

課題番号 44

## 新生児慢性肺疾患における miR-21 の役割解明と 臨床応用に関する研究

### [1] 組織

代表者：郷 勇人  
(福島県立医科大学小児科学講座)

対応者：久保 純  
(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

小笠原 啓 (福島県立医科大学総合周産期母子医療センター)  
佐藤 賢一 (福島県立医科大学総合周産期母子医療センター)  
佐藤 真紀 (福島県立医科大学小児科学講座)  
柏原 祥曜 (福島県立医科大学小児科学講座)  
前田 創 (福島県立医科大学小児科学講座)  
知識 美奈 (福島県立医科大学小児科学講座)

研究費：物件費 15 万円

### [2] 研究経過

新生児慢性肺疾患(CLD)は未熟児の重篤な合併症の一つで、さらなる病態解明が望まれる。申請者は、高濃度酸素暴露により作製した CLD マウス肺において、miRNA-21(miR-21)が発症や重症化に関わることを明らかにし、さらに早産児の血中から、miRNA を内包するエクソソームを同定した。本研究の目的は、① miR-21 欠損 CLD マウスを用いて、CLD における miR-21 の役割を解明する ② 野生型 CLD マウスに miR-21 の阻害剤 (inhibitor) を投与後、生理学的、分子生物学的に評価し、miR-21 が治療標的になるかを検証する ③ 早産児の臍帯血中エクソソームの miRNA の発現解析を行い、CLD の低侵襲的な早期診断、重症化予測のバイオマーカーを探索することである。

#### 【対象と方法】

マウスの実験

#### 1) miR-21欠損CLDマウスと野生型CLDマウスの作製と肺での遺伝子発現解析

生後12時間以内の野生型C57BL/6マウスとmiR-21欠損マウスを、各々母マウスと共にケージごと酸素チャンバー内に入れ、高濃度酸素(FiO<sub>2</sub>0.95)に7日間暴露し、非暴露群をコントロールとする。miR-21欠損マウス(miR-21ホモ欠損C57BL/6マウス)は共同研究者の東北大学加齢医学研究所小椋利彦教授より分与いただき、genotyping同研究室のプロトコールに従って行う。miR-21 が標的とする遺伝子であるPten(Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10)、PDCD4 (Programmed cell death protein 4)、Spry1(Protein sprout homolog 1)と炎症性サイトカインであるIL-6、CCL2、IL-1bの肺でのmRNA発現をqPCRで解析した。miR-21 KO仔マウスの酸素暴露実験と並行して、miR-21 KOマウスと野生型(WT)の成獣を酸素暴露する実験を行った。

ス(miR-21ホモ欠損C57BL/6マウス)は共同研究者の東北大学加齢医学研究所小椋利彦教授より分与いただき、genotyping同研究室のプロトコールに従って行う。miR-21 が標的とする遺伝子であるPten(Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10)、PDCD4 (Programmed cell death protein 4)、Spry1(Protein sprout homolog 1)と炎症性サイトカインであるIL-6、CCL2、IL-1bの肺でのmRNA発現をqPCRで解析した。miR-21 KO仔マウスの酸素暴露実験と並行して、miR-21 KOマウスと野生型(WT)の成獣を酸素暴露する実験を行った。

#### 2) miR-21inhibitor皮下注射マウスの作製

野生型CLDマウスに10mg/kg/doseのmiR-21阻害剤とPBSを日齢1と5に皮下投与した。投与効果は生理学的、分子生物学的に評価した。

#### 3) マウスの生理学的評価、生存曲線の作成

マウスの生理学的評価は、非侵襲性無拘束呼吸機能解析装置 (BUXCO で気道抵抗、1回換気量、分時換気量、呼吸数を日齢7、14に測定する。また、miR-21 KO マウス、野生型マウスの酸素暴露後の体重変化や生存曲線を調べた。

#### ヒト検体を用いた実験

##### 1) 早産児からの検体採取

在胎期間32週、出生体重1500g未満で出生し、ご家族の同意が得られた人工呼吸管理を要した患児を対象とし、臍帯血、日齢28の血液を採取する。各日齢で、CLD児、非CLD児の各20検体(計40検体)を目標に採取する。血清は250μlを採取する。

##### 2) 血清中からのエクソソーム抽出

採取した血清からエクソソーム抽出キット (ExoQuick) を用いて、エクソソームを抽出する。抽出物がエクソソームであることを確認するため、ナノ粒子トラッキング解析 (Nanosight社) で、粒子数、粒子径を測定し、ウェスタンブロットでエクソソームが抽出されているか確認する。

