

令和 4 年 10 月 24 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16593

研究課題名（和文）血管新生能が高いマウスで発現する細胞外microRNAを用いた血管新生治療法開発

研究課題名（英文）Development of angiogenesis therapy by microRNA expressed in mice with angiogenic ability

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） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：血管新生能が高いマウスおよび血管新生能が低いマウスの下肢虚血モデルの比較解析から、血管新生能が高いマウスの血液中のエクソソームに内包されているmicroRNAには、血管新生能が高いmicroRNAが内包されている可能性が示唆された。血管新生能が高いmicroRNAは、治療薬として、下肢虚血組織に投与することで、血管新生を誘導する可能性が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、血管新生能が高いマウスのエクソソームに内包されている複数のmicroRNAは、血管新生能が低いマウスを用いた下肢虚血モデルの血流を改善したことから、microRNAは核酸医薬としての可能性があることを示唆した結果である。

研究成果の概要（英文）：MicroRNAs involved into exosome from mice with angiogenic ability might have high angiogenic ability from comparative analysis of microRNAs based on difference of angiogenic ability in mice.

研究分野：microRNA

キーワード：microRNA 血管新生 エクソソーム

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

1. 研究開始当初の背景

70歳以上の15~20%は末梢動脈疾患 peripheral arterial disease (PAD) を患っているとされており、推定 PAD 患者は全世界で2億人以上と推定される。PAD 患者の1~3%は重症下肢虚血 critical limb ischemia (CLI) であり、治療の第一選択はステントを使用した血管内治療やバイパス手術であるが、症例によっては、それらの血行再建手術を実施できない患者も存在する。また、手術が成功しても、末梢循環疾患が改善されない症例も存在する。閉塞性動脈硬化による潰瘍や壊疽を有する CLI 患者においては、虚血部位の血流を改善させない限り肢切断は免れない。血管内治療や外科的バイパス手術などの血行再建術が不成功あるいは不可能な場合に、血管新生を誘導する細胞移植療法が有効であるが、それでも虚血部位の十分な血流改善に至らない症例が残存するのが現状である。CLI 患者の5年生存率は約45%、10年生存率は約10%である。虚血領域において血管新生を促す革新的な血管新生治療法の開発が望まれる。

これまでに報告されたマウスの下肢虚血モデルにおいて、血管新生能が高いマウスの下肢虚血の大腿部の筋肉組織において上昇するが、血管新生能が低いマウスの下肢虚血の大腿部の筋肉組織では発現が変化しない、microRNA が報告されている。また、microRNA ノックアウトマウスの下肢虚血モデルにおいて、虚血筋肉組織の microRNA の発現解析から、血管新生を抑制する microRNA が報告されている。

これらの既報は下肢虚血モデルにおける虚血筋肉組織の microRNA に関する研究であり、下肢虚血モデルの血液中のエクソソームに含有された細胞外 microRNA に注目した研究は報告されていない。

2. 研究の目的

研究代表者は、これまでに、エクソソームに含有されている細胞外 microRNA の解析から、microRNA-762 と microRNA-3072-5p が血液中の VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor ; 血管内皮細胞増殖因子) の濃度変化を制御することを報告した (Scientific Reports 2016 in press)。研究代表者は血管新生能が高いマウスと血管新生能が低いマウスの下肢虚血モデルにおいて、エクソソームに含有されている細胞外 microRNA の発現を比較解析することで、下肢虚血後の血管新生能が高いマウスで特異的に発現している細胞外 microRNA は血管新生能を有するのではないかと仮説を立てた。

3. 研究の方法

(1) 血管新生能が高い microRNA 候補の探索

血管新生能が高いマウスと血管新生能が低いマウスの左大腿動静脈結紮した24時間後に、腹部大静脈から採血し、血漿を作製した。次に、その血漿中のエクソソームの microRNA を、Total Exosome Isolation Kit (from plasma) (Thermo Fisher Scientific 社) と Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて抽出した。そして、microRNA の発現は、東レに委託して miRNA Oligo chip で解析された。

(2) 血管新生能評価

microRNA を発現するプラスミドは pmR-mCherry Vector (タカラバイオ社) を用いて作製した。293T 細胞に、microRNA を発現するプラスミドを導入して72時間後に、細胞から分泌されエクソソームを Total Exosome Isolation Reagent (Thermo Fisher Scientific 社) で回収した。この microRNA を内包するエクソソームを血管新生能が低いマウスの大腿動脈を用いた Aortic ring アッセイに用いて、血管形成能が評価された。

(3) 下肢虚血モデルに対する血流評価

血管新生能が低いマウスの左大腿動静脈結紮した1日後に、microRNA を内包するエクソソームが筋注で投与された。また、左大腿動静脈結紮した1日後および15日後に、健側肢と虚血肢の血流がドップラーを用いて評価された。

