

慢性腎臓病における microRNA のバイオマーカー、病態としての役割

萬代新太郎

東京医科歯科大学病院血液浄化療法部

key words：慢性腎臓病，血管石灰化，マイクロ RNA，循環細胞外小胞

要 旨

慢性腎臓病（chronic kidney disease; CKD）によって血管石灰化が促進する分子メカニズムは十分解明されていない。本研究は，血液中の循環細胞外小胞（small extracellular vesicles; sEV）のバイオマーカー・治療標的としての役割を明らかにすることを目的とした。ラット血管平滑筋細胞 A10 細胞において，CKD モデルラット血清を負荷すると，石灰化の増加と osterix (Sp7)，osteocalcin (Bglap)，osteopontin (Spp1) の mRNA 発現量の増加を認めた。さらに CKD 血清の sEV 分画が石灰化を促進した。CKD 由来の sEV を用いて microRNA (miRNA) のトランスクリプトーム解析を行うと，miR-16-5p，miR-17-5p，miR-20a-5p，miR-106b-5p の発現量が低下していた。CKD 患者では，腎機能が低下するにつれて，これらが循環 sEV に枯渇し，腹部大動脈の石灰化スコア増加とも関連した。in silico 解析で四つの miRNA の共通標的分子血管内皮増殖因子 A (VEGFA) を同定し，VEGFA が血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR2) を介し転写因子 RUNX2 のリン酸化によって骨形成遺伝子群の転写を増加させるということが分かった。以上から CKD によって品質の変化した循環 sEV が血管石灰化を引き起こすこと，鍵分子シグナルが治療標的たりうることが明らかになった。

1 目 的

慢性腎臓病（chronic kidney disease; CKD）は，日

本人の約 1,300 万人，世界人口の 7 億人以上が罹患するコモンディゼーズである¹⁾。CKD によって溶質，水の濾過排泄機能が失われ，やがて透析に依存するのみならず，認知症や心血管病，サルコペニアなど全身の臓器の機能，ひいては QOL や寿命が低下する。特に，透析患者の 30～50% が心血管病で死亡するものの，分子機序解明は十分ではない。

血管中膜の異所性石灰化は心血管病の発症に重要な役割をはたす。しかしながら，CKD が血管平滑筋の表現型を変化させ，石灰化に結び付くに至る腎・血管の相互作用は未解明な点が多く，既存の降圧薬，抗血栓薬，CKD に伴う骨・ミネラル代謝異常（CKD-MBD）の治療薬によっても石灰化の是正は不十分であるため，新たな病態理解と治療開発が望まれている²⁾。

本研究はこれまで未解明の，血液中の循環細胞外小胞（small extracellular vesicles; sEV）^{3,4)}の血管石灰化（vascular calcification; VC）におけるバイオマーカー，治療標的としての役割を明らかにすることを目的とした。

2 方 法

0.75% アデニンを含有する食餌によって薬剤誘導性の CKD モデルラットを作製し，血清と血清中の sEV 分画を抽出した。大動脈平滑筋培養細胞（vascular smooth muscle cells; VSMCs）A10 細胞を高リン（P）メEDIUM で培養した後，アリザリンレッド染色によってリン酸カルシウム塩の形成と骨形成遺伝子を評価し，CKD 由来の血清，sEV の影響を解析した⁵⁾。CKD

