

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 廣田 慧悟

横浜市立大学大学院医学研究科 病態制御内科学

審査員

- 主査) 横浜市立大学大学院医学研究科 循環制御医学 主任教授 石川 義弘
副査) 横浜市立大学大学院医学研究科 泌尿器科学 准教授 蓮見 壽史
副査) 横浜市立大学大学院医学研究科 内分泌・糖尿病内科学 講師 富樫 優子

博士の学位論文審査結果の要旨

miR-125a-5p/miR-125b-5p contributes to pathological activation of Angiotensin II-AT1R in mouse distal convoluted tubule cells by the suppression of Atrap

miR-125a-5p/miR-125b-5p は、マウス遠位尿細管細胞におけるアンジオテンシン II-AT1R シグナルの活性化を ATRAP の抑制を介して制御する

◇◇◇◇…………… 本 文 ……………
要旨（序論・方法・結果・考察）

序論

レニン-アンジオテンシン系 (RAS) は血圧の調節に重要な役割を果たしている。Angiotensin II (Ang II)-Ang II タイプ 1 受容体 (AT1R) シグナル伝達経路の活性化は、高血圧の発症やそれに伴う臓器障害に関わる。AT1R 関連タンパク質 (ATRAP) は、AT1R の生理的シグナル伝達に影響を与えることなく、AT1R の病的活性化を抑制する内因性タンパク質として同定された。我々はこれまでに ATRAP がマウスにおいて高血圧を含む様々な Ang II-AT1R シグナルを介する病態を抑制することを明らかにしてきた。一方で、ATRAP 発現はマウスや培養細胞においては Ang II 刺激により、ヒトにおいても様々な病態で変化することが知られている。しかしその調節機構はほとんど解明されていない。microRNA (miRNA) は 21-23 ヌクレオチドの低分子 RNA で、mRNA の不安定化や翻訳抑制などを行うことで標的遺伝子の転写後制御を担う。これまでに多数の miRNA が Ang II-AT1R シグナルに関連する疾患の調節因子として同定されている。

本研究では、Ang II 刺激下のヒト/マウス ATRAP 発現を制御する miRNA が存在すると仮説を立て、その miRNA の同定と Ang II-AT1R シグナル伝達への関与について検証することを目的とした。

実験材料と方法

Ang II-AT1R シグナルによる ATRAP 発現制御について検証するために、まずマウス遠位尿細管 (mDCT) 細胞に対する Ang II 刺激への応答を調べたところ、ATRAP mRNA 発現は上昇し、タンパク質発現は低下を示した。mRNA とタンパク質発現の挙動に違いが見られたことから転写後制御を担う因子の存在が想定され、miRNA の関与に着目した。まず、腎臓において ATRAP mRNA に直接作用する可能性の高い、ヒトとマウスで保存された 4 つの miRNA をデータベース解析により同定した。次に、これらの阻害剤を用いて mDCT 細胞におけるマウス ATRAP 発現への影響やヒト不死化近位尿細管細胞 (ciRPTEC) におけるヒト ATRAP 発現への影響を解析した。その後、

ATRAP の発現への影響が確認された miRNA の阻害剤を用いて、mDCT 細胞において Ang II 刺激による ATRAP 発現変動や Ang II-AT1R シグナルへ及ぼす影響を解析した。

