

公益財団法人 寺岡記念育英会

2018 年度 海外留学滞在費助成事業 研究活動報告書一覧

糖尿病腎症のミトコンドリア制御機能の解明～Drp1 の活性化に注目して

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科

腎・免疫・内分泌代謝内科学 客室研究員 三瀬広記

・・・ 1

microRNA-29 による軟骨変性機序の解明

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 整形外科 客室研究員 堀田昌宏

・・・ 3

※対象者の所属・職位は、本助成事業への応募当時のものです。

(表題) 糖尿病腎症のミトコンドリア制御機能の解明~Drp1の活性化に注目して

(所属) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学

(氏名) 三瀬 広記

(概要)

1. 渡航先

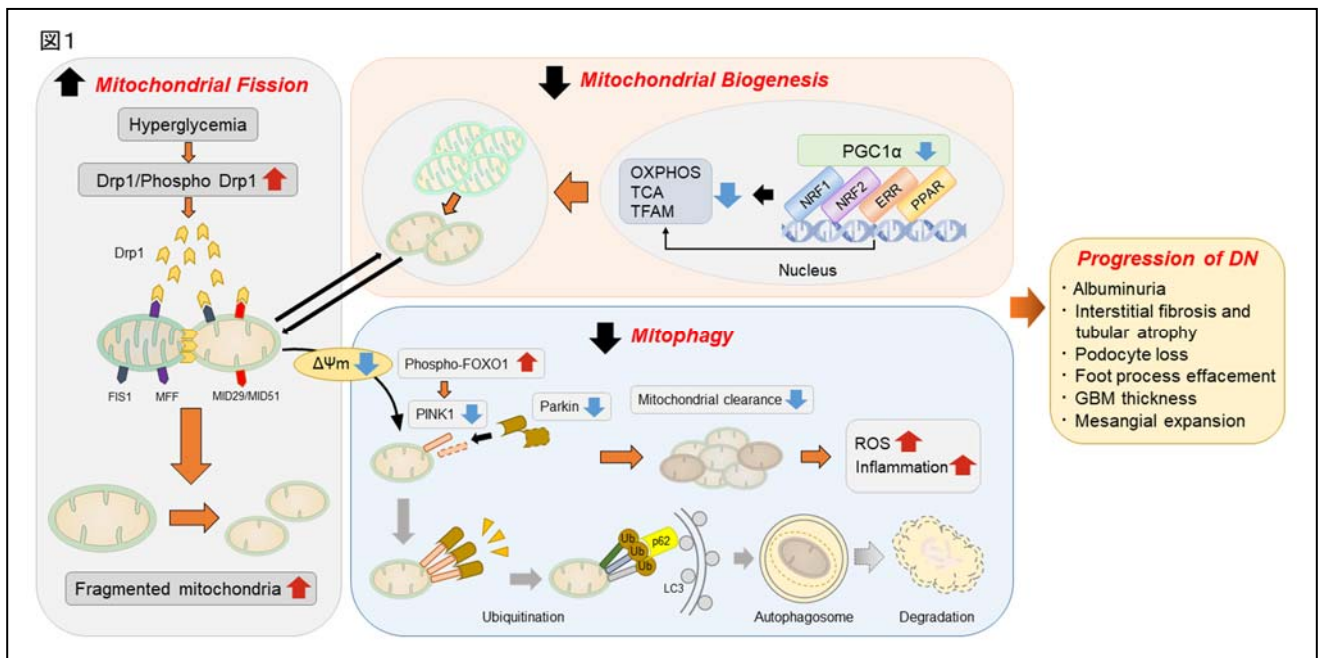
The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Section of Nephrology

