

課題番号 53

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：前田創 (福島県立医科大学小児科学講座)

久米庸平 (福島県立医科大学小児科学講座)

前田亮 (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。

研究打ち合わせ状況に関しては、miR-21 mimic inhibitor のトランスフェクション実験に関してのメールでの打ち合わせを 2019 年 6 月 4 日、11 日、13 日、17 日、27 日、8 月 2 日、6 日、9 月 11 日、10 月 1 日に行った。トランスフェクション試薬を小椋研究室の久保先生に郵送し、実験を行なっていた。

【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 (FiO₂ 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。

2) miR-21 inhibitor 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、¹²⁵I-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

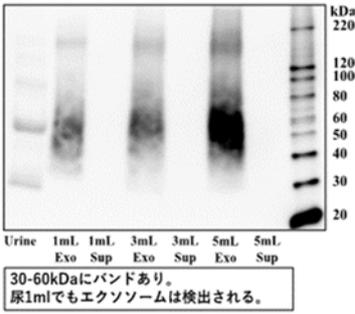
サンプルサイズを増やし、本疾患患児の血清 Exosome を ExoQuick 中の日齢 0、28、修正 36 週の miR-21 の発現量の推移をみて、本疾患の重症度と関連があるか検討する。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

- 1) エクソソームの特異的タンパクである CD9, CD63 の Immunoblotting で、早産児の血中からエクソソームを抽出できることを確認した。一方、CLD 児、非 CLD 児のエクソソームの粒子数や粒子径に変化はなかった。CLD 児では日齢 28、修正 36 週で血清エクソソーム中の miR-21 の発現が上昇し (Figure 3 I, J)、特に日齢 28 のエクソソーム miR-21 の発現が CLD の高集中度に重症度を予測することがわかった。A549cell を用いて、miR-21 がアポトーシスに関わる Programmed cell death 4 (PDCD4) の発現を直接調整していることを明らかにした。
- 2) 続いて、早産児の尿中からエクソソームを検出できるかをウェスタンブロッティングで検証した。エクソソームに特異的に発現している CD63 が、エクソソームのペレットのみに発現していた。また、新生児の尿は少なくとも 1ml あれば、エクソソームを抽出できる。成人では、通常尿 10ml 以上を用いてエクソソームを検出するが、早産児では非常に少ない尿量でエクソソームを抽出できることを示した。

尿エクソソーム中の CD63 の蛋白発現



30-60kDaにバンドあり。
尿1mlでもエクソソームは検出される。
- 3) CLD モデルマウスの実験では、日齢 14 では miR-21 inhibitor 投与群で呼吸回数と分時換気量が改善していた。miR-21 ヘテロ欠損マウスでも同様の結果が得られたが miR-21 ホモ欠損マウスでは野生型 CLD マウスと比べ呼吸機能は変化がなかった。
- 4) miR-21 KO 新生仔マウスと野生型新生仔マウスを 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 PDCD4 の発現が上昇していることがわかった。また、炎症性サイトカインに関して IL-6, IL-1b は miR-21 KO と野生型マウス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
- 5) 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、野生型マウスは 20%であった。

- 6) 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 ± 21 bpm vs 314 ± 11 bpm) とともに改善していた。
- 7) 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。
- 8) 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 ± 21 bpm vs 314 ± 11 bpm) とともに改善していた。

(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. 上記演題名で今後、アメリカ小児科学会において発表予定で本共同研究成果を論文作成中である。