結果

mDCT 細胞に Ang II 刺激を加えた結果、既報と同様マウス ATRAP タンパク質発現の低下や AngII-AT1R シグナルにより発現が増強することが知られている Endothelial Sodium Channel α (α ENaC) や Transforming Growth Factor- β (TGF β) の mRNA 発現上昇を認めた。一方でマウス ATRAP mRNA 発現は上昇した。このことから ATRAP の発現調節に miRNA の関与を疑い、そのプロセシング因子である Drosha/Dicer を、siRNA を用いてノックダウンした。その結果、マウス ATRAP タンパク質発現の上昇を認め、miRNA の関与が強く示唆された。そこでヒトとマウスの ATRAP mRNA に直接作用しうる miRNA を、データベースを解析により 4 つ同定した。次に、これらの miRNA 阻害剤を用いて解析した結果、mDCT 細胞において miR-125a-5p/miR-125b-5p がマウス ATRAP mRNA に直接作用し、ATRAP 発現を抑制する miRNA であることを明らかにした。また、ヒト ciRPTEC を用いた検証により miR-125a-5p/miR-125b-5p の作用はヒト ATRAP に対しても進化的に保存されていることを明らかにした。次に Ang II 刺激時の miR-125a-5p 阻害剤の影響を、mDCT 細胞を用いて解析した結果、miR-125a-5p/miR-125b-5p 阻害剤によりマウス ATRAP 発現が亢進することにより、AT1R シグナルが抑制されることが示唆された。

考察

本研究では、miR-125a-5p/miR-125b-5p が mDCT 細胞およびヒト ciRPTEC において、マウスやヒトの ATRAP mRNA を直接標的とし、その発現を抑制することを明らかにした。さらに、miR-125a-5p/miR-125b-5p の阻害は、mDCT 細胞において Ang II 刺激により誘導されるプロテアソームサブユニットや TGF β 、 α ENaC 発現上昇、p38 MAPK の活性化などの作用を抑制することを明らかにした。このことから、miR-125a-5p/miR-125b-5p は ATRAP の発現抑制を介し、Ang II-AT1R シグナル伝達を促進し、高血圧や心血管疾患の発症に関与している可能性が示された。本研究では、細胞レベルの解析に留まっており、miR-125a-5p 阻害剤を生体投与することで、高血圧や心血管疾患などの Ang II-AT1R シグナルが関与する病態を改善し得るか検証することが今後の課題である。

質疑応答詳細

副査蓮見：

・ miR-125 の定量はしているのか

→miR-125a-5p や miR-125b-5p については RT-qPCR にて解析・定量を行った。

・プロテアソームに関して、ヒトの ATRAP 分解にはどのような経路が想定されているか

→ライソソームに依存した経路もしくは、まれではユビキチン化によらないプロテアソーム経路による分解もあるようであり、いずれかの経路を想定している。

・ miR-125 のオフターゲットについては考慮していく必要がある

→仰る通りであり, RNA シークエンスのような網羅的な解析も検討する必要がある.

・ miR-125 が分解されたメカニズムは何か考えがありますか?

→なかなか想定が難しいが、Ang II 刺激による AT1R を介したシグナル活性よりも AT2R を介したシグナル活性の可能性も考えている.

副査富樫:

・ ARB との違いや特性は?

→ARB などは過剰な作用による副作用の報告があるが、ATRAP は生理的な範囲での作用は保つことが可能なため、過剰な作用を起こしにくいという差別化は可能かもしれない.

・ A2 刺激について経時的变化は? またそれはなぜ?

→本研究では経時的变化については検証していない. 既報でタンパク質は一度減少し経時的に回復する報告がある. これはおそらく ATRAP による Ang II 阻害作用を減弱させるために一時的に低下させその後過剰にならないように回復させていると考察している.

主査石川

・ この研究に携わって発見した意義はなんだと考えていますか?

→ヒト ATRAP に関わる制御因子を発見したことや、miR-125 が ATRAP 含め Ang II シグナルに関与し制御している可能性を見出したことであると考えている.

・ この研究の実験はどれくらい自分でやったのか? どれくらいの頻度で来ていたのか

→ほぼ全て私が行った. 多いときは週 6-7 日大学に来て実験・解析などを行った.

・ JBC に投稿した際に指摘されたことは?

→1 回目はプロテアソーム経路についてのデータがなく reject であった. そのデータを加えて再投稿した際は、マウスでの検証や miR-125 の gain of function についての言及があった.

以上により博士 (医学) の学位授与に値すると判断された。