

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	古 賀 健 一
論文題目	MicroRNA-26a inhibits TGF-β-induced extracellular matrix protein expression in podocytes by targeting CTGF and is downregulated in diabetic nephropathy (MicroRNA-26a はポドサイトにおいて CTGF を標的とし TGF-β による細胞外基質産生を抑制し、糖尿病性腎症において発現低下する意義に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
糖尿病性腎症では、多くの増殖因子・サイトカインが蛋白尿発症・増悪、および腎線維化進展に関与していることが示されているが、なかでも TGF-βは線維化を促進する重要な因子であると考えられている。さらに、TGF-βにより誘導される connective tissue growth factor(CTGF)は、線維化亢進作用を有するほか、TGF-βと協調してその作用を増強し線維化の進展に関わると想定されている。 microRNA (miRNA) は約 22 塩基の非翻訳 RNA であり、3'-untranslated region(UTR)に部分相補的な配列を持つ標的 mRNA と結合し、標的 mRNA の翻訳抑制や分解を引き起こす。miRNA は重要な生物学的機能を制御するだけでなく、疾患における意義も報告されている。腎臓においても、糸球体発生や腎線維化等に関する報告があるが、いまだ不明な点が多い。今回、CTGF を標的とし、かつ糖尿病性腎症の病態に関わる miRNA を検索し、miRNA の TGF-βシグナルや細胞外基質産生に及ぼす作用、さらには臨床的意義を明らかにすることを目的として本研究を行った。 培養ヒトポドサイトに TGF-β1 刺激を加え miRNA 発現の網羅的解析を行い、CTGF を標的とする microRNA-26a(miR-26a)に着目した。培養ポドサイトに miR-26a mimic をトランスフェクションすることにより、CTGF 蛋白は 50%減少し CTGF 3'-UTR レポーターアッセイにおけるルシフェラーゼ活性は 40%減少した。このことより CTGF が直接のターゲットであることを示した。また miR-26a mimic は TGF-β1 によるコラーゲン産生を有意に抑制した。TGF-β/SMAD シグナル系に及ぼす影響を smad binding element ルシフェラーゼレポーターアッセイで検討したところ、miR-26a mimic は TGF-β /SMAD シグナルを抑制した。さらに、miR-26a の host gene である small carboxy-terminal domain phosphatase CTDSP2 および CTDSPL の mRNA 発現は miR-26a の mimic により抑制され、miR-26a は host gene の autoregulation に関与していた。また siRNA により CTDSP2 もしくは CTDSPL を抑制すると TGF-β1 によるコラーゲン産生が亢進し、CTDSP2/L が TGF-β/SMAD シグナルの調整に関わることを示した。C57BL/6J マウスの腎における miR-26a 発現を <i>in situ</i> hybridization で解析したところ、ポドサイトを含む糸球体内の細胞に認められた。次にストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病マウスの糸球体中の miR-26a 発現を real-time PCR を用いて検討したところ、STZ 投与 3 週後で有意に低下していた。最後に腎生検を施行した糖尿病性腎症 11 症例を対象とし、腎生検凍結切片から laser microdissection により糸球体を回収し real-time PCR で miRNA 発現量を解析した。miR-26a 発現と eGFR は正の相関を示し、腎症進行例で miR-26a が低下していた($p < 0.05$, $r = 0.659$)。本研究により miR-26a はポドサイトにおいて CTGF を抑制し TGF-β1 の線維化誘導作用を減弱させることを示した。miR-26a 発現の低下が CTGF 亢進や TGF-βシグナルの調節異常を引き起こし糖尿病性腎症の進展に関与している可能性が示唆された。			

(論文審査の結果の要旨)
Connective tissue growth factor (CTGF) を標的とし、かつ糖尿病性腎症の病態に関わる microRNA (miRNA) を検索し、miRNA の TGF-β シグナルや腎線維化に及ぼす作用、さらには臨床的意義を明らかにすることを目的とし、ヒト培養ポドサイトや糖尿病モデルマウスおよびヒト糖尿病性腎症の腎生検サンプルを用いた研究が行われた。
microRNA-26a (miR-26a) の mimic をトランスフェクションしたポドサイトでは CTGF 蛋白は減少し、CTGF 3'-UTR レポーターアッセイを用いた検討により miR-26a はポドサイトにおいて CTGF を直接ターゲットとすることを示した。また、miR-26a は TGF-β/SMAD シグナルおよび TGF-β により誘導されるコラーゲンを抑制した。miR-26a はホスト遺伝子である CTDSP2 と CTDSPL をターゲットとし、CTDSP2 と CTDSPL を抑制した。マウス腎では miR-26a はポドサイトに発現しており、ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスの糸球体ではその発現が低下していた。ヒトの糖尿病性腎症においては腎症進行例において miR-26a 発現が低下していた。
以上の研究は miR-26a の CTGF および TGF-β/SMAD シグナルの制御メカニズムの解明に貢献し、糖尿病性腎症の新たな機序の解明に寄与するところが多い。
したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。
なお、本学位授与申請者は、平成 27 年 11 月 17 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。