

Research on biomarkers for predicting renal function decline in diabetic nephropathy (糖尿病性腎症における腎機能予後予測バイオマーカーの探索研究)

佐竹 栄一郎

ハーバード大学附属ジョスリン糖尿病センター Genetics & Epidemiology

要 旨

糖尿病性腎症は進行性の糖尿病合併症で、蛋白尿、腎機能低下、そして最終的に腎不全を来たす。腎機能を評価するマーカーについては現在エビデンスが構築されてきたが、末期腎不全(ESRD: End-stage Renal Disease)の予測因子としてのバイオマーカーは未だ確立していない。miRNAは21~25塩基対ほどのノンコーディングRNAであり、発生や細胞分化の過程のみならず、ヒトの遺伝子の少なくとも50%を制御しているといわれ、悪性腫瘍や各種腎臓病などさまざまな疾患の診断マーカーおよび治療ターゲットとして注目されている。今回我々は、糖尿病性腎症を有する1型糖尿病患者および、40年以上に渡って腎機能低下がみられない同疾患患者(Resistors)を対象に、血漿中のmiRNAを網羅的に解析し、ESRDのリスク因子および保護因子について検討を行った。現在知られている1,066種類のmiRNAについて解析したところ、23種類のmiRNAがResistors群において、高または低発現していた。さらにそのうち8つのmiRNAは、糖尿病性腎症の病態に深く関係するTGF- β 経路に関与していた。今回の結果より、これらのmiRNAが糖尿病性腎症における新たなバイオマーカーの候補であるのみならず、治療ターゲットとして有用である可能性が示唆された。

内 容

(背景と目的)

糖尿病性腎症は進行性の糖尿病合併症で、主に微量アルブミン尿から始まり、顕性蛋白尿、腎機能低下、そして最終的には末期腎不全(ESRD: End-stage Renal Disease)となり、透析導入を余儀なくされる¹。その主な病態は腎の線維化と慢性炎症であり、ポリオール経路や終末糖化産物(AGE)の蓄積、酸化ストレスといった多くの経路が糖尿病性腎症の進展に関与し、中でもトランスフォーミング増殖因子transforming growth factor- β (TGF- β)は腎線維化の重要なメディエータとなっている²。

腎機能を評価するマーカーについては現在エビデンスが構築されてきたが³⁻⁵、ESRDの予測因子としてのバイオマーカーは未だに確立していない。また糖尿病性腎症患者の中でも、腎機能低下の経過はさまざまであり、微量アルブミンを呈してから数年でESRDになり、透析治療に至る患者もいれば、蛋白尿を呈しながらも、腎機能が数十年にわたって保たれる患者もいる。このように患者によって腎機能低下の経過が全く異なるメカニズムはほとんど分かっていない。

マイクロRNA(以下miRNA)は、従来のタンパク質をコードするmRNAとは異なり、タンパク質

をコードしていないにも関わらず転写されるノンコーディングRNAである。miRNAはこれまでに、2,000種類以上が同定されており、今なお新たなmiRNAの報告が続いている⁶。それらは主に細胞内に存在し、他の遺伝子発現を調節する機能を持ち、発生や細胞分化の過程のみならず、ヒトの遺伝子の少なくとも50%を制御しているといわれている⁷。近年miRNAはヒトの血液、尿、唾液、組織などにも安定して発現していることが見いだされ、疾病の診断、治療の新たなバイオマーカーとして注目されている⁸。さらにmiRNAは治療薬としても精力的に研究が行われており、例えばある疾患で特定のmiRNAの発現が亢進している場合は機能阻害を、逆に発現が低下している場合は、低下しているmiRNAを補充するという2つのアプローチで開発が進められている⁹⁻¹¹。

