

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19921

研究課題名(和文) 脊髄虚血再灌流障害を軽減させる細胞外microRNAの探索

研究課題名(英文) Analysis of extracellular microRNA having protective effects against ischemia-perfusion injury of organs after ischemic preconditioning

研究代表者

上野 耕司 (UENO, Koji)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30736070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：C57BL/6マウスの下肢に対する虚血プレコンディショニングは、エクソソームに含有されているmicroRNAの中で、VEGFを標的遺伝子とするmiR-762とmiR-3072-5pの発現を減少させて、血液中のVEGF濃度を一時的に上昇させた。虚血プレコンディショニングはCD34陽性骨髄細胞におけるmiR-762とmiR-3072-5pの発現を減少させた。これらの結果から、虚血プレコンディショニングが、CD34陽性骨髄細胞におけるmiR-762とmiR-3072-5pの減少による血液中のVEGF濃度上昇が、脊髄虚血再灌流障害を軽減させている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ischemic preconditioning (IPC) has protective effects against ischemia-perfusion injury of organs. Plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) levels were increased 24 h after rIPC compared with those in sham-operated animals. Some microRNAs targeting VEGF were downregulated in exosomes 24 h after rIPC. The expression levels of miR-762 and miR-3072-5p targeting VEGF were downregulated in femoral CD34-positive bone marrow (BM) cells 24 h after rIPC compared with those in sham-operated controls. These data suggest that rIPC transiently increases plasma VEGF levels by downregulating miR-762 and miR-3072-5p in CD34-positive BM cells, leading to protection against organ ischemia.

研究分野：microRNA

キーワード：細胞外microRNA エクソソーム 虚血プレコンディショニング

## 1. 研究開始当初の背景

虚血プレコンディショニングは、心臓、脊髄などの虚血再灌流障害に対する明らかな臓器保護効果が証明されているが、その機序は完全には解明されていない。大規模ゲノム解析の技術革新により、タンパク質をコードしない non-coding RNA の一つである microRNA が細胞内のタンパク質の翻訳を制御しているだけでなく、エクソソーム内に取り込まれることで細胞外へ分泌され、extracellular RNA として細胞間伝達機能に参与していることが注目されている。本研究は、虚血プレコンディショニングによる臓器保護効果の解明のために、臓器保護効果を有する細胞外 microRNA の探索を行い、脊髄虚血再灌流障害を軽減する新たな治療法の開発を目指すものである。

(1) 虚血プレコンディショニングによる臓器保護効果：虚血プレコンディショニング (Ischemic preconditioning : IPC) は、デューク大学の KEITH A. REIMER と ROBERT B. JENNINGS の両氏が中心となり、犬の冠動脈結紮モデルを用いた虚血再灌流障害によって引き起こされた心筋梗塞部位の ATP や電解質の量を調べる一連の実験において (*Am J Pathol.* 1978、*Am J Physiol.*1986)、犬の冠動脈を長時間結紮して心筋梗塞を誘発する前に短時間の虚血と灌流を繰り返す行くと、虚血再灌流障害によって引き起こされる心筋梗塞のサイズが小さくなることから、IPC は臓器保護作用を持つ生体防御反応として報告された (*Circulation.* 1986)。その後、IPC による臓器保護効果は肝臓、脊髄、腎臓などでも観察され (*J Lab Clin Med.* 1996、*Ann Thorac Surg.* 1997、*BJU Int.* 1999)、更に、遠隔組織を一定時間虚血にすること (Remote IPC : rIPC) でも臓器保護効果があることが認められている (*Lancet* 2013)。また、IPC による臓器保護効果は、IPC 刺激後に骨髄由来幹細胞の末梢血への動員が上昇することが関与していると報告されているが (*J Am Coll Cardiol.* 2009)、IPC による臓器保護効果の機序は完全には解明されていない。

(2) 細胞外 microRNA の知見：non-coding RNA の一つである microRNA (ヒトでは約 2000 種類、マウスでは約 1200 種類) は標的となる mRNA の 3' 側の非翻訳領域 (3' UTR : three prime untranslated region) に結合し、mRNA からタンパク質が合成される翻訳の過程を抑制することで、標的遺伝子の機能を調節する働きを持つ 18~25 塩基の RNA である。そ

して、microRNA が細胞内のタンパク質の翻訳を制御しているだけではなく、エクソソーム内に取り込まれた microRNA は細胞外へ分泌され、その microRNA を含んでいるエクソソームが血液中を動き、遠隔地にある組織の細胞に取り込まれることで、その遠隔地の細胞内のタンパク質翻訳を制御していることが発見され、microRNA が extracellular RNA (exRNA: 細胞外 RNA) として細胞間伝達機能に参与していることが注目されている (*Nat Cell Biol.* 2007)。

