

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成31年度

受付番号 201960603

氏名 小林 洋輝

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ボストン （国名： 米国 ）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。
マイクロRNAを用いた糖尿病性腎症の進展機序の解明・新規バイオマーカーの確立
3. 派遣期間：平成 31年 4月 1日 ～ 令和 3年 6月 24日
4. 受入機関名及び部局名
受入機関名：Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School
部局名：Section on Genetics & Epidemiology
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意(A4判相当3ページ以上、英語で記入も可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式10-別紙1~4に記入の上、併せて提出すること。

要旨

糖尿病性腎症における腎機能低下の経過は個々により異なり、微量アルブミン尿を呈して数年で末期腎不全(ESRD)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の低下が異なるメカニズムはほとんど分かっておらず、ESRDの予測因子としてのバイオマーカーも確立していない。ノンコーディングRNAの一つであるマイクロRNA(以下miRNA)は近年、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が糖尿病性腎症におけるプロファイルは確立していない。申請者は最近、Joslin Kidney Study (JKS)に参加している1型および2型糖尿病患者を対象に、血漿中のmiRNAをHTG Edge Sequencingを用いて網羅的に解析し、糖尿病性腎症の進展に関わるリスク因子、及び保護因子となり得る17種類のmiRNA群を同定した(未発表、図)。

本研究では前研究で同定したmiRNA群の解析を進め、腎症の進展に関与し腎機能予後予測バイオマーカーとなり得るmiRNAを同定することを目的とした。

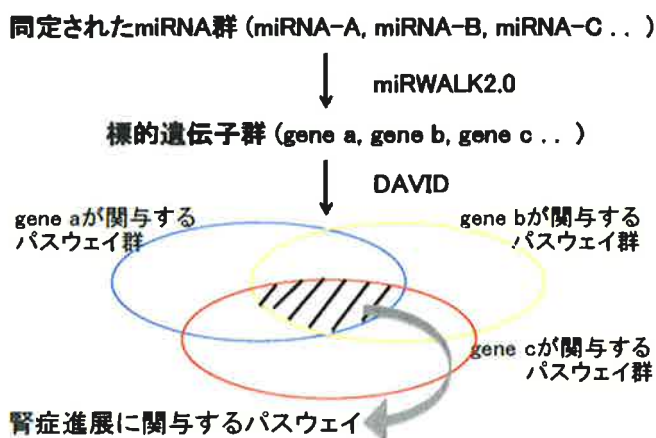
研究1

まず、最初の研究計画として1型、及び2型糖尿病性腎症の慢性腎臓病重症度分類(CKD stage)の異なる患者群別に、腎症の進展速度と血漿中のmiRNAの発現量の関係についてValidationすることを目的に1型糖尿病CKD stage 1,2のコホートを使用してqPCRでmiRNAの測定を行った。その結果、HTG EdgeSeqで同定した17種類のmiRNAについて、糖尿病性腎症の進展との関連を再現できなかった。また、尿中miRNAについても同様に再現できなかった。

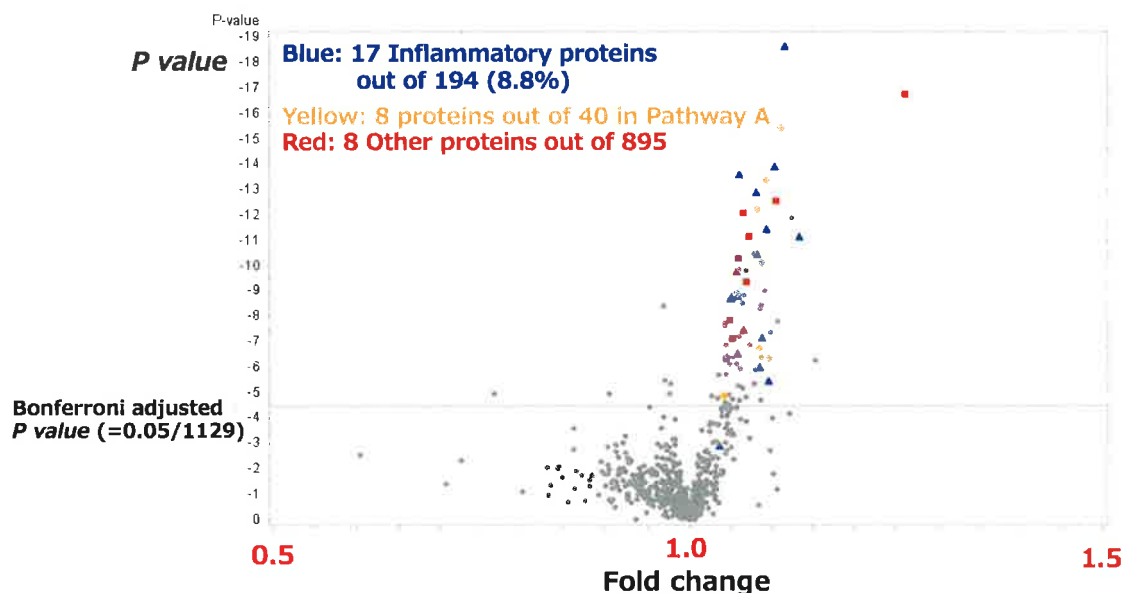
HTG EdgeSeqとqPCRで測定したmiRNAの結果が乖離した要因として以下の2点が考えられた。