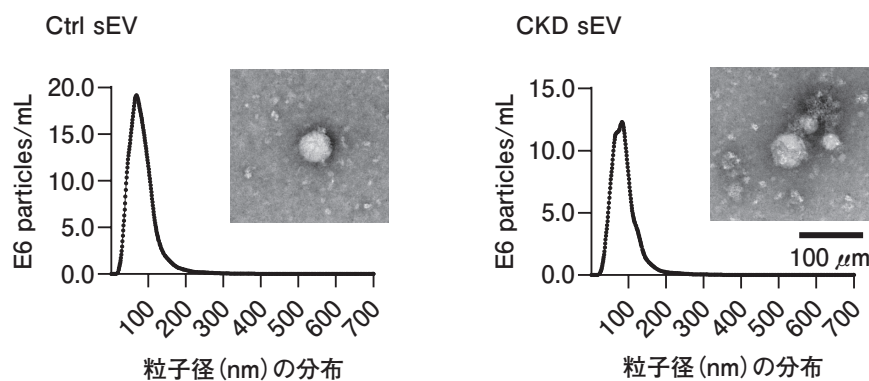
モデルラットの血清 sEV を用い miRNA トランスクリプトーム解析を行い, CKD によって発現量が変化する miRNA を探索した. CKD によって発現量が低下し, 定量 PCR でも確証が得られた miRNA 群に着目した. miRNA の模倣体を A10 細胞内に導入した際に, VC に影響を与えるか検証した. in silico 解析によって, 四つの miRNA の共通標的遺伝子を探索した. 石灰化を誘導したマウスや A10 細胞で, miRNA の標的遺伝子 VEGFA の発現量の変化を検証した. VEGFR1/2 阻害剤, siRNA を用いて, VSMC における石灰化結節, 骨形成遺伝子の変化を評価した. CKD 患者の血清 sEV と腎機能の関連, 腹部単純 CT 検査で算出した大動脈

石灰化指数 (ACI) と miRNA 発現量の相関関係を解析した.

3 結果

CKD モデルラット由来の血清が大動脈血管平滑筋細胞 A10 細胞における骨形成遺伝子群の転写, 石灰化 (リン酸カルシウムの蓄積) を増加させた. 血清を sEV 分画 (図 1 上) と sEV 除去血清に分けて石灰化アッセイ系を行ったところ, CKD 由来の sEV 分画が血管石灰化を促進することが分かった (図 1 下). CKD 由来血液の sEV が血管平滑筋細胞の形質転換, 大動脈の石灰化を促進することが示唆された.

【Ctrl・慢性腎臓病モデル動物の血清中の sEV】



【sEV の血管平滑筋細胞形質転換, 石灰化への影響 (アリザリンレッド染色)】

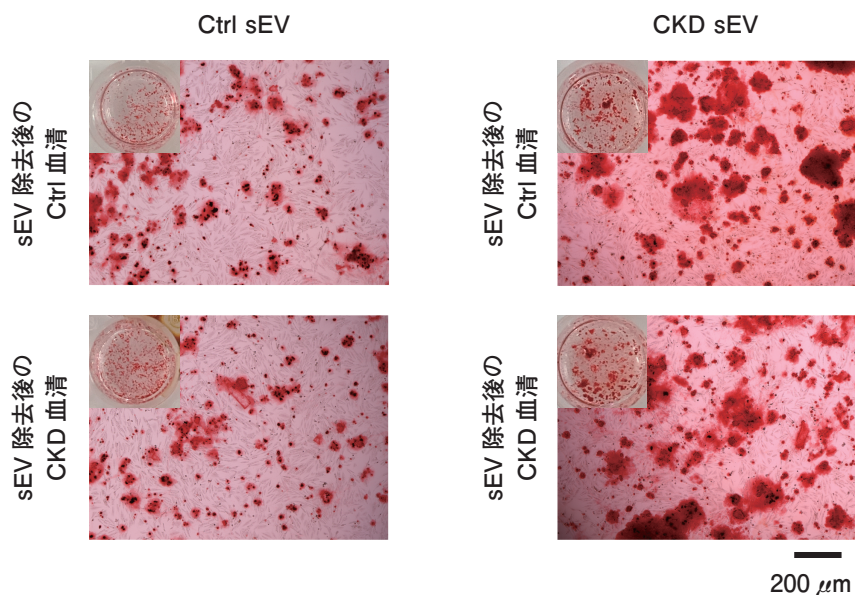


図 1 慢性腎臓病由来の血液中の細胞外小胞 (small extracellular vesicles; sEV) が大動脈血管平滑筋細胞の形質転換, 石灰化を促進する

コントロール (Ctrl), 慢性腎臓病 (CKD) モデルラットの血清 sEV の解析 (上段). アリザリンレッド染色による sEV の血管平滑筋細胞の石灰化への影響 (下段).