前回我々は、蛋白尿を呈する1型糖尿病患者において、推定糸球体濾過量(eGFR)が正常の患者を対象とし、その後7～20年の経過観察中に腎不全に至った症例と、腎機能がその期間保たれていた症例についてmiRNAプロファイルの比較検討を行った。その結果、TGF- β 経路に關与するlet-7c-5pとmiR-29a-3pが早期腎不全に対してリスクを50%減らす保護因子であるのに対し、let-7b-5pとmiR-21-5pが2.5倍以上ESRDへのリスクを上昇させる促進因子であることを報告した¹²。しかしながら、長期にわたって腎機能が保たれる症例についてのmiRNAプロファイルは、これまでのところ報告がない。そこで今回我々は、糖尿病性腎症における腎保護因子としてのmiRNAをさらに検討すべく、1型糖尿病の罹病期間が40年以上にもかかわらず、腎機能正常かつ正常アルブミン尿を保っている患者(ESRDへ抵抗しているということでResistorsと定義)に焦点を当て、miRNAの網羅的解析を行った。

(方法)

ジョスリン糖尿病センターに通院中のおよそ5,000名の1型糖尿病患者のうち、Joslin Kidney Study (JKS)に参加した約3,500名から、推算糸球体濾過量(eGFR)が正常のものを対象とした。40年以上腎機能正常かつ、正常アルブミン尿の患者42例をResistors群、JKS参加時にChronic Kidney Disease (CKD) ステージ1または2であったが、その後7～20年の経過観察中に、腎機能低下率3.3ml/min/年以上でESRDになった38例をRapid Progressors (RP) 群、7～30年の経過で腎機能正常かつ正常アルブミン尿であった患者40例をNormoalbuminurics (NA) 群とし、JKS参加時(ベースライン)の血漿を用いて検討した(表1)。

解析の手順としては、1) 群ごとで血漿サンプルを混合し、3つの血漿サンプル(pooled Resistors, pooled RP, pooled NA)を作成。2) それぞれのサンプルからmiRNAを抽出。3) 逆転写およびPreAmplificationを施行。4) 現在知られている1,066種類のmiRNAを網羅的に解析(miRNome解析)。Normalizationとしては、発現していたすべてのmiRNAのCt値の平均値を用いるGlobal Mean Normalization法および、 $\Delta\Delta$ Ct法を使用した。5) 3群に共通して発現していたmiRNAのうち、さらにRP群とNA群に共通して発現するmiRNAを選択。6) 5) で選択したmiRNAのうち、Resistors群で発現が上昇(Fold changes > 2.0)、または低下している(Fold changes < 0.5) miRNAを選択。6) 標的遺伝子予測をDIANA TOOL (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools>)を用いて施行した。

(結果)

1,066種類のmiRNAのうち、282種類がResistors群、NA群およびRP群のすべてに共通して発現していた(図1)。この中で、NA群とRP群で発現に差がない($0.8 < \text{Fold Changes} < 1.25$) 71種類のmiRNAを選択し、Resistors群と他2群とで比較したところ、21種類のmiRNAがResistors群において高または低発現($\text{Fold Changes} > 2.0$ または < 0.5)であった(表2)。またNA群とRP群で発現に差があった211種類のmiRNAのうち、Resistors $>$ NA $>$ RP ($\text{Fold Changes} > 2.0$) の条件を満たすmiRNAは2つあった(表3)。これら23種類のmiRNAが標的とする遺伝子についてパスウェイ解析を行ったところ、8つのmiRNAがTGF- β 経路に参与する遺伝子をターゲットとしていた(表4)。

