

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10186

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Role of miR-21 in chronic lung disease

研究代表者

郷 勇人 (Hayato, Go)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：30443857

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)：血清Extracellular vesicles (EVs)中のmiRNAを抽出し、miRNA アレイ解析を施行した結果、62個のmiRNAがCLDもしくは非CLD児の全ての児において発現していた。これらのmiRNAのうち、serum EVs miR-21の発現は、出生時は低いものの、生後28日で上昇していたため、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。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た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、miR-21が新生児慢性肺疾患のバイオマーカーになり得ることを示し、さらに動物実験ではmiR-21を制御することでCLDマウスの呼吸機能が改善していたため、miR-21が新生児慢性肺疾患の治療標的となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Serum EVs were extracted from premature infants at birth and on the 28th day of life (DOL). Using a human miRNA array, we identified 62 miRNAs that were universally expressed in CLD patients and non-CLD patients. Of these miRNAs, serum EV miR-21 was upregulated in CLD patients on DOL28 compared with levels at birth and downregulated in non-CLD patients on DOL28 compared with levels at birth. We conclude that EV miR-21 may be a biomarker of CLD. In CLD mouse model exposed to hyperoxia, pulmonary function in mice after injection of miR-21 inhibitor was improved. This suggests that miR-21 could be a potential therapeutic target for CLD.

研究分野：新生児慢性肺疾患

キーワード：新生児慢性肺疾患 Extracellular vesicles Exosome microRNA miR-21

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

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。

## 2. 研究の目的

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。

## 3. 研究の方法

### 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。

#### 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250 $\mu$ l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

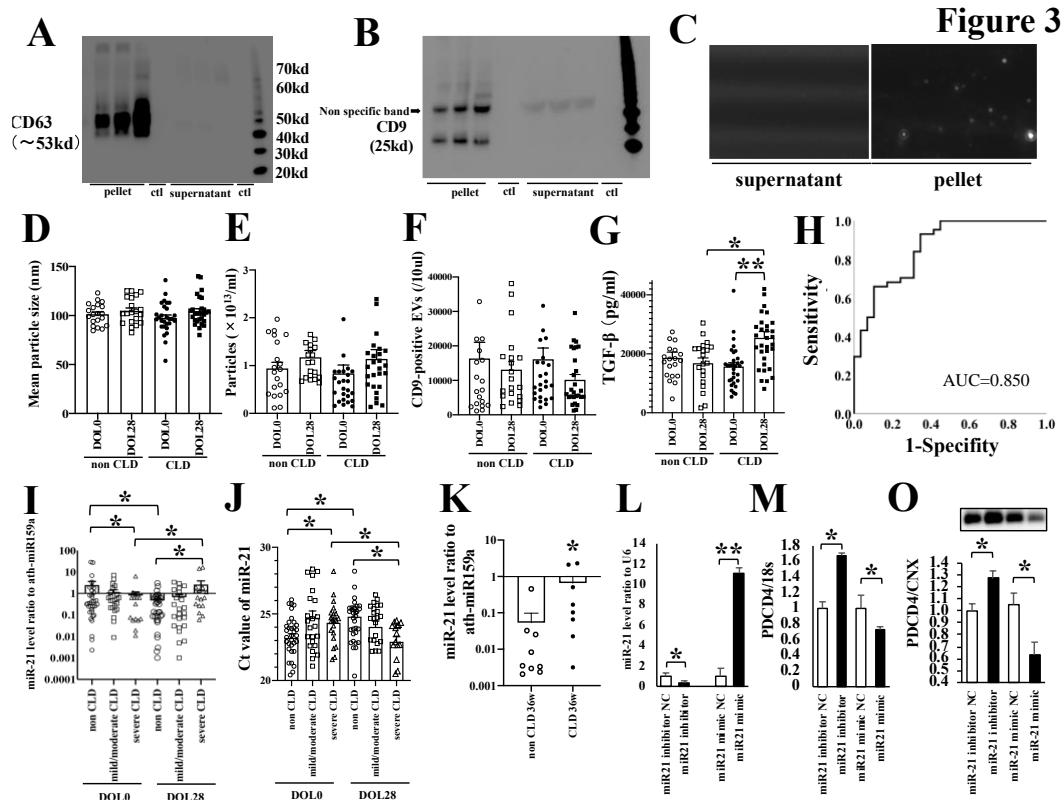
(Nanosight社) で、粒子数、粒子径を測定し、ウェスタンブロットでエクソソームが抽出されているか確認する。

### 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。

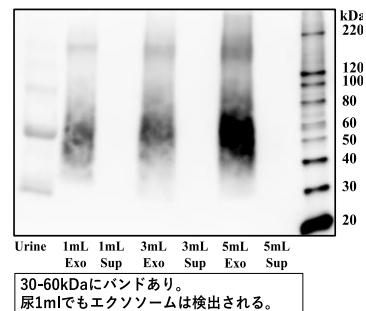
## 4. 研究成果

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(Figure 3 A-C)。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 の高感度に重症度を予測することがわかった (Figure 3 H)。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 (Figure 3 D-F)。A549cell を用いて、miR-21 がアポトーシスに関わる Programed 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 3 L-O)。



1. エクソソームを検出できるかをウェスタンブロットで検証した。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 (右図)。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



2. CLD モデルマウスの実験では、日齢 14 では miR-21inhibitor 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。

3. 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 PDCD4 が上昇していた。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 (Figure 2)。
4. 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  $26.0 \pm 0.6\text{g}$ 、 $25.8 \pm 0.4\text{g}$  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  $21.1 \pm 0.7\text{g}$ 、WT で  $21.5 \pm 0.4\text{g}$  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。
5. 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( $6.2\text{g} \pm 0.3\text{g}$  vs  $5.8\text{g} \pm 0.2\text{g}$ )が有意に増加し、分時換気量( $21.3 \pm 0.9\text{ml}$  vs  $18.2 \pm 1.2\text{ml}$ )、呼吸数( $361 \pm 21$  bpm vs  $314 \pm 11$  bpm)ともに改善していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hayato Go,1 Hajime Maeda,1 Kyohei Miyazaki, Ryo Maeda, Yohei Kume, Fumihiko Namba, Nobuo Momoi, Koichi Hashimoto, Satoru Otsuru, Yukihiro Kawasaki, Mitsuaki Hosoya, and Phyllis A Dennery.	4. 巻 318
2. 論文標題 Extracellular vesicle miRNA-21 is a potential biomarker for predicting chronic lung disease in premature infants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol	6. 最初と最後の頁 L845-851
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Go H, Ohto H, Nollet KE, Takano S, Kashiwabara N, Chishiki M, Maeda H, Imamura T, Kawasaki Y, Momoi N, Hosoya M.	4. 巻 90
2. 論文標題 Using Platelet Parameters to Anticipate Morbidity and Mortality Among Preterm Neonates: A Retrospective Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Pediatr.	6. 最初と最後の頁 90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.3389/fped.2020.00090. eCollection 2020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	桃井 伸緒  (Momoi Nobuo)  (10285033)	福島県立医科大学・医学部・教授   (21601)	
研究分担者	橋本 浩一  (Hashimoto Koichi)  (50322342)	福島県立医科大学・医学部・准教授   (21601)	