(3) これまでの IPC による臓器保護効果に対する microRNA 研究：心臓への IPC による保護効果としては 2010 年に心臓組織内の microRNA 研究が報告され (*Cardiovasc Res.* 2010)、2014 年に rIPC による血液中の microRNA が解析され、microRNA-144 が心臓の虚血再灌流障害に対して保護効果を持つと報告されているが (*Basic Res Cardiol.* 2014)、脊髄への IPC による保護効果に関する microRNA 研究の報告はない。

## 2. 研究の目的

本研究では rIPC の脊髄虚血再灌流障害に対する保護効果を細胞外 microRNA の視点から研究を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) マウスに対する rIPC の方法

C57BL/6 マウス の腹部大動脈を 5 分間クリップで taping し、再灌流を 5 分間のサイクルを合計 3 回行う。対照群である sham は、開腹したマウスとした。

### (2) rIPC 後の血漿サンプル/培養上清サンプルと ELISA による VEGF 濃度測定

rIPC と sham をして 24 時間、48 時間、72 時間後のマウスから、EDTA を用いて採血した後に、3000rpm、10 分、4 で遠心し、回収した上清を血漿とした。回収した細胞培養液を 2000rpm、3 分で遠心し、上清を培養上清サンプルとした。VEGF 濃度は mouse ELISA kits (R&D Systems, Inc 社) を使用して測定した。

### (3) エクソソームに含有されている microRNA の単離と microRNA microarray 解析

rIPC をして 24 時間後の血漿サンプルに対して、Total Exosome Isolation Kit (from plasma) と Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific 社) を使用してエクソソーム中の microRNA が単離された。microRNA は 3D-Gene® miRNA Oligo

chips (東レ)を用いて解析された。

#### (4) CD34 陽性骨髄細胞の単離

マウスの大腿骨からフラッシュ法により採取した骨髄細胞を赤血球除去試薬で処理後に、PBS で骨髄細胞を洗浄した。骨髄細胞は FITC Rat anti-Mouse CD34 (#553733, BD Biosciences 社)と FITC Rat IgG2a Isotype Control (#553929, BD Biosciences 社)を on ice で 60 分間反応させた後に、Cytomics FC500 (Beckman Coulter Co. 社)を用いて、骨髄細胞における CD34 陽性細胞の割合が解析された。骨髄細胞が Rat Anti-Mouse CD34 (#553731, BD Biosciences 社) と Anti-Rat IgG MicroBeads (Miltenyi Biotec 社)を反応させた後に、MACS Cell Separation instrument (Miltenyi Biotec 社)を用いて、CD34 陽性骨髄細胞と CD34 陰性骨髄細胞に分けられた。

#### (5) qPCR による microRNA 発現解析

CD34 陽性骨髄細胞と CD34 陰性骨髄細胞から miRNeasy Mini Kits (Qiagen 社)を用いて microRNA を抽出し、miScript II RT Kit (Qiagen 社)を使用して cDNA が作製された。miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen 社)と次に示すプライマーを使用して qPCR が行われた。miScript Primer Assays (Qiagen): RNU6\_2 (MS00033740)、miR-149-3p (MS00069222)、miR-711 (MS00002975)、miR-762 (MS00016443)、miR-2137 (MS00021917)、miR-3072-5p (MS00021938)、miR-3960 (MS00042777)、miR-5112 (MS00043008)、miR-6366 (MS00064917)。

#### (6) microRNA ノックダウン実験

48-well plate の 1 ウェルに CD34 陽性骨髄細胞  $8 \times 10^4$  個/培地 250 $\mu$ l で播種した。4.5 $\mu$ l の 20 $\mu$ M の negative control、miR-762 inhibitor、miR-3072-5p inhibitor (Qiagen 社)と 4.5 $\mu$ l HiPerFect Transfection Reagent を 50 $\mu$ l Opti-MEM® I Reduced Serum Media (Thermo Fisher Scientific)に入れて 15 分間、室温で培養後に CD34 陽性骨髄細胞が播種されているウェルに加えられた。microRNA inhibitor 導入 24 時後の培養上清中の VEGF 濃度が測定された。

## 4. 研究成果

(1) rIPC における血漿中の VEGF 濃度変化  
rIPC を 24 時間後の血漿サンプルにおける VEGF 濃度は sham よりも優位に高い結果であったが、rIPC と sham における 48 時間後と 72 時間後の血漿サンプル中の VEGF 濃度に変化はなかった (図 1)。

