

公募助成「腎不全病態研究助成」研究サマリー

研 究 名	二次性副甲状腺機能亢進症の過形成腺における結節内 microRNA 解析
所 属 機 関	東海大学医学部内科学系 腎内分泌代謝内科
氏 名	金井 厳太
<p>慢性腎臓病（CKD）における二次性副甲状腺機能亢進症（SHPT）は副甲状腺のびまん性増殖から結節性増殖への進展においてモノクローナル増殖が示唆されており、組織内の形質転換されたコロニーが結節ごとに存在している可能性が知られている。副甲状腺の miRNA はまだ SHPT の特徴を明らかにできておらず、VDR・CaSR の発現や機能を制御する miRNA についても十分な検討が行われていない。近年、副甲状腺における Dicer knockout モデルによって CaSR を介した PTH 分泌機構に miRNA が関与していることが明らかとなり、miRNA の副甲状腺機能への関与が示されている。予備実験において、結節ごとの miRNA の発現パターンは大きく異なることが示された。そこで、本研究では、副甲状腺結節ごとの miRNA を調べることによって病態の進展に関わる因子を同定し、治療効果および抵抗性のマーカーとしての有効性を検証することを目的とする。</p> <p>SHPT 患者から摘出した副甲状腺を半分に分割したうえで同一腺内の結節部分をサンプリングし、miRNA を含む全 RNA を抽出精製する。得られた RNA を用いて NGS RNA シーケンサー（Illumina）を使用し miRNA を網羅的に解析する。摘出標本の半分はホルマリン固定パラフィン包埋切片を用い PTH・VDR・CaSR・MIB-1 の免疫組織化学を施行する（染色条件等は検討済）。結節ごとの PTH・VDR・CaSR・MIB-1 発現量と miRNA の発現量を比較し、PTH・VDR・CaSR・MIB-1 の発現制御に関連すると想定される miRNA を絞り込む。この結果を元に PTH・VDR・CaSR・MIB-1 発現に関連する miRNA を対象としてプローブをデザインし、摘出標本を用いて RT-PCR を行う。病理組織切片を用いて ISH を行い、これらの発現結果と PTH・VDR・CaSR・MIB-1 の免疫組織学の発現を比較し相関関係を検討する。</p> <p>NGS RNA シーケンサーを使用し miRNA を網羅的に解析した結果、抽出された配列の 21.67%が database に一致した。上位 50 の配列において miR-27b の発現が最も多く、最小腺に比較して miR-10 は 4.5 倍の発現を認めた。最大腺および最小腺に特異な 18 配列では miR-134 と miR-211 が特徴的な発現を示した。代表的な 20 配列中で既知の機能を持つ miRNA の他に新たに 4 つの配列で有意差が認められた。未知の Small non-codingRNA においてもいくつかの配列で有意差が認められた。副甲状腺のホルマリン固定パラフィン包埋標本からの遺伝子発現解析を試みた。相関分析では miR148a は CASR、FGFR1、PTH において中程度の負の相関を認めた。網羅的解析で得られた候補配列において副甲状腺内に存在する複数の結節毎の発現を比較したところ、miR-148 について ISH を行った結果、結節毎に発現強度が異なることが明らかになった。</p>	