

学位論文の要旨

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)

March, 2024
(2024年03月)

Keigo Hirota
廣田 慧悟

Department of Medical Science and Cardio-renal Medicine
Yokohama City University Graduate School of Medicine,
(横浜市立大学 大学院医学研究科 医科学専攻 病態制御内科学)

Doctoral Supervisor: Kouichi Tamura, Professor

(指導教員：田村 功一 教授)

学位論文の要旨

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)

<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105478>

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 (Tamura et al., 2022)。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 (Wakui et al., 2010, 2013, Ohsawa et al., 2014, Masuda et al., 2010)。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) (Friedman, P.A et al., 2009) 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 シグナルに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。

引用文献

Tamura, K., Azushima, K., Kinguchi, S., Wakui, H. & Yamaji, T. (2022), ATRAP, a receptor-interacting modulator of kidney physiology, as a novel player in blood pressure and beyond. *Hypertens Res*, 45(1), 32-9.

Friedman, R. C., K. K. Farh, C. B. Burge and D. P. Bartel (2009). "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs." *Genome Res* 19(1): 92-105.

Masuda, S., K. Tamura, H. Wakui, A. Maeda, T. Dejima, T. Hirose, M. Toyoda, K. Azuma, M. Ohsawa, T. Kanaoka, M. Yanagi, S. Yoshida, H. Mitsuhashi, M. Matsuda, T. Ishigami, Y. Toya, D. Suzuki, Y. Nagashima and S. Umemura (2010). "Expression of angiotensin II type 1 receptor-interacting molecule in normal human kidney and IgA nephropathy." *Am J Physiol Renal Physiol* 299(4): F720-731.

Ohsawa, M., K. Tamura, H. Wakui, A. Maeda, T. Dejima, T. Kanaoka, K. Azushima, K. Uneda, Y. Tsurumi-Ikeya, R. Kobayashi, M. Matsuda, S. Uchida, Y. Toya, H. Kobori, A. Nishiyama, A. Yamashita, Y. Ishikawa and S. Umemura (2014). "Deletion of the angiotensin II type 1 receptor-associated protein enhances renal sodium reabsorption and exacerbates angiotensin II-mediated hypertension." *Kidney International* 86(3): 570-581.

Wakui, H., K. Tamura, S. Masuda, Y. Tsurumi-Ikeya, M. Fujita, A. Maeda, M. Ohsawa, K. Azushima, K. Uneda, M. Matsuda, K. Kitamura, S. Uchida, Y. Toya, H. Kobori, K. Nagahama, A. Yamashita and S. Umemura (2013). "Enhanced angiotensin receptor-associated protein in renal tubule suppresses angiotensin-dependent hypertension." *Hypertension* 61(6): 1203-1210.

Wakui, H., K. Tamura, M. Matsuda, Y. Bai, T. Dejima, A. Shigenaga, S. Masuda, K. Azuma, A. Maeda, T. Hirose, T. Ishigami, Y. Toya, M. Yabana, S. Minamisawa and S. Umemura (2010). "Intrarenal suppression of angiotensin II type 1 receptor binding molecule in angiotensin II-infused mice." *Am J Physiol Renal Physiol* 299(5): F991-F1003.

論文目録

I 主論文

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

Hirota, K., Yamashita, A., Abe, E., Yamaji, T., Azushima, K., Tanaka, S., Taguchi, S., Tsukamoto, S., Wakui, H., Tamura, K.

Journal of Biological Chemistry. In press

II 参考論文

1. Angiotensin II type-1 receptor-associated protein interacts with transferrin receptor-1 and promotes its internalization.

Abe, E., Yamashita, A., Hirota, K., Yamaji, T., Azushima, K., Urate, S., Suzuki, T., Tanaka, S., Taguchi, S., Tsukamoto, S., Uehara, T., Wakui, H., Tamura, K. & Takahashi, H.

Sci Rep. Vol.12, No.1, 17376, 2022.

2. Esaxerenone for nocturnal hypertension and possible future direction for treatment of hypertension-cardiovascular-kidney comorbidity.

Tamura, K., Kanaoka, T., Fujiwara, N. & Hirota, K.

Hypertension Research. Vol. 46, No. 8, 2059-2061, 2023.

3. Angiotensin II type 1 receptor-associated protein in immune cells: a possible key factor in the pathogenesis of visceral obesity.

Tsukamoto, S., Suzuki, T., Wakui, H., Uehara, T., Ichikawa, J., Okuda, H., Haruhara, K., Azushima, K., Abe, E., Tanaka, S., Taguchi, S., Hirota, K., Kinguchi, S., Yamashita, A., Tamura, T., Tamura, K.

Metabolism. Vol. 149, 155706, 2023.

4. Combination of sacubitril/valsartan and blockade of the PI3K pathway enhanced kidney protection in a mouse model of cardiorenal syndrome.

Tsukamoto, S., Wakui, H., Uehara, T., Shiba, Y., K., Azushima, K., Abe, E., Tanaka, S., Taguchi, S., Hirota, K., Urate, S., Suzuki, T., Yamada, T., Kinguchi, S., Yamashita, A., Tamura, T., Tamura, K.

Eur Heart J Open. Vol. 3, No. 6, 2023.