2. 日程

2019年6月11日渡航、同月25日より研究開始。2020年9月現在研究継続中。

3. 研究及びその成果の概要

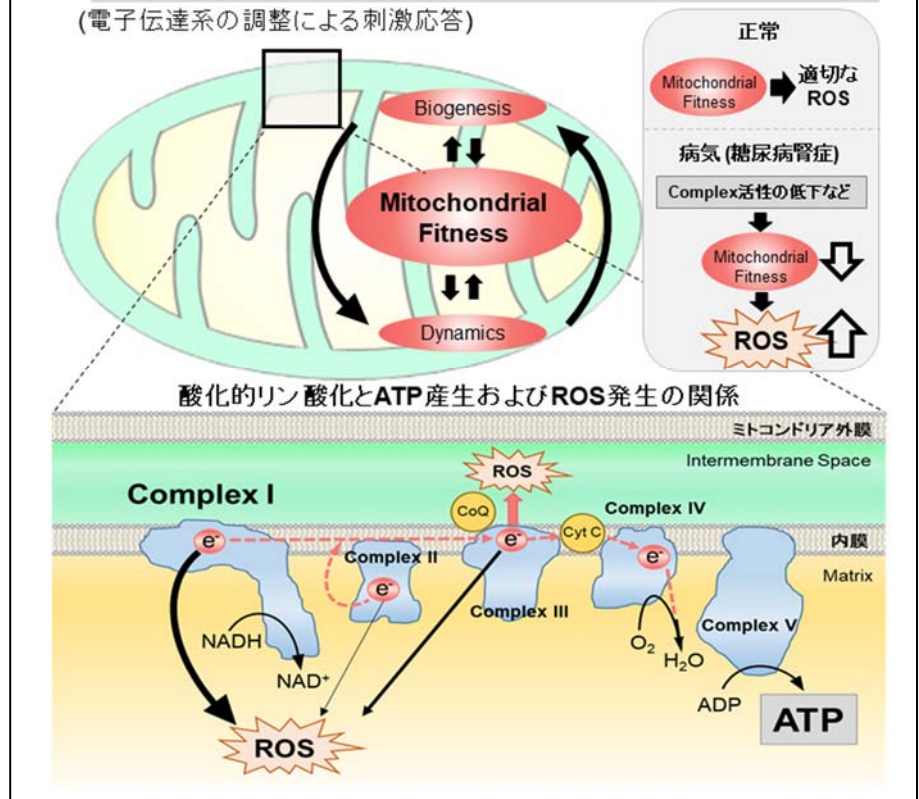
所属するラボではこれまで、糖尿病状態においてポドサイトのミトコンドリアダイナミクス・バイオジェネシス制御が糖尿病腎症進展における重要なメカニズムであることを報告してきた(*Cell Metab* 15:186-200, 2012, *J Clin Invest* 126:4205-18, 2016, *J Clin Invest* 129:2807-23, 2019)。留学後の1年で、当ラボにおけるこれまでの糖尿病腎症におけるミトコンドリア制御に関するエビデンスを review article としてまとめ、Drp1にミトコンドリアダイナミクスにおける重要性やバイオジェネシス、マイトファジー制御がどのようにして糖尿病腎症進展に寄与するかを示した(Mise K, et al, *Kidney* 360 in press, 図1)。



また、高血糖を含めた様々な刺激に対して、ミトコンドリアがエネルギーを産生するために電子伝達系を調整する反応をミトコンドリアフィットネス(図2)と名付け、このプロセスの重要性を様々な形で示した(Mise K, et al, *Kidney* 360 in press)。ミトコンドリアフィットネスに密接にかかわるミトコンドリアの主たる仕事は、酸化的リン酸化でありこれを担う5つの呼吸鎖のうちComplex IはATP産生に関わるのみならず、活性酸素種(ROS)の発生に最も寄与する部位として重要である(図2)。また過剰なROSは、DNA損傷や蛋白修飾変化を介しミトコンドリアフィットネス破