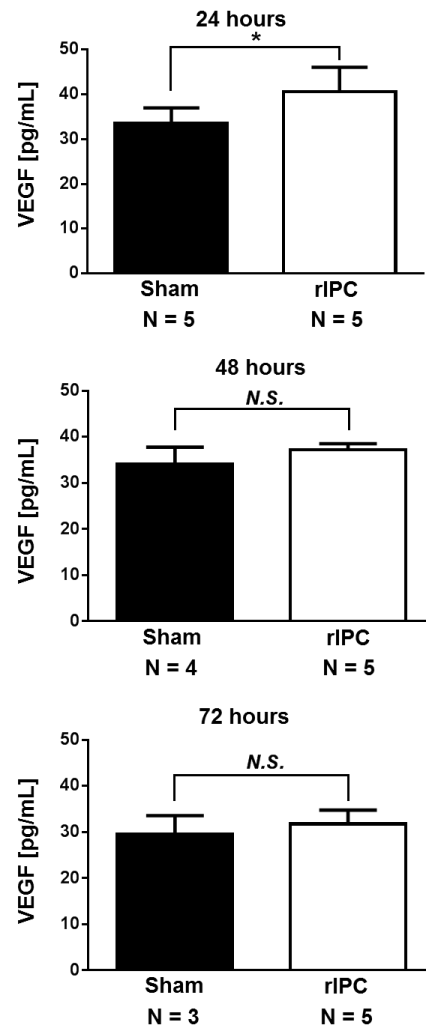


図 1 rIPC による血漿中の VEGF 濃度変化

(2) 骨髄細胞における CD34 陽性細胞の割合  
CD57BL/6 マウスの大腿骨の骨髄細胞における CD34 陽性細胞は約 11%であった (図 2)。

(3) rIPC 後の CD34 陽性骨髄細胞における VEGF を標的遺伝子とする miR-762 と miR-3072-5p の発現変化

miR-762 と miR-3072-5p が VEGF の 3' UTR 結合することが Target Scan algorithms (www.microRNA.org)によって予測された (図 3)。

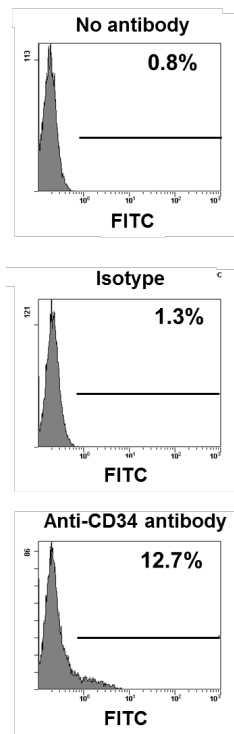


図2 CD34 陽性骨髄細胞の割合

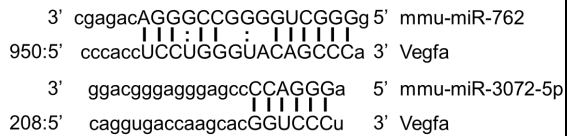


図3 VEGF 3' UTR に対する miR-762 と miR-3072-5p の結合予測

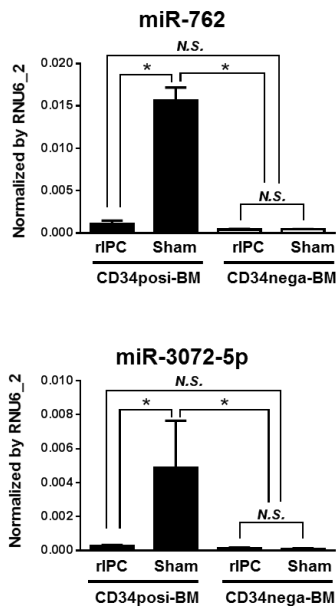


図4 rIPC 後の骨髄細胞における miR-762 と miR-3072-5p の発現変化

rIPC を 24 時間後において、CD34 陽性骨髄細胞における miR-762 と miR-3072-5p の発現レベルが優位に低下したが、CD34 陰性骨髄細胞における発現変化は無かった (図4)。

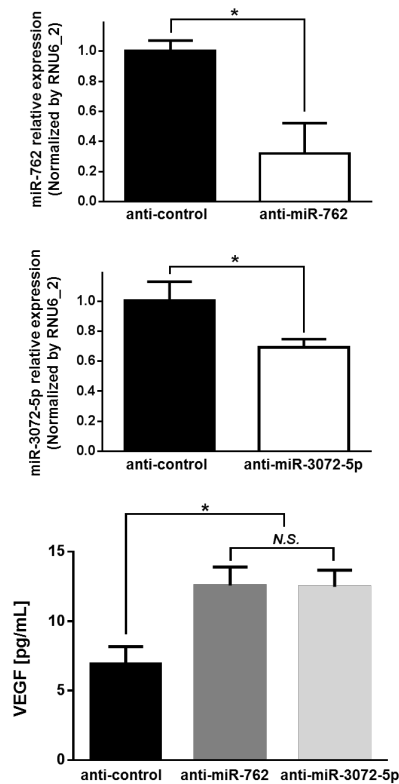


図5 miR-762 と miR-3072-5p をノックダウンして 24 時間後の VEGF 濃度

(4) CD34 陽性骨髄細胞の VEGF 産生における miR-762 と miR-3072-5p の関与  
miR-762 inhibitor と miR-3072-5p inhibitor を CD34 陽性骨髄細胞に導入して 24 時間後における miR-762 と miR-3072-5p の発現レベルは約 40~60% 下がり (図5 上、図5 中) 培養上清中の VEGF 濃度はそれぞれ約 2 倍上昇した (図5 下)。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

