

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：

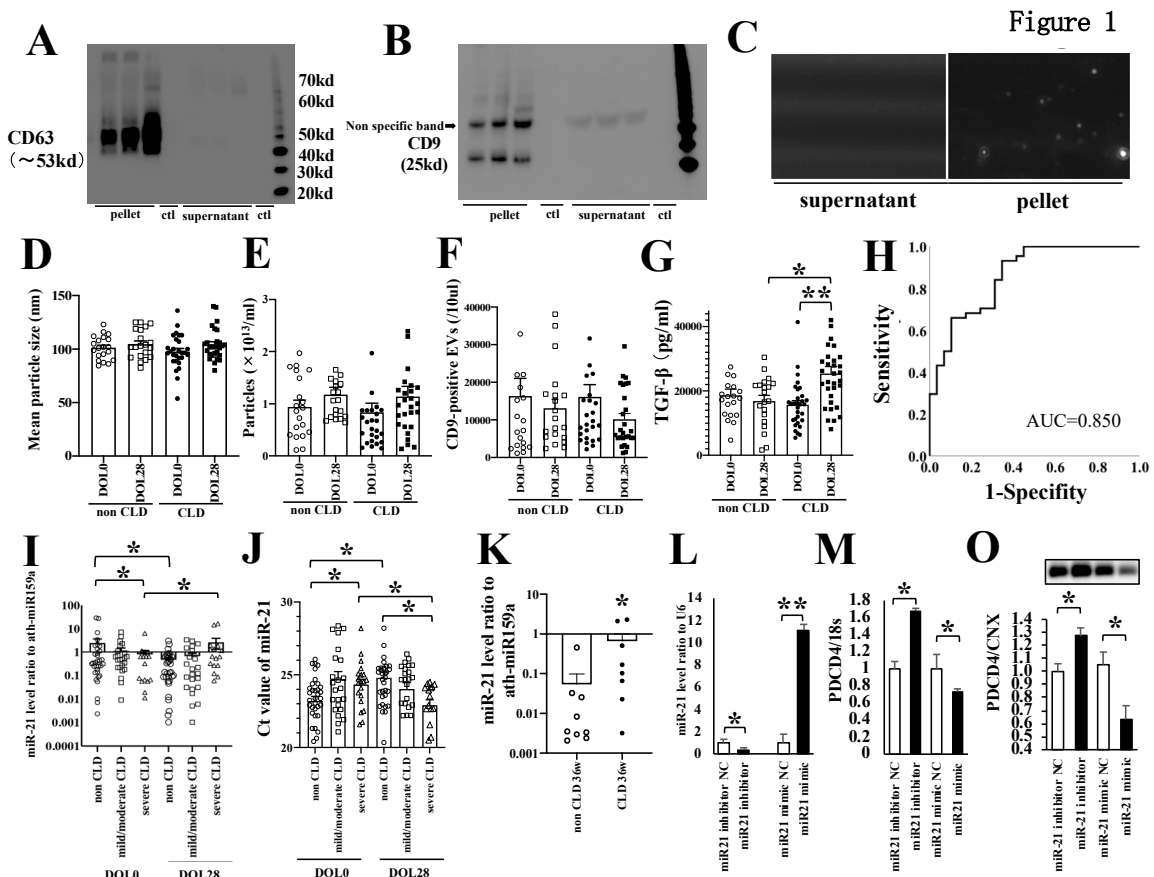
- 前田 創 (福島県立医科大学小児科学講座)
- 久米 備平 (福島県立医科大学小児科学講座)
- 前田 亮 (福島県立医科大学小児科学講座)
- 知識 美奈 (福島県立医科大学小児科学講座)

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。

本年度は、コロナウイルス感染の蔓延により、メールでの連絡や相談のみで、進捗状況を確認した。



[3] 成果

(3-1) 研究成果

【結果】

- 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、特に日齢 28 のエクソソーム miR-21 の発現が CLD の高感度に重症度を予測することがわかった (Figure 3H)。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 (Figure 参照)。
- 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 (右)。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。
- 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。本共同研究は、学外研究者との交流が飛躍的に活性化し、マウス人工呼吸器関連肺障害マウスのプロジェクトに発展した。

[4] 成果資料

これまでの成果については、2019 年 5 月米国で開催された Pediatric Associate Meeting で発表した。