(出典: Circ Res 2023; 132(4): 415-431 より引用改変)

CKD モデルラット由来の血液中の sEV を用いて miRNA のトランスクリプトーム解析を行った。低下する複数の miRNA の中から、定量 PCR でも sEV 中

の発現量の低下が確認された 4 種類 miR-16-5p, miR-17~92 クラスター由来の miR-17-5p/miR-20a-5p, miR-106b-5p に着目した。これらの miRNA は CKD 患者に

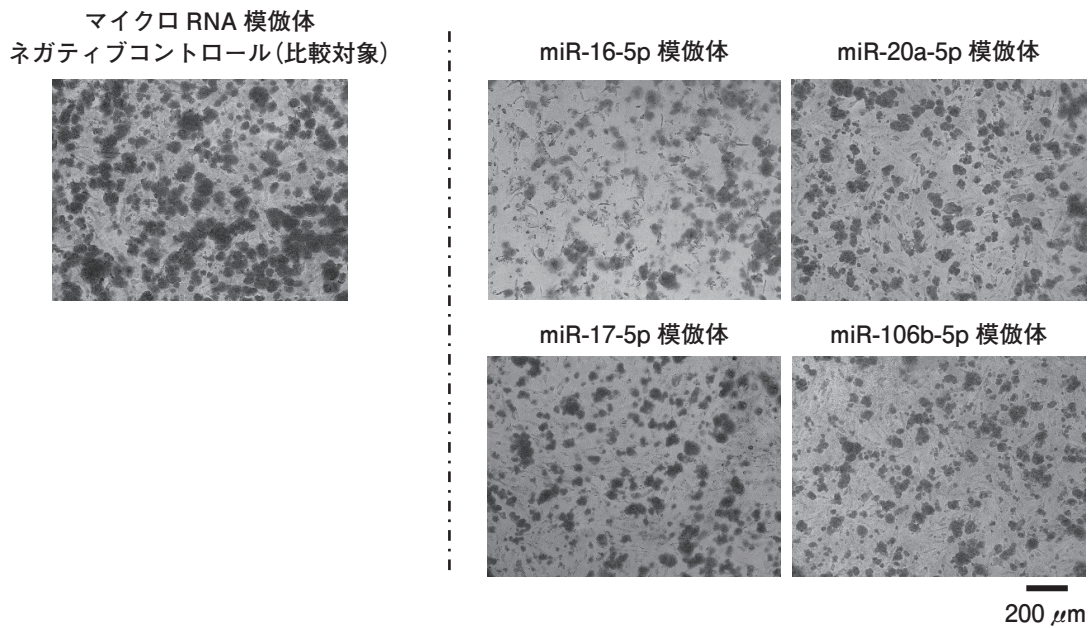


図 2 マイクロ RNA 模倣体の大動脈血管平滑筋細胞の石灰化への影響

miR-16-5p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-106b-5p 模倣体は血管平滑筋細胞の石灰化を抑制した。

(出典：Circ Res 2023; 132(4) : 415-431 より引用改変)

