

令和元年5月21日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09610

研究課題名(和文) ExosomesとマイクロRNAを用いた、安全性の高いオーダーメイド治療の開発

研究課題名(英文) Investigation of safer methods of therapeutic miRNA and exosomes

研究代表者

加藤 規利 (Kato, Noritoshi)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：90716052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は敗血症性多臓器障害に関し、miRNA補充治療の病態生理に対する役割を示した。in vitroにおいて炎症性サイトカインを抑制しうるmiRNAの評価を行い、miR-146aが最も効率よくサイトカイン分泌を抑制しうることを見つけた。盲腸結紮穿孔にて敗血症動物モデルを作成し、PEIをDDSとしてmiR-146a発現プラスミドを投与した所、血中サイトカインレベル、臓器障害、生存率の改善を確認した。投与したプラスミドは主に脾臓に分布し、NF-κBの活性化抑制が見られた。実験結果より、miR-146aを脾臓マクロファージで発現させることにより、過剰な全身炎症反応と臓器障害を抑制できると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症は全死亡率が高い重篤な疾患であるが、抗菌治療や、補液などに治療的なエビデンスがあるものの、新たな治療法の開発は遅れ、生存率の改善は停滞している。我々はToll like receptorシグナルをmiRNAによって制御するといった、全く新しいアプローチで治療を行った。結果から全身投与したmiRNA発現ベクターは、主に脾臓マクロファージに取り込まれ、過剰なサイトカイン産生を抑制し、生存率の改善に寄与していた。これは今後の核酸医薬の開発にとって、投与核酸の体内動態、作用を調べる上でも意義深い。また、miRNAは低分子医薬や抗体医薬と比べ安価に作成できるため、将来の治療応用にも期待が持てる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the pathophysiological role of exogenously applied microRNA (miRNA) in sepsis-induced multiple organ injury. In vitro, we tested possible miRNAs which suppressed the production of pro-inflammatory cytokines. Of these, miR-146a displayed the highest suppressive effect. Sepsis was induced in mice via cecal ligation and puncture (CLP) and an intravenous injection of a complex of miR-146a-expressing plasmid and polyethyleneimine. Treatment with this complex significantly decreased the level of serum inflammatory cytokines, attenuated organ injury, and led to increased survival from sepsis. miR-146a-expressing plasmid was abundantly distributed in splenic macrophages. CLP mice treated with miR-146a displayed significantly decreased NF-κB activation in the spleen. The collective results support the conclusion that the induction of miR-146a expression in splenic macrophages prevents excessive inflammation and sepsis-induced multiple organ injury.

研究分野：miRNA

キーワード：miRNA Toll like receptor

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 敗血症は全世界的にも罹患率、及び致死率の高い病態である。抗菌薬治療や補液による循環の保持に一定の治療的エビデンスがあるものの、新たな治療方法の開発は遅れ、生存率の改善は停滞している。その為、敗血症の病態理解を深めること、その上で新しい治療方法の開発が待たれている。

(2) 敗血症は感染症が引き金になるものの、最終的には宿主の生体反応の統御不全によって臓器機能不全に陥る状態であり、感染に対する生体の免疫反応を不足でも過剰でもなく、適切にコントロールすることが肝要である。昨今敗血症に対し、Toll like receptor (TLR) シグナルに着目し、低分子化合物による TLR シグナルの抑制を主眼においた臨床研究も行われたが、現時点では奏功するに至っていない。

(3) 医療現場で用いる薬剤は、低分子化合物から遺伝子組換え医薬、そして昨今では抗体医薬が目覚ましい進歩を遂げ、治療の枠組みを変えるに至っている。今後は iPS 細胞や MSC といった細胞治療に加え、合成、大量生産が比較的安価な核酸医薬が脚光を浴びると考えられている。microRNA (miRNA) は、アンチセンス医薬、人工核酸と異なり、本来生体内に備わった自然の RNA 干渉機構であり、治療応用が期待される一方で、RNase 耐性や目的臓器への delivery の問題など、超えなければならない問題もある。

2. 研究の目的

(1) miRNA が TLR の制御因子として有効に作用するかどうか、バイオインフォマティクスを用いて、複数の候補となる miRNA を選定し、効果を比較、選定する。