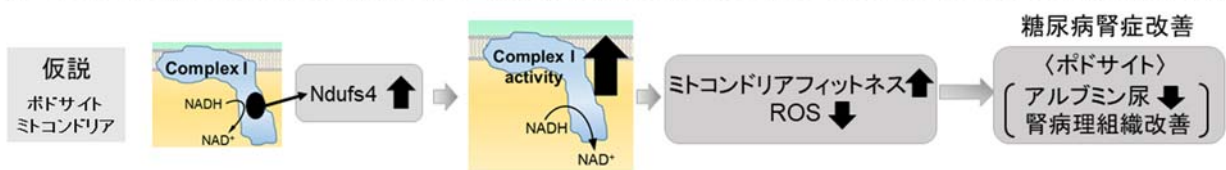
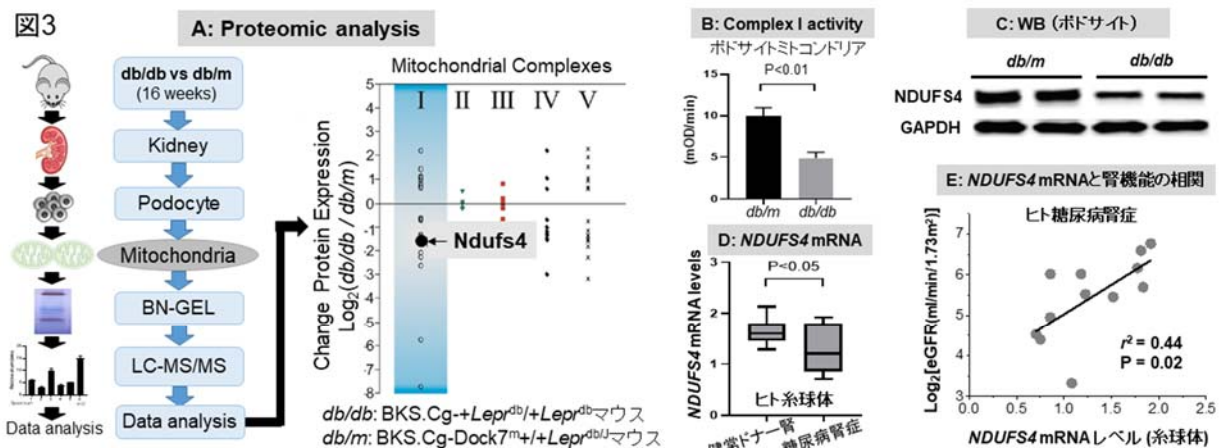
綻の悪循環に寄与するため、腎症進展における重要な因子と考えられており、糖尿病腎症の腎組織中のミトコンドリアにおける Complex I 活性低下と ROS の産生亢進が多数報告されている。一方、Complex I を構成する 45 種類のサブユニットの中のいくつかは Complex I の活性維持に寄与していることが報告されている(*Cell Metab* 7:312-320, 2008)。予備実験において、2 型糖尿病モデル (db/db) マウスではポドサイトのミトコンドリアにおける Complex I の活性および、Complex I サブユニット Ndufs4 の蛋白発現が有意に低下していた(図3A-C)。更に、ヒト糖尿病腎症の糸球体での *NDUFS4* 発現低下や、腎機能と

図2 ミトコンドリアフィットネスは糖尿病腎症進展における重要なプロセス (電子伝達系の調整による刺激応答)



NDUFS4 発現量との強い関連が確認できた(図3D, E)。これらの結果に基づき、ポドサイトにおけるミトコンドリア呼吸鎖 Complex I のサブユニット Ndufs4 が Complex I の活性維持とそれに引き続くミトコンドリアフィットネスや ROS の制御を介して糖尿病腎症進展に保護的に働く、という仮説を検証することを目的に研究を継続している。

図3



microRNA-29 による軟骨変性機序の解明

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 整形外科学

堀田 昌宏

(概要)

