

氏名	かね こ しょう へい 金子 昌平
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 676 号
学位授与年月日	令和 5 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	腎尿細管間質線維化を調節する microRNA の解析
論文審査委員	(委員長) 教授 齋藤 修 (委員) 教授 松村 正巳 准教授 岩津 好隆

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

慢性腎臓病 (chronic kidney disease : CKD) は患者の生命予後悪化を招き、心臓冠動脈疾患や脳血管障害の発症に関与する。CKD は医療経済学的な観点からも大きな問題となっており、詳細な機序の解明と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り、CKD 患者の腎予後に強く関連する。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。

microRNA (miRNA) は 21-25 塩基長の、non-coding RNA である。miRNA は標的とする messenger RNA (mRNA) の 3'末端非翻訳領域に結合し蛋白質の合成を抑制することで、様々な疾患の発症や進行に関与することが報告されている。腎線維化と miRNA の関与も報告されているが、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。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 研究方法

腎線維化モデルマウスとして C57BL/6 (8 週齢, 雄) に片側尿管結紮 (unilateral ureteral obstruction : UUO) を施し UUO マウスを作成した。UUO マウスの腎臓における miRNA の発現変動をマイクロアレイ解析及び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) により網羅的に解析した。さらに腎線維化を調節することが予測される miRNA を選出した。選出した miRNA の mimic/inhibitor を UUO マウスに経静脈的投与し腎線維化に与える影響を検討した。選出した miRNA が腎線維化を調節する機序を解明するために文献検索及び TargetScan ([https://www.targetscan.org/vert\\_80/](https://www.targetscan.org/vert_80/)) を用いて、選出された miRNA が標的とする mRNA を調査し、その mRNA 発現を qRT-PCR により解析した。さらに該当の mRNA が翻訳する蛋白質の発現を免疫組織化学染色により解析した。加えて、KEGG PATHWAY Database (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) を用いて、該当の mRNA 及び蛋白質が腎線維化

を調節する機序を調査し、関与が予測された mRNA の発現を qRT-PCR により解析した。

### 3 研究成果

UUO マウスの腎臓で発現が変動する miRNA をマイクロアレイ解析及び qRT-PCR により網羅的に解析し、UUO マウスの腎臓にて miR-122-5p の発現が最も減弱（コントロールと比較し 0.28 倍に変動）することを確認した。UUO マウスに miR-122-5p mimic/inhibitor を経静脈的投与し、腎線維化に与える影響を検討した。組織学的評価（アザン染色、シリウスレッド染色）では、UUO + miR-122-5p mimic 群で腎線維化が促進され、UUO + miR-122-5p inhibitor 群で腎線維化が抑制された。さらに腎線維化関連 mRNA (COL1A2, FN1) の発現を qRT-PCR により解析し、UUO + miR-122-5p mimic 群で増強し、UUO + miR-122-5p inhibitor 群で減弱することを確認した。miR-122-5p が標的とする mRNA を文献検索及び TargetScan を用いて調査し、6 種類の mRNA (TGFB2, CDC42BPB, FOXO3, EPO, HIF3A, TGIF1) を選出した。これらの mRNA 発現を qRT-PCR により解析し、UUO + miR-122-5p mimic 群において TGFB2（腎線維化促進因子）発現が増強し、UUO + miR-122-5p inhibitor 群において FOXO3（腎線維化抑制因子）発現が増強することを確認した。免疫組織化学染色を実施し、UUO + miR-122-5p mimic 群において TGFB2 蛋白発現が増強し、UUO + miR-122-5p inhibitor 群において FOXO3 蛋白発現が増強することを確認した。FOXO3 による腎線維化抑制機序を解明するために KEGG PATHWAY Database を用いて FOXO ファミリー分子の下流遺伝子を調査し、15 種類の mRNA (SOD2, CAT, BNIP3, ATG12, LC3, CTSL, BCL2, FASL, TRAIL, BBC3, RBL2, CDKN1B, PEPCK, G6PC, FBXO32) を選出した。これらの mRNA 発現を qRT-PCR により解析し、UUO + miR-122-5p inhibitor 群にて LC3（オートファジー関連因子）の発現が増強することを確認した。

### 4 考察

UUO マウスにおいて外因的に miR-122-5p の発現を変動させることにより腎線維化が調節された。その機序として、miR-122-5p mimic 投与による TGFB2 発現増強及び miR-122-5p inhibitor 投与による FOXO3 発現増強が関与していることが示唆された。TGFB2 は線維化促進因子と考えられ、TGF- $\beta$ /Smad シグナル伝達経路の重要な構成要素である。FOXO3 は線維化抑制因子と考えられ、その機序として抗酸化作用やオートファジーの関連が報告されている。本研究では UUO + miR-122-5p inhibitor 群（FOXO3 発現増強が認められた群）にて LC3（オートファジー関連因子）の発現が増強しており、過去の報告に矛盾しない。

