

論文内容要旨

microRNA-200c regulates KLOTHO expression in
human kidney cells under oxidative stress
(酸化ストレス下において microRNA-200c は
ヒト腎細胞での KLOTHO 発現を制御する)

PLoS One,14(6):e0218468,2019.

主指導教員：正木 崇生教授

(広島大学病院 腎臓内科学)

副指導教員：茶山 一彰教授

(医系科学研究科 消化器・代謝内科学)

副指導教員：杉山 英二教授

(広島大学病院 リウマチ・膠原病学)

森井 健一

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【背景】

慢性腎臓病では全身性老化症状を呈し、この病態に腎尿細管で発現する KLOTHO タンパクの発現低下が関与することが指摘されている。腎疾患の進展に酸化ストレスが重要な役割を果たすことが知られているが、酸化ストレスによる KLOTHO タンパク発現低下の機序は明らかではない。近年、タンパク発現を調節する主要な機構として、microRNA による転写後のタンパク発現調節が注目されている。また、ヒト臍帯静脈内皮細胞では過酸化水素刺激により microRNA-200c (miR-200c)の発現が増加し、細胞のアポトーシス・老化に関与することが報告されている。本研究では、酸化ストレスによる KLOTHO タンパクの発現低下に miR-200c と *KLOTHO* mRNA 3'-UTR が関与していることを検討する。

【方法と結果】

1. 過酸化水素刺激による KLOTHO タンパク発現の変化

ヒト尿細管細胞 (HK-2 細胞) に対して、酸化ストレスとして過酸化水素で刺激したところ、*KLOTHO* mRNA はコントロールと比較して 6, 12 時間で発現が増加していたのに対して、KLOTHO タンパクの発現は抑制されていた。*KLOTHO* mRNA 3'-UTR を有する luciferase reporter assay では、過酸化水素刺激により有意に luciferase 活性が抑制された。

2. 過酸化水素刺激による miR-200c 発現の変化

HK-2 細胞を過酸化水素で刺激することで miR-200c の発現は増加した。また、microRNA.org でのデータベース検索により、miR-200c は *KLOTHO* mRNA 3'-UTR と 2 カ所で結合する可能性が示された。

3. miR-200c が KLOTHO タンパク発現に及ぼす影響

miR-200c mimic を HK-2 細胞にトランスフェクトしたところ、KLOTHO タンパクは発現低下した。Luciferase reporter assay では luciferase 活性低下が認められたが、miR-200c 結合部位に変異を加えることで luciferase 活性低下は抑制された。一方、*KLOTHO* mRNA の発現に変化は認められなかった。免疫蛍光染色では、KLOTHO タンパクは HK-2 細胞の細胞質と核に発現が認められ、miR-200c mimic のトランスフェクションにより減少した。

miR-200c inhibitor を HK-2 細胞にトランスフェクトしたところ、KLOTHO タンパク発現は保持されたが、*KLOTHO* mRNA は有意な変化を認めなかった。

4. ヒト IgA 腎症における KLOTHO, 酸化ストレスマーカー, miR-200c の発現

ヒト IgA 腎症患者の腎生検組織を用いて KLOTHO, 酸化ストレスマーカー (8-OHdG, 4-HHE) の免疫染色と miR-200c の *in situ* hybridization を行った。KLOTHO タンパクと miR-200c は遠位尿細管に発現が認められた。KLOTHO タンパクの発現は酸化ストレスマーカー、miR-200c と負の相関を示した。また、酸化ストレスマーカーの発現は miR-200c と正の相関を示した。

【考察とまとめ】

HK-2 細胞において、過酸化水素刺激で誘導される miR-200c が *KLOTHO* mRNA 3'-UTR を介して KLOTHO タンパクの発現を制御していると考えられた。ヒト IgA 腎症患者の腎

生検組織においても酸化ストレスマーカー発現の上昇に伴い miR-200c は発現増加、KLOTHO タンパクの発現低下が認められた。

microRNA は翻訳抑制あるいは mRNA 分解によりターゲット遺伝子発現を抑制することが報告されている。本研究では miR-200c mimic のトランスフェクションにより KLOTHO タンパク発現と luciferase 活性は抑制されたが、*KLOTHO* mRNA は変化が認められなかった。このことから、miR-200c は *KLOTHO* mRNA 分解ではなく翻訳抑制することで KLOTHO 発現を制御していると考えられた。