1. 渡航先

エディンバラ大学ロスリン研究所

2. 日程

2019/7/01-2020/9/30

3. 研究及びその成果の概要

研究開始当初の背景

変形性関節症 (OA) は高齢者の膝や股関節等に好発し、加齢や慢性的な力学的ストレスを背景として整形外科領域で最も頻度の高い骨・関節疾患である。関節の軟骨破壊は激しい疼痛やQOLの低下の原因となる。近年、microRNA-29 (miR-29) はOA軟骨変性を促進することが報告されており、OAに対する新たな治療標的として注目されている。本研究では、腎細胞や乳癌においてmiR-29の標的遺伝子とされ、OAの疾患感受性遺伝子の一つとして挙げられているADAM (a disintegrin and metalloprotease) 12に着目した。ヒトにおいてADAM12は選択的なスプライシングによって膜貫通型ドメインを有するADAM12-Lと、膜貫通型ドメインが欠落した分泌型のADAM12-Sが生じる。OAの関節軟骨組織でADAM12-Lが高発現し、軟骨細胞の増殖に関わることから、関節軟骨再生に何らかの役割を果たす可能性が示唆されている。ADAM12-Sは軟骨細胞の増殖と成熟を制御し、骨成長を促進することが報告されている。マウスに発現しているADAM12はヒトにおけるADAM12-Lと類似している。マウスを用いたin vitroおよびin vivoでのmiR-29とADAM12の軟骨変性への関与の研究はいまだ報告がなく、ADAM12ならびにその上流シグナルであるmiR-29の軟骨変性への関与について解明することによりOAに対する新規治療法の開発につながることを期待される。

研究の目的

本研究では、関節軟骨変性におけるmiR-29とADAM12の関与について、ATDC5細胞やマウスおよびヒト軟骨細胞を用いて明らかにすることを目的とした。

研究の方法

6 well plateに 6.4×10^4 cells/wellのATDC5細胞を播種し、70-80% confluenceとなった後、1% ITS (インスリン-トランスフェリン-亜セレン酸ナトリウム) を添加し軟骨分化させ、X型コラーゲンを肥大化期のマーカー遺伝子とし、*Adam12*や*Col10a1*などの発現時期をreal-time PCRにより解析した。*Adam12*-knockout (KO) ATDC5細胞樹立のために、CRISPR/Cas9 systemを用いsingle guide RNA expression vectors : target site of ADAM12 (5' -GCATCATGAACCCGTCACG-3' and 5' -TATTCTGACATCGACGATTG-3')とCas9プラスミドでDNAを切断し、それらの細胞集団からFACS Aria II cell sorterを用いてホモ切断の細胞だけを抽出した。ホモKO細胞はPCRを行い、シーケンスで確認した。ADAM12の機能解析を行うために、*Adam12*-KO ATDC5細胞に1% ITSを添加し軟骨分化させ、*Runx2*や*Col10a1*の発現について、またそれぞれの蛋白の発現についてwild typeと比較

検討した。

C57BL/6 マウス (5-6 日齢) の大腿骨頭と膝関節から軟骨組織を採取し (図 1)、コラゲナーゼ処理を加え、軟骨細胞を分離し培養を行った。Passage0 から 2 における *Sox9* や *Col2a1*、*Acan*、*Col1a1* の発現またコラーゲン蛋白の発現を解析し、それぞれの passage におけるマウス軟骨細胞の phenotype の確認を行った。次に、マウス軟骨細胞に対して IL-1 β や IL-4、TGF- β (それぞれ 10ng/ml) による刺激後 1, 6, 24, 48 時間でそれぞれ miR-29b や *Adam12* の発現についてコントロールと比較検討した。さらに、マウス軟骨細胞に miR-29b mimic や inhibitor を transfection し、刺激後 24, 48, 72 時間の時点で、*Adam12* や軟骨基質 (*Col2a1* や *Acan*)、軟骨基質分解酵素 (*Mmp* や *Adamts*)、さらに軟骨細胞肥大化のマーカーである *Runx2* や *Alp*、*Col10a1* の発現についてコントロールと比較検討した。