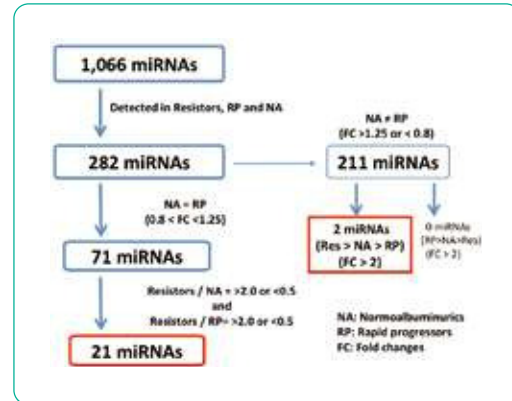


図1：候補のmiRNA選択フローチャート

	Resistors (n=42)	Normoalbuminurics (n=40)	Rapid Progressors (n=32)
男/女	18/24	14/26	17/21
年齢(歳)	60.7 ± 5.7	31.8 ± 10.4	35.1 ± 7.8
罹病期間(年)	45[42-52]	18.5[11-24.5]	19.5[15-29]
ACR ^a (μg/mg)	7.05[4.6-10.6]	12.4[10.5-15.2]	104[38.5-2015.4]
HbA1c(%)	7.95[7.5-8.6]	8.5[8.0-9.2]	9.9[9.1-11]
eGFR _{Cre} (ml/min/1.73m ²)	81.2[70.1-93.1]	116.5[104.5-126.4]	100.3[79-115.3]
Rate of eGFR loss (ml/min/1.73m ² /yr)	-	-	-14.5[-22.2 to -12.4] ^a

^aACR: Albumin Creatinine Ratio
^beGFR: 推算糸球体濾過量

表1：患者背景

miRNA	Fold changes (Resistors/ NA)	Fold changes (Resistors/RP)
miR-93-3p	4.58	4.14
miR-103a-3p	4.49	4.66
miR-590-5p	3.78	3.07
miR-335-3p	3.31	2.91
miR-338-3p	3.18	3.30
miR-27a-3p	3.01	2.48
miR-142-3p	3.00	2.71
miR-29b-1-5p	2.78	2.51
miR-4301	2.65	2.66
miR-324-3p	2.60	2.77
miR-744-5p	2.57	2.17
miR-128-3p	2.45	2.49
miR-191-3p	2.43	2.53
miR-532-5p	2.39	2.45
miR-345-5p	2.37	2.17
miR-652-3p	2.26	2.39
miR-941	2.21	2.02
miR-127-3p	2.19	2.10
miR-548q	2.02	2.22
miR-637	0.37	0.46
miR-489-3p	0.37	0.43

表2：Resistors群で高または低発現していたmiRNA (Resistors $>$ NA = RP または Resistors $<$ NA = RP)

miRNA	Fold changes (Resistors/ NA)	Fold changes (Resistors/RP)
miR-145-5p	4.12	6.39
miR-199a-5p	3.56	8.57

表3：Resistors群で高発現していた2つのmiRNA (Resistors > NA > RP)

miRNA	Resistorsにおける発現	標的遺伝子(TGF-β経路に関連する)
miR-93-3p	↑	SMAD3, ACVR2A
miR-335-3p	↑	FST, THBS1, THBS2, SMURF2, BMP5, ROCK2, CUL1, INHBA, ID4, DCN, RBL1, SMAD5, ACVR2A, GDF6, BMP2, IFNG, LTBP1, SMAD7, BMP7, CREBBP, BMPR2, RPS6KB1
miR-128	↑	TGFR1, SMAD9, ROCK2, CHRD, ACVR2A, SP1, PPP2R1B, BMPR2, RPS6KB1
miR-27a-3p	↑	SMAD9, SMAD4, SMAD5, ACVR2A, GDF6, BMPR1A, IFNG, BMPR2, RPS6KB1, ID4, SP1
miR-145-5p	↑	SMAD3, SMAD5, SKP1
miR-103a-3p	↑	SMAD7, ACVR28, RPS6KB1
miR-324-3p	↑	CREBBP
miR-590-5p	↑	TGFR2

DIANATOOL (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/>)

表4：Resistors群に高発現していたmiRNAとその標的遺伝子

まとめ

今回我々は、正常アルブミン尿でかつ40年以上腎機能異常を呈していない患者(Resistors)の血漿中において、高または低発現する23種類のmiRNAを同定した。これらのmiRNAは糖尿病性腎症における腎保護因子もしくはESRD促進因子のバイオマーカーの候補になるだけでなく、治療のターゲットになる可能性が示唆される。

