

(small ncRNA) の一種であり、今日では遺伝子の転写後制御にきわめて重要な働きをしていることが明らかとなっている。miR にはタンパク質遺伝子のイントロンとして転写されるものと、独自のプロモータから転写されるものがあり、その後、主に ribonuclease type III (RNase III) family に含まれる 2 種の酵素 Drosha と Dicer の働きによって成熟 miR となる。具体的には、転写直後の primary miR (pri-miR) が、Drosha の作用により 70 スクレオチド程度に切断され、ステム&ループ構造の precursor miR (pre-miR) となる。pre-miR は輸送タンパクによって核外に輸送された後、Dicer によって両端が切断され、一旦、2 本鎖の miR duplex となった後、解離して 1 本鎖 RNA となり、そのうちの一方が RISC (RNA induced silencing complex) に取り込まれ、成熟 miR として機能する。miR はタンパク質をコードする mRNA の 3'UTRs (untranslated regions) に結合し、遺伝子の翻訳を主に抑制的に制御する。miR とターゲット mRNA の結合が完全に一致している場合、mRNA は切断され分解される。一方、miR と mRNA との結合にミスマッチがある場合にも、miR は柔軟性を持ってターゲットに結合し、配列特異的に翻訳を抑制することが明らかとなっている。miR はウイルスから植物、線虫、節足動物、脊椎動物まで幅広い生物種に存在しており、ヒトでは数百の miR が全タンパク質遺伝子の約 50% の制御に関与し、結果的に細胞の増殖や分化、アポトーシスなどほぼ全ての生物学的な過程に miR の関与が示唆されている。腎臓の領域では近年、特に線維化との関連が注目されており、高血圧腎症、糖尿病性腎症、IgA 腎症の病態形成にそれぞれ特定の miR が関与していることがすでに報告されているが、原疾患に依らず共通した病像を呈する末期腎不全への進展の鍵となる尿細管細胞の機能不全と miR の関係については、依然、明らかとなっていない。

そこで本研究では、培養ヒト尿細管細胞 (HK-2) を用いて、酸化ストレスおよび小胞体ストレス、もしくはその双方によって発現が変動する miR を解析し、その機能を解明することを目的に各種実験を行った。

【酸化ストレス、小胞体ストレスによる miR の発現変動】

培養ヒト尿細管細胞 (HK-2) を用いて、低酸素-再酸素化 (0.1% O₂ の低酸素環境下で 16 時間培養の後、3 時間もしくは 10 時間の再酸素化) を行う酸化ストレス群 (Hypoxia-Reoxygenation; HR)、および tunicamycin (2 μg/ml, 24 時間) もしくは thapsigargin (0.5 μg/ml, 24 時間) の前処置を行う小胞体ストレス群 (endoplasmic reticulum stress; ER) で miR microarray 解析を行った。その結果、解析に用いた 799 種のうち、HR 群で再酸素化の時間に関わらず持続的に有意な変動 (統計学的有意差を持って 1.2 倍以上の増加もしくは 0.8 倍以下の減少) を示す miR は 10 種、ER 群でどちらの小胞体ストレス誘導物質によっても有意な変動を示す miR は 8 種であり、この両群に共通する唯一の miR として miR-205 を同定した。miR-205 の発現変動は定量 real-time RT-PCR でも有意な減少の再現性が確認され、さらに、miR-205 の前駆体 pre-miR-205 も同じ挙動を示した。

【尿細管細胞における miR-205 の機能】

miR-205 の発現は、酸化ストレスもしくは小胞体ストレスに曝露された尿細管細胞とともに有意に抑制されていた。そこで、siRNA を用いて miR-205 の発現を抑制した HK-2 を用いて miR-205 のストレスシグナルに対する機能解析を試みたところ、miR-205 発現抑制 HK-2

は細胞増殖が抑制されており、また酸化ストレスおよび小胞体ストレスに対する感受性が亢進し、細胞生存率の低下、細胞内 ROS の増加がみられた。これらの細胞では細胞内レドックスを担う抗酸化酵素 copper/zinc superoxide dismutase (SOD1), manganese superoxide dismutase (SOD2), catalase, hemoxygenase 1 (HO-1) の発現が有意に低下しており、細胞内 ROS 増加の原因と考えられた。さらに、酸化ストレスおよび小胞体ストレスのシグナル伝達関連を中心に miR-205 の標的を検索した結果、miR-205 の発現抑制により hypoxia-inducible factor (HIF) の制御分子 prolyl hydroxylase domain 1 (PHD1) の発現が有意に亢進することを確認した。この PHD1 の発現は、低酸素-再酸素化を行なった HK-2 細胞、および tunicamycin で小胞体ストレスを誘導した HK-2 細胞でも有意に増加していることを確認した。PHD1 は以前の研究によりミトコンドリア呼吸と酸化ストレスの制御に関与することが示されており、また最近になって PHD1 が本来の水酸化酵素としての機能とは別に小胞体ストレスの制御にも関与していることが報告されている。PHD1 の 3'UTR には miR-205 と相補性の高い配列が含まれており、またホタルルシフェラーゼの下流に PHD1-3'UTR を組み込んだベクターを用いたレポーターアッセイでは、miR-205 の発現抑制による PHD1 転写活性の亢進が確認された。これらの結果は、PHD1 が miR-205 によって直接制御される標的遺伝子の一つである可能性を示唆している。

【結論】

酸化ストレスおよび小胞体ストレスによって障害を受けた尿細管細胞において、双方に関連するシグナル伝達系には miR による制御が関与しており、これが細胞の表現型にも影響を与えていると考えられる。miR-205 は PHD1 と抗酸化酵素の発現調節を介して、酸化ストレス及び小胞体ストレスに対する細胞の抵抗性を誘導している可能性が示唆された。酸化ストレスおよび小胞体ストレスは共に、様々な腎疾患の増悪因子となっていることから、腎臓における PHD1 の発現調節、さらには PHD1 以外にも存在する可能性のある他の miR-205 標的タンパクも含めた包括的な制御を目的とした miR-205 そのものの発現調節を行なうことで、多くの腎障害の進行抑制が期待できると考えられる。