(2) 適切なドラッグデリバリーシステム (DDS) を確立し、生体内での臓器間の分布を評価する。

(3) マウスにおいて polymicrobial sepsis のモデルである盲腸結紮穿孔 (cecum ligation and puncture; CLP) により敗血症を惹起し、miRNA による治療効果を、生存率、臓器障害、サイトカイン産生のレベルにおいて評価を行う。

3. 研究の方法

(1) TLR シグナルを負に制御する miRNA の探索

in vitro において、TLR/NF- κ B 経路を阻害する各種 miRNA を RAW264.7 細胞に transfection した後、1mg/ml の Lipopolysaccharide (LPS) にて刺激を行ない、蛋白及び遺伝子発現等の解析を行う。

(2) 治療的 miRNA 発現プラスミドの投与と CLP モデルでの治療効果判定

in vivo において、polyethyleneimine (PEI) を DDS として用い、(1) で選定した治療的 miRNA 発現 plasmid を、10-12 週齢の雄性 C57BL/6 マウスに経静脈投与する。Plasmid 投与 7 日目に、CLP により敗血症を誘導し、生命予後、臓器障害の重症度の解析を行う。

(3) 投与した miRNA 発現 Plasmid の生体内分布

Enhanced green fluorescence protein (EGFP) をコードした miRNA 発現 plasmid を投与し、臓器の組織切片で体内分布を捉えるとともに、*ex vivo* imaging を用いて、網羅的な解析を行う。また、より詳細な評価として、細胞表面マーカーを用いて特定の細胞の選択的抽出を行い、取り込まれた細胞の種類を特定する。

4. 研究成果

(1) *in vitro* における、各種 miRNA の LPS 刺激に対する効果

TLR/NF- κ B 経路を抑制し得る miRNA を選択し、miR-16、miR-126、miR-146a、miR-200b または miRNA の scramble control を transfection した RAW264.7 細胞を LPS で刺激した。miR-146a 導入群において、最も interleukin-6 (IL-6) 及び tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) の産生が抑制された (図 1)。miR-146a は細胞内において、Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK-1) と tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) の抑制を介して、NF- κ B の転写活性を抑制していた。 (図 2)

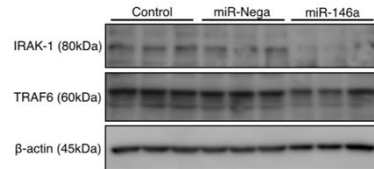


図 2

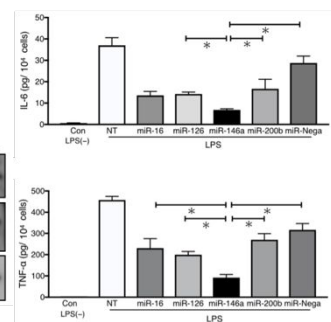


図 1

(2) miR-146a 発現 plasmid による敗血症抑制効果

miR-146a 発現 plasmid または empty plasmid と PEI の混合物をマウスに経尾静脈投与し、CLP によって敗血症を誘導した。miR-146a 発現 plasmid 投与群で生存率の改善を認め (図 3)。また、臓器障害の評価については、同群における CLP24 時間後の血清において blood urea nitrogen、creatinine、aspartate aminotransferase、alanine

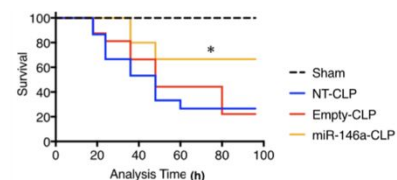


図 3

aminotransferase、lactate dehydrogenase の有意な抑制を認めた。また、同群において CLP24 時間後の IL-6、TNF- α 、monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) の有意な抑制を認めた。

(3) plasmid/PEI の臓器分布

ex vivo imaging において、投与された miR-146a/PEI 混合物は主に脾臓と肝臓への分布を認めた。各臓器の免疫染色において、EGFP 陽性細胞は脾臓において他臓器より有意に多く認められた。また、脾臓組織の免疫染色において、単球系マーカー CD68 と EGFP の共局在を認めた。さらに miR-146a 発現 plasmid 投与群において、F4/80 陽性細胞での miR-146a の発現亢進と EGFP の発現を認めた(図 4)。Empty plasmid 投与群では F4/80 陽性細胞において EGFP の発現は認められたが、miR-146a 発現亢進は認めなかった。

