

主論文の要旨

Long non-coding RNA Inc-CHAF1B-3 promotes renal interstitial fibrosis by regulating EMT-related genes in renal proximal tubular cells

Long non-coding RNA Inc-CHAF1B-3は
腎近位尿細管細胞のEMT関連遺伝子調節を
介して腎線維化を促進する

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 腎臓内科学分野

(指導：丸山 彰一 教授)

今井 健太郎

【緒言】

慢性腎臓病は世界中で深刻な健康問題となっている。男性、女性の慢性腎臓病の世界的な発生率はそれぞれ 10.4%、11.8%と高く、腎臓専門医が直面している重要な課題である。慢性腎臓病に至る疾患は多様であるが、いずれにおいても腎間質の線維化は共通する病理学的経路である。腎線維化は、炎症細胞浸潤、線維芽細胞の蓄積、尿細管の萎縮、間質毛細血管の希薄化、および正常な腎構造を置き換える細胞外マトリックスの過剰な蓄積によって特徴付けられ、腎機能障害を引き起こす。腎線維化の正確な分子メカニズムは未だ不明であるが、尿細管上皮細胞の上皮間葉転換(EMT)は、腎線維化の主な原因の一つと考えられている。しかし、その治療法はまだ確立されていない。Long non-coding RNA (lnc RNA)は 200 以上のヌクレオチドで構成される非タンパク質コード RNA で、エピジェネティックな修飾、転写調節、および転写後修飾を通じて多くの生理病理学的プロセスで役割を果たしていると考えられている。近年多様な役割が明らかになってきているが、腎線維化との関連は未解明である。そこで、本研究では腎線維化の進展に関連する lncRNA を探索し、その働きについて解析を行った。

【対象及び方法】

近位尿細管細胞株の HK-2 と近位尿細管細胞の初代培養である RPTEC の 2 種類の細胞を用い、TGF- β 1 刺激と低酸素刺激により共通して発現が増加する lncRNA をマイクロアレイで探索し、lnc-CHAF1B-3 を抽出した。その役割を複数の siRNA、ASO を用いて評価した。また、IgA 腎症および minor glomerular abnormality (MGA) 患者の腎生検組織を用いて qPCR、in situ hybridization (ISH) を行い、疾患重症度と腎組織内の lnc-CHAF1B-3 発現の相関や、その局在を評価した。

【結果】

TGF- β 1 刺激にて HK-2 での lnc-CHAF1B-3 発現はマイクロアレイの結果と同様、有意に増加していた (Figure 1A)。そして複数の siRNA (#1/2) と ASO #1 を用いた lnc-CHAF1B-3 の抑制により、EMT 関連遺伝子 (COL1A1、CDH2、PAI-1、SNAI1、SNAI2) 発現の有意な低下を認めた (Figure 1B-L)。また、RNA-seq 解析では siRNA (#1/#2) での lnc-CHAF1B-3 の抑制により、HK-2 での EMT、TGF- β シグナル伝達、および低酸素症に関連する遺伝子セットの発現は有意に低下することが明らかになった。さらに、各 siRNA によって発現が変動した上位 20 位以内の遺伝子セットのうち、14 セットは共通しており lnc-CHAF1B-3 による特異的な効果であることが示唆された。RPTEC では、複数の ASO (#1/2) を用いて検討した。RPTEC においても TGF- β 1 刺激にて lnc-CHAF1B-3 の発現は有意に増加し (Figure 2A)、また lnc-CHAF1B-3 の抑制による EMT 遺伝子変化は HK-2 と同様であった (Figure 2B、2D-G、2I-L)。なお、CDH1 mRNA に変化は認めなかったものの、CDH1 タンパクは TGF- β 1 刺激によって大幅に減少し、lnc-CHAF1B-3 抑制後に回復が見られた (Figure 2C、2H、2L)。これらの結果より、lnc-CHAF1B-3 が腎近位尿細管細胞での TGF- β 1 誘導 EMT プロセスに関与していることが示された。

ヒト腎疾患における lnc-CHAF1B-3 の役割を検討するために、IgA 腎症患者の腎生検検体を遡及的に解析した。2014 年から 2016 年にかけて、名古屋大学関連病院にて腎生検により IgA 腎症と診断された合計 611 人の患者のうち、選択基準に従って 20 人(軽症例 7 例、重症例 13 例)を抽出した。薄切した腎生検組織より RNA を抽出し、qPCR にて解析を行った。軽症例および正常腎の代替として選択した MGA 症例(3 例)との比較にて、重症例の腎 lnc-CHAF1B-3 発現は有意に増加していた(Figure 3A)。また、臨床パラメータとの相関を解析したところ、腎 lnc-CHAF1B-3 発現と血清 Cre 値、eGFR、尿蛋白、腎病理における interstitial fibrosis and tubular atrophy (IF/TA) 率との間に有意な相関を認められた(Figure 3B-F)。また、慢性腎臓病の定義に基づき、eGFR のカットオフ値を 60mL/min/1.73m² として IgA 腎症症例を eGFR 保持群と障害群に分けたところ、腎 lnc-CHAF1B-3 発現は障害群において有意に高かった(Figure 3G)。

ヒト腎生検組織を用い、lnc-CHAF1B-3 の ISH(green)と CD10(red、近位尿細管)、EMA (blue、遠位尿細管)、DAPI(blue、細胞核)の多重染色を行ったところ(Figure 4A-C)、lnc-CHAF1B-3 は近位尿細管細胞質に発現していることが判明した。

【考察】

本研究の 1 つ目の主要な知見は、新規 lncRNA である lnc-CHAF1B-3 が、腎近位尿細管細胞における TGF- β 1 および低酸素誘導 EMT プロセスに関与していることである。lnc-CHAF1B-3 の抑制は、HK-2 における TGF- β 1 誘導 COL1A1、CDH2、PAI-1、SNAI1、および SNAI2 の mRNA および蛋白発現を大幅に低下させた(Figure 1B-L)。これらの効果は、2 つの異なる siRNA と ASO #1 でも確認された。同様の結果が RPTEC でも観察され、lnc-CHAF1B-3 が EMT プロセスに関連した重要な役割を果たすことが示唆された(Figure 2)。

本研究の 2 つ目の主要な知見は、慢性腎不全の原因の中で頻度の高い疾患である IgA 腎症と lnc-CHAF1B-3 発現との臨床的関連性である。IgA 腎症患者の腎組織において、lnc-CHAF1B-3 発現は、軽症例および MGA 症例と比較して、重症例において有意に増加していた(Figure 3A)。さらに、腎 lnc-CHAF1B-3 発現は、IgA 腎症患者の尿蛋白および腎機能障害の進行と相関しており(Figure 3B-G)、蛋白尿誘発性腎機能障害に重要な関連があることが示唆される。尿蛋白は IgA 腎症の予後不良因子であることがわかっているが、lnc-CHAF1B-3 は広く慢性腎臓病で同様の役割を果たすことが予想される。また RNA scope FISH の結果より、lnc-CHAF1B-3 は近位尿細管細胞質で発現することが示された(Figure 4)。lnc-CHAF1B-3 を治療対象とする際に近位尿細管を標的とできることは drug delivery の観点で有利に働く可能性がある。

【結語】

腎において lnc-CHAF1B-3 は近位尿細管に発現し、腎線維化の過程においてその発現は亢進し、その抑制により腎線維化が軽減されることが示唆された。lnc-CHAF1B-3 は腎線維化治療の新たな標的となる可能性がある。