### 3) 本疾患患児の血清中におけるmiR-21の発現量の推移

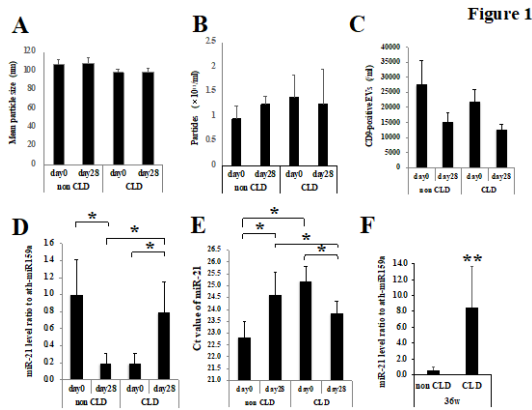
サンプルサイズを増やし、本疾患患児の血清 Exosome を ExoQuick 中の日齢0、28、修正36週のmiR-21の発現量の推移をみて、本疾患の重症度と関連があるか検討する。

#### [3] 成果

##### (3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

1) 早産児の血清中のmiR-21の発現を臍帯血、日齢28、修正36週で行ったところ、CLD児では日齢28、修正36週でExosome中のmiR-21の発現が上昇していた。一方で、CLD児、非CLD児で血中のExosomeの粒子数や粒子径は同様であった (Figure 1)。



2) miR-21 KO マウスと野生型マウスの8週齢時の体重はそれぞれ  $26.0 \pm 0.6g$ 、 $25.8 \pm 0.4g$  と差はなく、表現型にも差を認めなかった。酸素暴露後3日目の体重はmiR-21KOで  $21.1 \pm 0.7g$ 、WTで  $21.5 \pm 0.4g$  と同様に減少していた。生存曲線は酸素暴露後4日目で、miR-21 KO マウスは生存率50%で、WTは20%であった。

3) miR-21 inhibitor 投与新生仔マウスとPBS投与新生仔マウスにおける肺でのmiR-21の発現をqPCRで解析したところ、miR-21 inhibitor 投与群では、miR-21の発現はPBS投与群に比べ、20%程度まで減少していることがわかった。さらにmiR-21 inhibitor 投与群ではPBS群に比べ、酸素暴露後日齢14での体重( $6.2g \pm 0.3g$  vs  $5.8g \pm 0.2g$ )が有意に増加し、分時換気量( $21.3 \pm 0.9ml$  vs  $18.2 \pm 1.2ml$ )、呼吸数( $361 \pm 21$  bpm vs  $314 \pm 11$  bpm)ともに改善していた。

4) 早産児の血清中のmiR-21の発現を臍帯血、日齢28、修正36週で行ったところ、CLD児では日齢28、修正36週でExosome中のmiR-21の発現が上昇していた。一方で、CLD児、非CLD児で血中のExosome

の粒子数や粒子径は同様であった。

5) miR-21 KO 新生仔マウスとWT新生仔マウスを7日間酸素暴露したところ、miR-21 KO マウスではmiR-21の標的遺伝子であるPtenの発現が上昇していることがわかった。PDCD4、Spry1についてはmiR-21 KO マウスとWTで酸素暴露後の発現は変化がなかった。また、炎症性サイトカインに関してIL-6、IL-1bはmiR-21 KO マウスとWTで酸素暴露後の発現に差はないものの、CCL2の発現がmiR-21 KO マウス群で有意に高かった。

##### (3-2) 波及効果と発展性など

Exosome中のmiR-21の発現は、出生時は低いものの、生後28日で上昇し、修正36週でも高値が持続するため、日齢28の時点で血中ExosomeのmiR-21の発現が上昇する場合、CLD発症の予測になり得る可能性が示唆されたが、出生時の値は非CLD児より低いため、出生時よりCLDの発症を予測するのは難しいと考えられた。一方、マウスの酸素暴露の実験ではmiR-21 inhibitor 投与により呼吸生理学的に改善が得られていることから、miR-21が治療標的になり得る可能性が示唆され、今後、miR-21 KO マウスでも同様実験を継続して検証していく予定である。

#### [4] 成果資料

##### (1) Inhibition of microRNA-21 ameliorates lung function in neonatal mice lung exposed to hyperoxia.

上記演題名でアメリカ小児科学会で発表予定で本共同研究成果を論文作成中である。