.J. ; Bae, S. ; Leem, J. ; Jung, H.J. ; Park, K.K. Inhibitory Effects of STAT3 Transcription Factor by Synthetic Decoy ODNs on Autophagy in Renal Fibrosis. *Biomedicines*, 9, 331, 2021.

67. Chung, S. ; Son, M. ; Chae, Y. ; Oh, S. ; Koh, E. S. ; Kim, Y. K. ; Shin, S. J. ; Park, C. W. ; Jung, S. C. ; Kim, H. S. Fabry disease exacerbates renal interstitial fibrosis after unilateral ureteral obstruction via impaired autophagy and enhanced apoptosis. *Kidney research and clinical practice*, 40, 208–219, 2021.
68. Hartleben, B. ; Gödel, M. ; Meyer-Schwesinger, C. ; Liu, S. ; Ulrich, T. ; Köbler, S. ; Wiech, T. ; Grammer, F. ; Arnold, S. J. ; Lindenmeyer, M. T. ; Cohen, C. D. ; Pavenstädt, H. ; Kerjaschki, D. ; Mizushima, N. ; Shaw, A. S. ; Walz, G. ; Huber, T. B. Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice. *The Journal of clinical investigation*, 120, 1084–1096, 2010.
69. Yu, H. X. ; Lin, W. ; Yang, K. ; Wei, L. J. ; Chen, J. L. ; Liu, X. Y. ; Zhong, K. ; Chen, X. ; Pei, M. ; Yang, H. T. Transcriptome-Based Network Analysis Reveals Hirudin Potentiates Anti-Renal Fibrosis Efficacy in UUO Rats. *Frontiers in pharmacology*, 12, 741801, 2021.
70. Yang, G. ; Jin, L. ; Zheng, D. ; Tang, X. ; Yang, J. ; Fan, L. ; Xie, X. Fucoxanthin Alleviates Oxidative Stress through Akt/Sirt1/FoxO3 $\alpha$  Signaling to Inhibit HG-Induced Renal Fibrosis in GMCs. *Marine drugs*, 17, 702, 2019.
71. Link, W. Introduction to FOXO Biology. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1890, 1–9, 2019.
72. Möllsten, A. ; Jorsal, A. ; Lajer, M. ; Vionnet, N. ; Tarnow, L. The V16A polymorphism in SOD2 is associated with increased risk of diabetic nephropathy and cardiovascular disease in type 1 diabetes. *Diabetologia*, 52, 2590–2593, 2009.
73. Prunotto, M. ; Carnevali, M. L. ; Candiano, G. ; Murtas, C. ; Bruschi, M. ; Corradini, E. ; Trivelli, A. ; Magnasco, A. ; Petretto, A. ; Santucci, L. ; Mattei, S. ; Gatti, R. ; Scolari, F. ; Kador, P. ; Allegri, L. ; Ghiggeri, G. M. Autoimmunity in membranous nephropathy targets aldose reductase and SOD2. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 21, 507–519, 2010.
74. Olsson, J. ; Jacobson, T. A. ; Paulsson, J. M. ; Dadfar, E. ; Moshfegh, A. ; Jacobson, S. H. ; Lundahl, J. Expression of neutrophil SOD2 is reduced after lipopolysaccharide stimulation: a potential cause of neutrophil dysfunction in chronic kidney disease. *Nephrology*,



*dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 26, 2195-2201, 2011.