- ① qPCRを行った際のmiRNAの抽出作業で一部のmiRNAが喪失している可能性

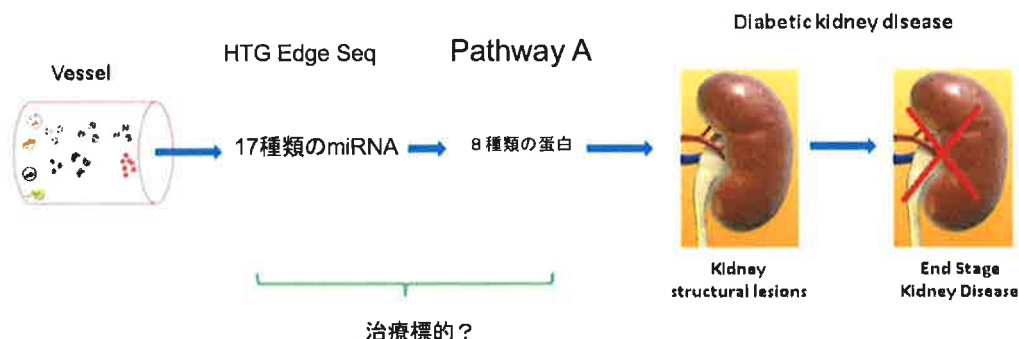
② HTG EdgeSeqとqPCRで、同じmiRNAでも測定しているものが異なる (mature miRNAとimmature miRNA等)
 以上の可能性を考慮し、今回はHTG Edge Seqで測定したmiRNAに絞って解析を進めることとした。
 同定したmiRNAについて下図に示したようにPathway解析を行った。



その結果、腎症の進展に関与するPathwayとしてPathway Aが挙げられた。このPathway A上にある蛋白をKEGG databaseを用いて同定し、その蛋白群をSOMAscan platformを用いて網羅的に測定した。測定したコホートとしては1型糖尿病 (CKD stage 3)、2型糖尿病 (CKD stage 3)、1型糖尿病 (CKD stage1, 2)、2型糖尿病 (CKD stage1, 2)をそれぞれ用いた。その結果、Pathway A上にある40個の蛋白のうちの8個の蛋白が10年以内のESRDの発症と優位な関連を認めた(下図参照)。



以上の解析より、糖尿病性腎症の進展に関与する因子として、17種類の血漿中miRNA、8種類の血漿中蛋白、Pathway Aが同定された。以下にその概念図を示す。



以上の結果について既に論文投稿し、acceptされている。

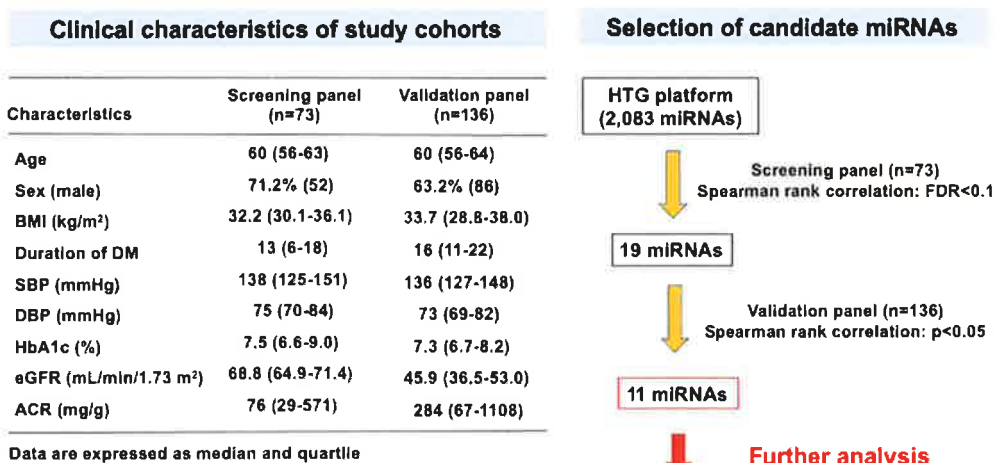
Satake E, Saulnier PJ, **Kobayashi H**, Manoj KG, Looker HC, Wilson JM, Md Dom ZI, Ihara K, O'Neil K, Krolewski B, Pipino C, Pavkov ME, Nair V, Bitzer M, Niewczas MA, Kretzler M, Mauer M, Doria A, Najafian B, Kulkarni RN, Duffin KL, Pezzolesi MG, Kahn CR, Nelson RG, and Krolewski AS. Comprehensive search for novel circulating miRNAs and axon guidance pathway proteins associated with risk of end stage kidney disease in diabetes. Journal of the American Society of Nephrology, in press, 2021.