研究の成果

ATDC5 細胞に ITS を添加した軟骨細胞分化過程において、*Adam12* の発現がピークに達した後に *Col10a1* の発現の亢進を認めた。*Adam12*-KO ATDC5 細胞では wild type と比較し分化誘導後に *Runx2* や *Col10a1* の発現が亢進した。さらに、*Adam12*-KO ATDC5 細胞において、wild type と比較し、分化誘導後 *Runx2* や X 型コラーゲンの蛋白の発現が亢進した。本結果より、ADAM12 は RUNX2 や X 型コラーゲンの発現を制御することで、軟骨細胞の分化過程において重要な働きをしていることが示唆された。軟骨細胞の肥大化の制御は OA の治療ターゲットとして重要とされ、ADAM12 は OA の病態に大きく関わっている可能性がある。

マウスの軟骨細胞は passage0 および passage1 において、*Col2a1* や *Acan* の mRNA および蛋白の発現が保持されていたため、passage1 の軟骨細胞を用いて研究を進めた。また、passage0 から 2 に継代が進むにつれて、*Sox9* や *Col2a1*、*Acan* の発現が低下し、一方、*Col1a1* や miR-29b の発現が亢進した (図 2, 3)。

培養軟骨細胞は、継代を重ねることで軟骨細胞としての形質が失われ、脱分化することが知られている。継代を重ねるにつれ *Sox9* や *Col2a1* の発現が低下し、一方で miR-29b の発現が亢進したことから、miR-29b は軟骨の脱分化過程に

関与していることが示唆された。マウス軟骨細胞に対する IL-1 β や IL-4 刺激後 48 時間の各時点において、コントロール群とサイトカイン刺激群で miR-29b の発現に有意差を認めなかったが、TGF- β 刺激後 1, 6, 24 時間で miR-29b の発現が低下した。また、ATDC5 細胞を用いた IL-1 β や IL-4、TGF- β 刺激実験においても同様の結果が得られた。マウス軟骨細胞において、miR-29b の過剰発現刺激 72 時間後まで miR-29b の過剰発現が維持されていることを確認した。miR-29b の過剰発現刺激 72 時間後、コントロールと比較し *Runx2* や *Mmp13*、*Col10a1* の発現が亢進し、一方、miR-29b の作用を阻害することによりこれらの遺伝子の発現が抑制された。また、miR-29b の過剰発現により *Adam12* や *Col2a1* の発現が抑制された。さらに、ヒト正常軟骨細胞においても miR-29b の過剰発現刺激によりコントロールと比較し、*ADAM12-L* の発現が抑制された。これらの結果より、miR-29b は標的遺伝子である ADAM12 の発現を抑制する一方で、RUNX2 や MMP13、X 型コラーゲンの発現を亢進させることで、軟骨変性に関与していることが示唆された。microRNA は標的遺伝子を制御することで人体に様々な影響をもたらすため、miR-29 の ADAM12 を介した軟骨変性への関与の研究は、OA の病態把握の一助となる可能性がある。今後は、*Adam12* KO マウスや miR-29 KO マウスに対して OA モデルを作成し、ADAM12 や miR-29 の OA への関与について解析を進めていく予定である。

図1 マウスから採取した軟骨組織

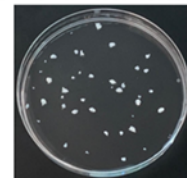
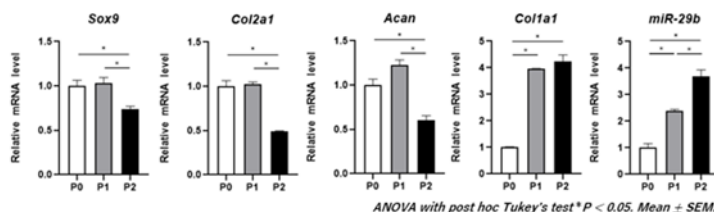


図2 マウス軟骨細胞のpassage0-2における遺伝子の発現変動



ANOVA with post hoc Tukey's test * $P < 0.05$. Mean \pm SEM.

図3 マウス軟骨細胞のpassage0-2における type II collagen蛋白の発現変動