【マイクロ RNA の標的分子群の in silico 解析】【VEGFA-VEGFR2 シグナル阻害薬の石灰化抑制効果(アリザリンレッド染色)】

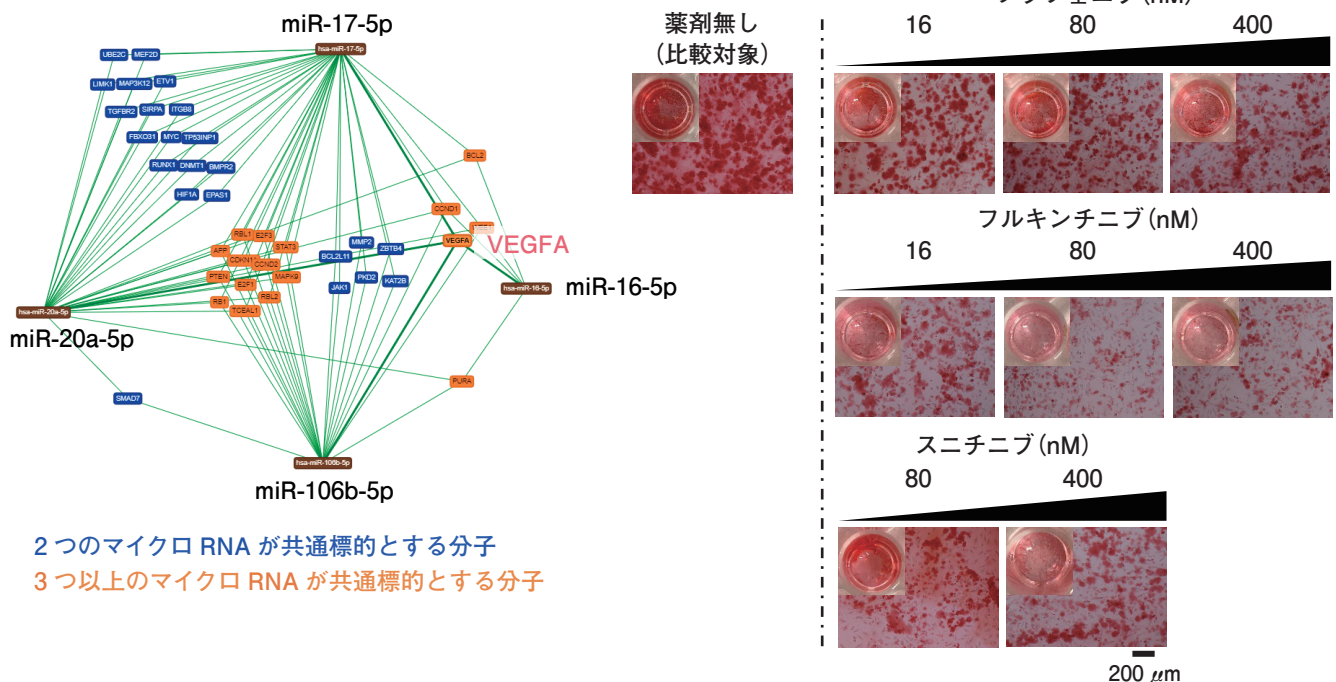


図 3 マイクロ RNA の標的分子シグナルと阻害薬の石灰化への影響

マイクロ RNA の標的分子の in silico 解析 (左)。アリザリンレッド染色による VEGFR1/2 阻害剤ソラフェニブ、フルキンチニブおよびスニチニブの石灰化への影響の検証 (右)。

(出典：Circ Res 2023; 132(4) : 415-431 より引用改変)

においても、腎機能が低下するにつれて循環 sEV に枯渇することが明らかになった。

4 種類の miRNA 模倣体を用いて VSMCs の *in vitro* アッセイ系で VC への影響を検証したところ、コントロールと比べていずれの miRNA 模倣体も石灰化を抑制した (図 2)。

miRNA の配列情報とデータベースに基づいた *in silico* 解析を行い、四つの miRNA の共通標的分子として VEGFA を同定した (図 3 左)。CKD モデルラットの胸部大動脈における VEGFA タンパク発現量は増加していた。ヒト VEGFA の組換えタンパク質を A10 細胞に投与すると、用量依存的に骨形成遺伝子群の発現増加、リン酸カルシウムの沈着が増加した。VEGFA がその受容体 VEGFR2 を介して転写因子 RUNX2 のリン酸化を増加させ、骨形成遺伝子群の転写を増加させるというシグナル伝達経路も明らかになった。

VEGFR1/2 阻害剤ソラフェニブ、フルキンチニブおよびスニチニブを A10 細胞に投与すると、A10 細胞の石灰化が抑制された (図 3 右)。最も効果の高かったフルキンチニブを CKD・血管石灰化モデルマウスに 4 週間経口投与すると、大動脈の骨形成遺伝子群の発現が抑制されることが分かった。

CKD 患者の腹部大動脈の石灰化 ($ACI^{\circ} \geq 15\%$) の診断精度について受信者動作特性曲線 (ROC 曲線) による検証を行うと、hsa-miR-16-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-20a-5p および hsa-miR-106b-5p 各々の sEV 発現レベルの曲線下面積 AUC (area under the curve) は、0.7630, 0.7704, 0.7407 および 0.7704 であった。多変量ロジスティック回帰分析を行うと、最も影響力の大きかった hsa-miR-106b-5p の miRNA の 1 四分位低下は ACI の 8.32% の上昇に関連しており、14.8 歳の老化に匹敵する石灰化への影響度であった。