### 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。UUO マウスに対する miR-122-5p mimic 投与は TGFB2（腎線維化促進因子）の発現増強を伴い腎線維化を促進した。miR-122-5p inhibitor 投与は FOXO3（腎線維化抑制因子）の発現増強及び下流遺伝子である LC3（オートファジー関連因子）の発現増強を伴い腎線維化を抑制した。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。

## 論文審査の結果の要旨

### 1. 研究目的

本研究は腎臓線維化モデルとして確立している片側尿管結紮モデル (UUO) に対して miRNA 法を用いた新たな実験方法で機序解明を目指した斬新な研究である。特に近年、高齢者の腎機能低下、慢性腎臓病患者の増加などが社会的にも問題になっており、腎臓線維化抑制の研究は、現在解明が強く望まれる腎疾患のひとつであり、臨床的意義の高い研究である。

### 2. 研究方法について

多数の miRNA の中から、発現増加や減少につながるものを選択し、qRT-PCR 法を用いて複数の候補 miRNA からターゲットを選定する実験プロトコールは客観的かつ科学的で、その結果の妥当性は高い。また、選定されたターゲット miRNA である miRNA-122-5p に対して行われた検証は病理組織学的手法で証明しており、inhibitor や mimic を用いた実験系で miRNA122-5p の関与をより強く示唆する傍証となっている。

これらの点からも、本研究は非常によくデザインされ論理的構築も十分であり、また、UUO 線維化に対する機序を新たな実験手技から切り込んで行われた先進的で独創性が高い研究である。

一方で、腎臓線維化については、糸球体硬化、尿細管間質線維化、血管（動脈）周囲の線維化などが含まれ、それぞれの部位により線維化を起こす機序が異なると考えられている。今回用いた UUO モデルは尿細管間質線維化を主に生じるが、本研究で述べられている腎臓線維化という表現は、これらの部位を明確に規定しておらず、腎臓のどのような部位に miRNA122-5p が関与する線維化が顕著に起こるかを解明すべきであり、今後の検討課題とした。

### 3. 研究結果について

本研究では miRNA と qRT-PCR を用いて mRNA-122-5p の腎臓線維化への関与を検証しているが、本来であれば転写後の蛋白質レベルでの検証が必要であり Western Blotting による、腎髄質、皮質、糸球体など部位別に定量的検討を行うことが望ましい。しかしながら、本研究では Western Blotting は行われず、免疫組織学的な検証で半定量的に蛋白質レベルでの発現検証が行われた。免疫組織学的な検証は用いる抗体の精度により結果が大きく異なる点から、Western Blotting による検証や、ネフロンセグメントに特異的な培養細胞を用いた検証などを今後、行う事が望ましい。だが、その一方で miRNA-122-5p により生じる腎臓線維化モデルが線維化に関与する FOXO3、TGFB2 の発現に影響を及ぼした事を証明する追加実験は、本研究結果の正当性を傍証しており、評価に値する結果であった。

### 4. 本研究の成果、および医学的意義

UUO モデルに mi-RNA-122-5p mimic、inhibitor を投与した実験モデルを作成し本研究ではその有効性を証明した。この結果は、mi-RNA-122-5p をターゲットにした創薬の可能性を示唆する重要な研究結果であり、腎臓線維化の新たな治療の礎になり得る本研究結果の意義は非常に大きい。

上記理由により、本研究の独創性、得られた新たな miRNA122-5p の腎臓線維化への知見は、基礎医学のみならず臨床医学的にも意義深いものであり、自治医科大学医学博士、学位論文に相応しい内容といえる。審査員全員の合意のもと、本論文を本学大学院学位論文として合格とした。

## 最終試験の結果の要旨

本研究のプレゼンテーションに関しては、本研究の意図する目的や医学的な意義などを明確に発表することが出来ていた。また、実験系の客観性や論理性についても十分理解、検証できていた。実験方法や実験手技に関する説明も詳細に説明が出来ており、これらの項目に対する質疑応答にも的確に回答できていた。

問題点としては、腎臓の線維化の腎組織の部位による特異性や機序の違いについての検討が些か不十分で、実験に用いた腎組織についても、皮質、髄質などの部位別の考察が不十分であった。これらの点については、学位論文での追加説明が行われることになった。

研究者としての技量については、本研究で用いられた mRNA や qRT-PCR などの分子生物学的実験手技の習得度や、免疫組織学的染色の習熟度については、大学院での研究期間で習得できるレベルとしては非常に良好で、評価に値するものであった。また、統計的な手法も十分理解出来ており実験結果の解釈、質疑応答での的確な回答などプレゼンテーション能力にも長けていた。

これらの観点から自治医科大学医学博士試問に相応しい発表であり、審査員全員の合意のもと、本研究発表の最終試験は合格とする。