Ueno K, Samura M, Nakamura T, Tanaka Y, Takeuchi Y, Kawamura D, Takahashi M, Hosoyama T, Morikage N, Hamano K. Increased plasma VEGF levels following ischemic preconditioning are associated with downregulation of miRNA-762 and miR-3072-5p. Sci Rep. 2016;6:36758. doi: 10.1038/srep36758. (査読有)

Ueno K, Takeuchi Y, Samura M, Tanaka Y, Nakamura T, Nishimoto A, Murata T, Hosoyama T, Hamano K. Treatment of refractory cutaneous ulcers with

mixed sheets consisting of peripheral blood mononuclear cells and fibroblasts. *Sci Rep.* 2016; 6:28538. doi: 10.1038/srep28538. (査読有)

Tanaka Y, Shirasawa B, Takeuchi Y, Kawamura D, Nakamura T, Samura M, Nishimoto A, Ueno K, Morikage N, Hosoyama T, Hamano K. Autologous preconditioned mesenchymal stem cell sheets improve left ventricular function in a rabbit old myocardial infarction model. *Am J Transl Res.* 2016;8:2222-33.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4891434/>) (査読有)

Nakamura T, Hosoyama T, Kawamura D, Takeuchi Y, Tanaka Y, Samura M, Ueno K, Nishimoto A, Kurazumi H, Suzuki R, Ito H, Sakata K, Mikamo A, Li TS, Hamano K. Influence of Aging on the Quantity and Quality of Human Cardiac Stem Cells. *Sci Rep.* 2016; 6:22781. doi: 10.1038/srep22781. (査読有)

Samura M, Morikage N, Suehiro K, Tanaka Y, Nakamura T, Nishimoto A, Ueno K, Hosoyama T, Hamano K. Combinatorial Treatment with Apelin-13 Enhances the Therapeutic Efficacy of a Preconditioned Cell-Based Therapy for Peripheral Ischemia. *Sci Rep.* 2016;6:19379. doi: 10.1038/srep19379. (査読有)

Hosoyama T, Samura M, Kudo T, Nishimoto A, Ueno K, Murata T, Ohama T, Sato K, Mikamo A, Yoshimura K, Li TS, Hamano K. Cardiosphere-derived Cell Sheet Primed with Hypoxia Improves left ventricular Function of Chronically Infarcted Heart. *Am J Transl Res.* 2015;7:2738-51. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4731671/>) (査読有)

Kugimiya N, Nishimoto A, Hosoyama T, Ueno K, Enoki T, Li TS, Hamano K. The c-MYC-ABCB5 axis plays a pivotal role in 5-fluorouracil resistance in human colon cancer cells. *J Cell Mol Med.* 2015;19:1569-81. doi:10.1111/jcmm.12531. (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 上野耕司、竹内由利子、溝口高弘、佐村誠、細山徹、濱野公一、難治性皮膚潰瘍に対する線維芽細胞シートの Collagen III を活性化させる因子の基礎的検証、第 16 回日本再生医療学会総会、2017.3.7-9、仙台国際センター (宮城県仙台市)
2. 上野耕司、佐村誠、中村玉美、田中裕也、竹内由利子、河村大智、高橋雅弥、細山徹、森景則保、濱野公一、虚血プレコンディショニング後の VEGF の増加は miRNA-762 と miR-3072-5p の発現低下と関連する、第 8 回日本 RNAi 研究会、2016.8.31-9.2、グランドプリンスホテル広島 (広島県広島市)
3. 上野耕司、佐村誠、中村玉美、田中裕也、竹内由紀子、細山徹、濱野公一、虚血プレコンディショニングによる細胞外 microRNA の解析、第 7 回日本 RNAi 研究会、2016.8.26-28、グランドプリンスホテル広島 (広島県広島市)
4. 上野耕司、竹内由利子、佐村誠、田中裕也、中村玉美、西本新、細山徹、濱野公一、アロ細胞混合シートを用いた難治性皮膚潰瘍治療の検討と移植された細胞シートの残存有無の検証、第 15 回日本再生医療学会総会、2016.3.17-19、大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 耕司 (UENO, Koji)  
山口大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：30736070

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし

(4) 研究協力者  
なし