4 考 察

本研究は、CKD げっ歯類モデルおよび CKD 患者の血液中 sEV における miRNA プロファイルを明らかにした。健康状態で sEV に豊富に含まれる miR-16-5p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-106b-5p が、血管平滑筋細胞の VEGFA-VEGFR2 シグナルを抑制することで血管が病的石灰化から免れる機構が存在するが、CKD によってこれらの miRNA 群が枯渇した sEV が、血管平滑筋の形質転換、石灰化を促進する可能性が示され

た。

以前、血液透析患者の血清が、非透析患者と比較して VSMC の石灰化を促進することが報告されていたが、生物学的メカニズムと鍵分子群は特定されていなかった。今回、CKD 由来の sEV が VSMCs, 大動脈における石灰化を促進しており、sEV が VC の病態生理に重要であることを明らかにした。sEV が miRNA を中心に分子群と分子シグナルを細胞間伝播しており、特に癌の存在診断に関わる研究が盛んに行われている⁷⁾。しかしながら、CKD や CKD による VC に関わる miRNA の報告はほとんどない。本研究は CKD 患者における腎機能、大動脈石灰化と関連する sEV 中の複数の miRNA と共通標的分子を複数同定した。

VEGFA は、骨芽細胞の分化と血管新生を促進するため骨形成において重要な役割を担う⁸⁾。VEGFA が CKD 進展の予測因子であることも報告されている。本研究は、癌治療薬ソラフェニブ、フルキンチニブ、スニチニブによる VEGFA-VEGFR2 の阻害によって、VSMC における石灰化を抑制し得ることを見いだした。以上から sEV や VEGFA-VEGFR2 シグナルが CKD による VC の新たな治療戦略になる可能性が示唆された。

結 語

miRNA トランスクリプトーム解析によって、CKD げっ歯類モデルおよび CKD 患者の血液中 sEV における miRNA プロファイルが明らかとなった。特に miR-16-5p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-106b-5p が sEV に枯渇することで、VEGFA-VEGFR2 シグナルが活性化し、血管平滑筋細胞の形質転換、血管石灰化の増悪に関わることが明らかになった。

本研究の成果は令和元年度日本透析医会公募研究助成によるものである。成果の一部は今後英文誌に投稿予定であり、一部は原著論文が下記論文として公表された。二重投稿となることを避け、本報告書ではその概要を総説的に記載した。

Koide T, Mandai S, Kitaoka R, et al. : Circulating Extracellular Vesicle-Propagated microRNA Signature as a Vascular Calcification Factor in Chronic Kidney Disease. *Circ Res.* 2023; 132(4) : 415-431.

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

- 1) GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017 : a systematic analysis for the global burden of disease study 2017. *Lancet* 2018; 392 : 1736–1788. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32203-7.
- 2) Sage AP, Tintut Y, Demer LL : Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Nat Rev Cardiol* 2010; 7 : 528–536. doi: 10.1038/nrcardio.2010.115.
- 3) Kalluri R, LeBleu VS : The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020; 367 : eaau6977. doi: 10.1126/science.aau6977.
- 4) Sahoo S, Adamiak M, Mathiyalagan P, et al. : Therapeutic and diagnostic translation of extracellular vesicles in cardiovascular diseases : roadmap to the clinic. *Circulation* 2021; 143 : 1426–1449. doi: 10.1161/circulationaha.120.049254 Crossref. PubMed.
- 5) Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al. : Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018) : a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 2018; 7 :1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750. eCollection 2018 Crossref. PubMed.
- 6) Tatami Y, Yasuda Y, Suzuki S, et al. : Impact of abdominal aortic calcification on long-term cardiovascular outcomes in patients with chronic kidney disease. *Atherosclerosis* 2015; 243 : 349–355. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.10.016.
- 7) Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. : Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9 : 654–659. doi: 10.1038/ncb1596.
- 8) Hu K, Olsen BR : Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair. *J Clin Invest* 2016; 126 : 509–526. doi: 10.1172/jci82585.