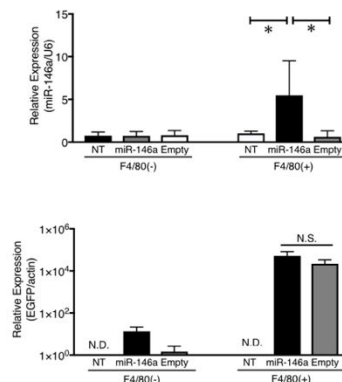


図 4

(4) 脾臓における炎症及び apoptosis

miR-146a 発現 plasmid 投与群の脾臓において、CLP24 時間後の IL-6 発現と、CLP6 時間後の NF- κ B 活性の抑制を認めた。また、apoptosis の評価として CLP24 時間後に脾臓の cleaved caspase-3 免疫染色及び TdT-mediated dUTP nick and label (TUNEL) 染色を行なったところ、miR-146a 発現 plasmid 投与群において cleaved caspase-3 陽性細胞及び TUNEL 陽性細胞数の有意な低下を認めた。

(5) 腎臓における炎症及び組織障害

CLP24 時間後の腎臓組織は、miR-146a 発現 plasmid 投与群において尿細管障害の抑制、尿細管における neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) 発現の抑制、Ly6B 陽性細胞の浸潤抑制、IL-6 の発現抑制を認めた。一方、miR-146a 発現 plasmid 投与群の腎臓における miR-146a の発現亢進及び EGFP の発現は認めなかった。

(6) 脾臓摘出後 CLP マウスに対する miR-146a 発現

plasmid の効果

Plasmid 投与の 7 日前に脾臓摘出を加え、plasmid 投与 7 日後に CLP によって敗血症を誘導した。脾臓摘出が加わると、miR-146a 発現 plasmid 投与により見られた生存率改善効果、臓器障害抑制効果、炎症抑制効果は認められなかった(図 5)

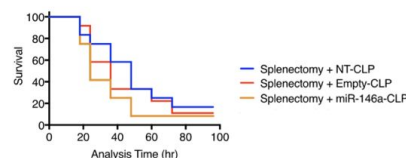


図 5

以上から脾臓マクロファージへの miR-146a 導入が敗血症病態を抑制することを示した。本研究結果により、miRNA と PEI を用いた脾臓マクロファージをターゲットとした敗血症治療の可能性を示した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

1. Funahashi Y, Kato N, Masuda T, Nishio F, Kitai H, Ishimoto T, Kosugi T, Tsuboi N, Matsuda N, Maruyama S, Kadomatsu K. miR-146a targeted to splenic macrophages prevents sepsis-induced multiple organ injury. *Lab Invest*. 2019 Jan 30 doi: 10.1038/s41374-019-0190-4. 査読あり

[学会発表](計 4 件)

1. Funahashi Y, Kato N, Kadomatsu K, Maruyama S. miR-146a Targeting the Splenic Macrophages Prevents Sepsis-Induced Acute Kidney Injury. *41st Annual Conference on Shock*. AZ USA. Jun 10, 2018
2. Funahashi Y, Kato N, Kitai H, Ishimoto T, Kosugi T, Tsuboi N, Maruyama S, Kadomatsu K. miR-146a targeting the splenic macrophages prevents sepsis-induced acute kidney injury. *ISN Frontiers Meeting*. Feb 23, 2018
3. Funahashi Y, Kato N, Kitai H, Ishimoto T, Kosugi T, Tsuboi N, Maruyama S, Kadomatsu K. INDUCTION OF IMMUNOSUPPRESSIVE MICRO-RNA IN SPLEEN ATTENUATES SEPSIS INDUCED ACUTE KIDNEY INJURY. *54th ERA-EDTA Congress*. Jun 5. 2017
4. 船橋 嘉夫、加藤 規利、西尾 文利、丸山 彰一 microRNA を用いた敗血症性 AKI の進展抑制、第 60 回日本腎臓学会学術総会 5/28/2017

[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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：丸山 彰一

ローマ字氏名：(Maruyama Shoichi)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号：10362253

研究分担者氏名：小杉 智規

ローマ字氏名：(Kosugi Tomoki)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学系研究科

職名：講師

研究者番号：90584681

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：西尾 文利

ローマ字氏名：(Nishio Fumitoshi)

研究協力者氏名：船橋 嘉夫

ローマ字氏名：(Funahashi Yoshio)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。