研究 2

研究 1 の進捗が順調であったため、追加の解析として前述の実験でHTG EdgeSeqを用いて測定した血漿中のmiRNAと血糖との関連について解析を行った。以下に概念図を示す。



2型糖尿病 (CKD stage 1, 2) のコホートを用いて、スクリーニング解析として2083種類のmiRNAのうち、HbA1cと優位に相関のあった19種類のmiRNAを同定した(下図参照)。同定した19種類のmiRNAについて2型糖尿病 (CKD stage 3, 4) のコホートを用いてvalidationを行ったところ11種類のmiRNAが再現された。以上の解析より同定した11種類のmiRNAについて糖尿病関連合併症である糖尿病性腎症との関連について解析を進めた。



List of 11 candidate miRNAs							
miRNA	Screening panel (n=73)			Replication panel (n=136)		Combined panel (n=209)	
	Coefficient	-log 10 P	FDR	Coefficient	-log 10 P	Coefficient	-log 10 P
miR-8835-5p	0.40	3.3	0.07	0.2	1.7	0.25	3.7
miR-2392	0.39	3.1	0.07	0.24	2.3	0.29	4.7
miR-296-3p	0.38	3.1	0.07	0.22	2.0	0.27	4.1
miR-6746-5p	0.37	2.9	0.08	0.25	2.5	0.29	4.8
miR-150-5p	-0.37	2.9	0.08	-0.21	1.9	-0.27	4.0
miR-378a-3p	-0.37	2.9	0.09	-0.19	1.6	-0.25	3.6
miR-378g	-0.38	3.0	0.07	-0.23	2.2	-0.29	4.7
miR-1539	-0.39	3.2	0.07	-0.26	2.7	-0.29	4.7
miR-378f	-0.40	3.3	0.07	-0.17	1.3	-0.26	3.7
miR-8873-3p	-0.40	3.3	0.07	-0.21	1.9	-0.29	4.5
miR-378i	-0.45	4.1	0.07	-0.23	2.2	-0.31	5.2

➡ Among the 11 candidate miRNAs, 4 miRNAs were miR-378 family.

同定した 11 種類の miRNA について糖尿病性腎症における将来の腎機能低下リスクとの関連を検討したところ、以下のように 11 種類の miRNA の中で miR-378 family と腎機能の低下率との有意な関連を認めた。

Logistic regression analysis of circulating miR-378 family and the risk of rapid eGFR decline

Among the 11 candidate miRNAs, miR-378 family are significantly associated with eGFR decline.

Variable	Unadjusted		Model 1		Model 2	
	OR (95% CI)	-log10P	OR (95% CI)	-log10P	OR (95% CI)	-log10P
miR-378I	0.53 (0.38, 0.72)	4.2	0.56 (0.40, 0.77)	3.4	0.57 (0.40, 0.81)	2.8
miR-378a-3p	0.58 (0.42, 0.78)	3.4	0.61 (0.45, 0.84)	2.7	0.58 (0.40, 0.82)	2.6
miR-378g	0.62 (0.46, 0.84)	2.7	0.66 (0.49, 0.91)	2.0	0.66 (0.47, 0.93)	1.7
miR-378f	0.62 (0.46, 0.84)	2.7	0.66 (0.49, 0.90)	2.1	0.64 (0.46, 0.91)	1.9