75. Zaza, G. ; Granata, S. ; Masola, V. ; Rugiu, C. ; Fantin, F. ; Gesualdo, L. ; Schena, F.P. ; Lupo, A. Downregulation of nuclear-encoded genes of oxidative metabolism in dialyzed chronic kidney disease patients. *PloS one*, 8, e77847, 2013.
76. Mohammedi, K. ; Bellili-Muñoz, N. ; Driss, F. ; Roussel, R. ; Seta, N. ; Fumeron, F. ; Hadjadj, S. ; Marre, M. ; Velho, G. Manganese superoxide dismutase (SOD2) polymorphisms, plasma advanced oxidation protein products (AOPP) concentration and risk of kidney complications in subjects with type 1 diabetes. *PloS one*, 9, e96916, 2014.
77. Krueger, K. ; Shen, J. ; Maier, A. ; Tepel, M. ; Scholze, A. Lower Superoxide Dismutase 2 (SOD2) Protein Content in Mononuclear Cells Is Associated with Better Survival in Patients with Hemodialysis Therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 7423249, 2016.
78. Jerotic, D. ; Matic, M. ; Suvakov, S. ; Vucicevic, K. ; Damjanovic, T. ; Savic-Radojevic, A. ; Pljesa-Ercegovic, M. ; Coric, V. ; Stefanovic, A. ; Ivanisevic, J. ; Jelic-Ivanovic, Z. ; McClements, L. ; Dimkovic N. ; Simic T. Association of Nrf2, SOD2 and GPX1 Polymorphisms with Biomarkers of Oxidative Distress and Survival in End-Stage Renal Disease Patients. *Toxins*, 11, 431, 2019.
79. Corredor, Z. ; Filho, M. ; Rodríguez-Ribera, L. ; Velázquez, A. ; Hernández, A. ; Catalano, C. ; Hemminki, K. ; Coll, E. ; Silva, I. ; Diaz, J.M. ; Ballarin, J. ; Prats, M.V. ; Martínez, J.C. ; Försti, A. ; Marcos, R. ; Pastor, S. Genetic Variants Associated with Chronic Kidney Disease in a Spanish Population. *Scientific reports*, 10, 144, 2020.
80. Miyazaki, N. ; Murata, I. ; Takemura, G. ; Okada, H. ; Kanamori, H. ; Matsumoto-Miyazaki, J. ; Yoshida, G. ; Izumi, K. ; Kashi, H. ; Niimi, K. ; Nishiwaki, A. ; Miyazaki, T. ; Ohno, M. ; Ohashi, H. ; Suzuki, F. ; Minatoguchi, S. Expression of prorenin receptor in renal biopsies from patients with IgA nephropathy. *International journal of clinical and experimental pathology*, 7, 7485-7496,

2014.

81. Xiong, G. ; Tang, W. ; Zhang, D. ; He, D. ; Wei, G. ; Atala, A. ; Liang, X. J. ; Bleyer, A. J. ; Bleyer, M. E. ; Yu, J. ; Aloji, J. A. ; Ma, J. ; Furdui, C. M. ; Zhang, Y. Impaired Regeneration Potential in Urinary Stem Cells Diagnosed from the Patients with Diabetic Nephropathy. *Theranostics*, 9, 4221-4232, 2019.
82. Liu, W. J. ; Gan, Y. ; Huang, W. F. ; Wu, H. L. ; Zhang, X. Q. ; Zheng, H. J. ; Liu, H. F. Lysosome restoration to activate podocyte autophagy: a new therapeutic strategy for diabetic kidney disease. *Cell death & disease*, 10, 806, 2019.
83. Ogawa-Akiyama, A. ; Sugiyama, H. ; Kitagawa, M. ; Tanaka, K. ; Kano, Y. ; Mise, K. ; Otaka, N. ; Tanabe, K. ; Morinaga, H. ; Kinomura, M. ; Uchida, H. A. ; Wada, J. Podocyte autophagy is associated with foot process effacement and proteinuria in patients with minimal change nephrotic syndrome. *PLoS one*, 15, e0228337, 2020.
84. da Silva, C. A. ; Monteiro, M. ; Araújo, L. S. ; Urzedo, M. G. ; Rocha, L. B. ; Dos Reis, M. A. ; Machado, J. R. In situ evaluation of podocytes in patients with focal segmental glomerulosclerosis and minimal change disease. *PLoS one*, 15, e0241745, 2020.
85. Kido, T. ; Tsunoda, M. ; Sugaya, C. ; Hano, H. ; Yanagisawa, H. Fluoride potentiates tubulointerstitial nephropathy caused by unilateral ureteral obstruction. *Toxicology*, 392, 106-118, 2017.
86. Micanovic, R. ; Khan, S. ; El-Achkar, T. M. Immunofluorescence laser micro-dissection of specific nephron segments in the mouse kidney allows targeted downstream proteomic analysis. *Physiological reports*, 3, 12306, 2015.