引用文献

1. Parving HH MM, Fioretto P, Rossing P, Ritz E. Diabetic Nephropathy. 9th ed. Philadelphia: Elsevier; 2012.
2. Ziyadeh FN. Mediators of diabetic renal disease: The case for $\text{tgf-}\beta$ as the major mediator. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004; 15(Suppl.1): S55–7.
3. Krolewski M, Eggers PW, Warram JH. Magnitude of end-stage renal disease in IDDM: a 35 year follow-up study. *Kidney international* 1996;50:2041-6.
4. Ficociello LH, Rosolowsky ET, Niewczas MA, et al. High-normal serum uric acid increases risk of early progressive renal function loss in type 1 diabetes: results of a 6-year follow-up. *Diabetes care* 2010;33:1337-43.
5. Perkins BA, Ficociello LH, Silva KH, Finkelstein DM, Warram JH, Krolewski AS. Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes. *The New England journal of medicine* 2003;348:2285-93.
6. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2011;39(Database issue):D152-7.
7. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 2010;11(9):597-610.
8. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:10513-10518.
9. Fasanaro P, Greco S, Ivan M, Capogrossi MC, Martelli F. MicroRNA: emerging therapeutic targets in acute ischemic diseases. *Pharmacol Ther* 2010;125:92–104.
10. Seto AG. The road toward microRNA therapeutics. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:1298–305.
11. Montgomery RL, van Rooij E. Therapeutic advances in microRNA targeting. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010.
12. Pezzolesi MG, Satake E, McDonnell KP, Major M, Smiles AM, Krolewski AS. Circulating $\text{TGF-}\beta$ 1-regulated miRNAs and the risk of rapid progression to ESRD in type 1 diabetes. *Diabetes* 64:3285-93, 2015.

発表業績一覧

論文

Pezzolesi MG, **Satake E**, McDonnell KP, Major M, Smiles AM, Krolewski AS. Circulation TGF- β 1-regulated miRNAs and the risk of rapid progression to ESRD in type 1 diabetes. Diabetes 64:3285-93, 2015.

学会発表

1. **Eiichiro Satake**, Stephanie Croall, Adam M. Smiles, Andrzej S. Krolewski, Marcus G. Pezzolesi. CIRCULATING PLASMA MICRORNA PROFILING ASSOCIATED WITH PROTEINURIA AND IMPAIRED KIDNEY FUNCTION IN TYPE 1 DIABETIC PATIENTS WITH NEPHROPATHY. National Kidney Foundation 2016 Spring Clinical Meetings. 27 Apr – 1 May 2016, Boston, MA, USA (submitted)
2. **Eiichiro Satake**, Stephanie Croall, Adam M. Smiles, Andrzej S. Krolewski, Marcus G. Pezzolesi. Circulating microRNA profiling in patients protected against diabetic nephropathy despite more than 40 years duration type 1 diabetes. The Endocrine Society's 98th Annual Meeting. 1-4 Apr 2016, Boston, MA, USA (submitted)
3. **Eiichiro Satake**, Marcus G. Pezzolesi, Stephanie Croall, Kevin P. McDonnell, Adam M. Smiles, Andrzej S. Krolewski. miRNome expression profiling in plasma from resistors protected against diabetic nephropathy despite more than 40 years duration of type 1 diabetes. The American Diabetes Association's 75th Scientific Sessions. 5-9 June 2015, Boston, MA, USA
4. **Eiichiro Satake**, Stephanie Croall, Kevin P. McDonnell, Adam M. Smiles, Andrzej S. Krolewski, Marcus G. Pezzolesi. MicroRNA profiling associated with protection against diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients with more than 40 years duration. The 28th European Diabetic Nephropathy Study Group Meeting. 22-23 May 2015, Copenhagen, Denmark
5. **Eiichiro Satake**, Marcus G. Pezzolesi, Kevin P. McDonnell, Adam M. Smiles, Andrzej S. Krolewski. miRNome expression profiling in plasma from type 1 diabetic patients with impaired renal function and an increased risk of rapid progression to end-stage renal disease. Annual Meeting of American Society of Nephrology (Kidney Week). 13-16 Nov 2014, Philadelphia, USA
6. Marcus G. Pezzolesi, **Eiichiro Satake**, Kevin P. McDonnell, Adam M. Smiles, Andrzej S. Krolewski. miRNome Expression Profiling Identifies Circulating Micro RNAs that are Differentially Expressed in Type 1 Diabetic Patients at High Risk of Renal Function Decline and Progression to ESRD. The 27th European Diabetic Nephropathy Study Group Meeting. 16-17 May 2014, London, UK

特許出願 なし