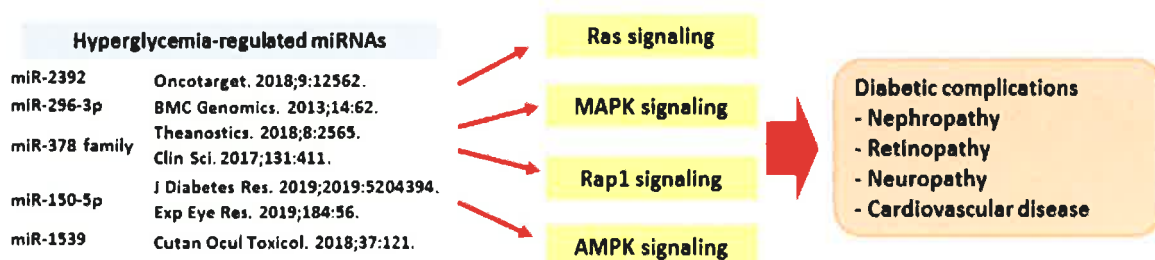
Model 1 was adjusted for age and baseline eGFR.

Model 2 was adjusted for age, baseline eGFR, systolic blood pressure, body mass index, and urine albumin to creatinine ratio.

Annual eGFR decline of over 3.5 mL/min per 1.73 m² is defined as rapid eGFR decline.

下図が本研究の結果の概念図である。本結果は現在、筆頭著者として論文準備中である。

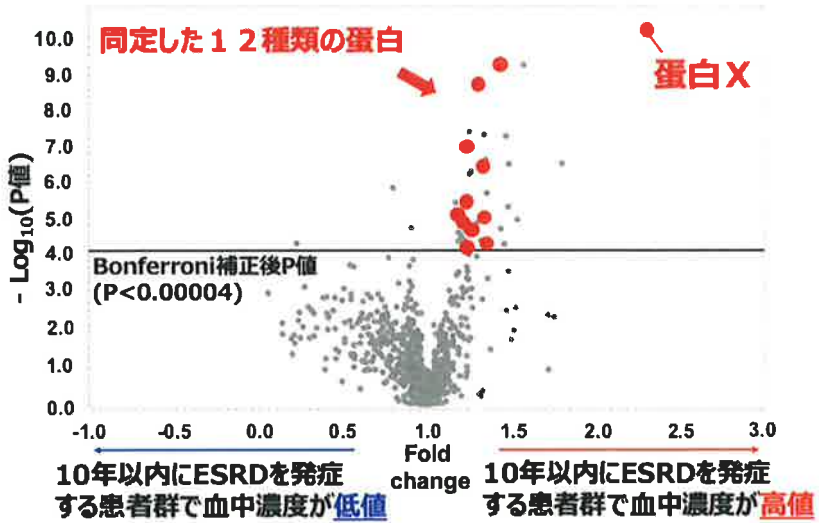
Conceptual picture



研究 3

研究進捗が順調のため、研究 1、研究 2 に加えて、前述の実験で用いた SOMAscan platform を用いて血漿中の蛋白を網羅的に測定することで、糖尿病性腎症の進展に関与する蛋白を同定する目的で解析を行った。合計 768 人の長期の臨床経過情報を持つ糖尿病患者を対象に ESRD 未発症の段階での 1,129 種類の血漿中蛋白を網羅的に測定し、糖尿病性腎症の進展に関わるリスク因子となり得る 17 種類の炎症性蛋白 (Niewczas MA et al, *Nature Med* 2019) と、12 種類の非炎症性蛋白を同定した (申請者が筆頭著者として投稿中)。この中で最も予測能が高い分泌型蛋白である蛋白 X は極めて新規性が高く、腎障害との関連を示す既報はない。一方で、蛋白 X が腎保護作用を示す Bone morphogenetic protein (BMP)-7 の antagonist としての作用を持つことが過去の *in vitro* の研究で報告されている (Zeisberg M et al, *Nature Med* 2003)。この結果の一部は学会発表を行い (Hiroki Kobayashi, Eiichiro Satake, Zaipul I Md Dom, Andrzej S. Krolewski: Notch Signaling Proteins as Key Factor in the Progression to ESRD in Diabetes; American Society of nephrology Kidney Week, FR-OR112 (oral presentation), Washington, 2019. 11)、現在投稿準備中である。今回同定した蛋白 X については帰国後動物を用いた基礎研究で機能解析を進める予定である。

Baseline (ESRD発症前の段階)の血中蛋白濃度を10年以内のESRD発症群と非発症群で比較したVolcano plot



本研究における仮説