4. 研究成果

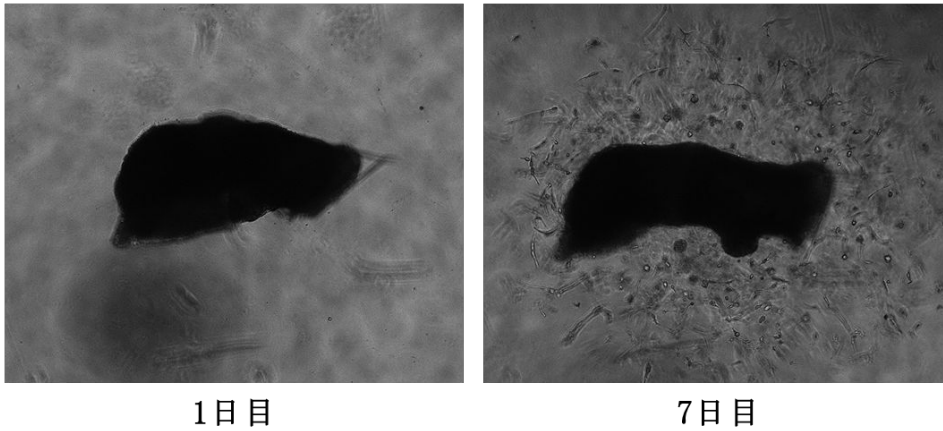
(1) 血管新生能が高い microRNA 候補の同定

血管新生能が高いマウスと血管新生能が低いマウスの下肢虚血モデルにおいて、エクソソームに含有されている細胞外 microRNA のアレイ解析から、研究代表者は、血管新生能が高いマウスに特異的に発現している31個の microRNA と、血管新生能が低いマウスと比較して発現レベルが20倍以上となった12個の microRNA を同定し、この43個を血管新生能が高い microRNA 候補とした。

(2) 血管新生能評価

4.(1) で同定した43個の血管新生能が高い microRNA を内包する43種のエクソソーム、empty ベクターで作製したコントロールとなるエクソソームと BALB/c マウスの大腿動脈を用いた Aortic ring アッセイを行い、どの microRNA を内包するエクソソームが、血管新生能が低いマウスの大腿動脈から新生血管を誘導することが出来るか否かを顕微鏡で観察した。本実験は、独立に3回実験を実施し、1回でも新生血管を誘導することができた microRNA を、血管新生能が高い microRNA として評価した。本実験では、14個の microRNA を内包するエクソソームが、血管新生能が低いマウスの大腿動脈から新生血管を誘導する結果を得た(表2)。図1は、本実験において代表的結果であり、大腿動脈から新生血管が観察された。

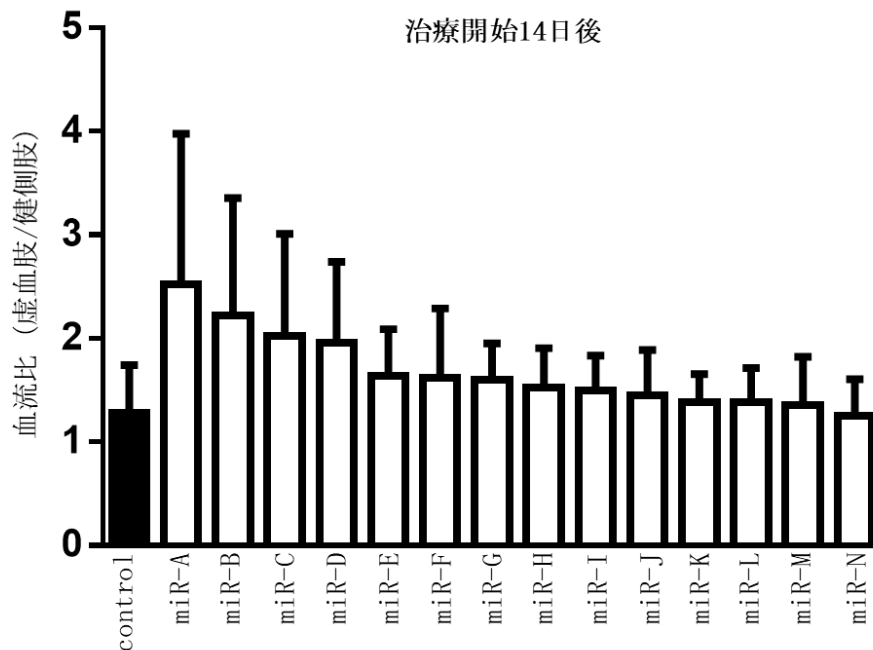
図1 Aortic ring アッセイによる代表的な結果



(3) 下肢虚血モデルに対する血流評価

14個のmicroRNAを内包しているエクソソーム、および、emptyベクターで作製したコントロールとなるエクソソームを、血管新生能が低いマウスを用いた下肢虚血モデルに対して筋注投与して14日後に、ドップラーで下肢の血流を評価した(図2)。各microRNAに対する1群のマウスは6匹で評価した。miR-Aを内包したエクソソームが最も高い血流改善効果を認めた結果であった。

図2 下肢虚血マウスに対するmicroRNA内包エクソソームの投与の治療効果



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計11件)

Mizoguchi T, Ueno K, Takeuchi Y, Samura M, Suzuki R, Murata T, Hosoyama T, Morikage N, Hamano K. Treatment of cutaneous ulcers with multilayered mixed sheets of autologous fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells. *Cell.Physiol.Biochem.* 2018;47:201-211. doi: 10.1159/000489767. 査読有

Mizoguchi T, Ueno K, Yanagihara M, Samura M, Kurazumi H, Suzuki R, Morikage N, Hamano K. Autologous fibroblasts, peripheral blood mononuclear cells, and fibrin glue accelerate healing of refractory cutaneous ulcers in diabetic mice. *Am J Transl Res.* 2018;10:2920-2928. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6176242/> 査読有

Suehiro Y, Takemoto Y, Nishimoto A, Ueno K, Shirasawa B, Tanaka T, Kugimiya N, Suga A, Harada E, Hamano K. Dcl1k1 Inhibition Cancels 5-FU-induced Cell-cycle Arrest and Decreases Cell Survival in Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2018;38:6225-6230.

doi: 10.21873/anticanres.12977. 査読有
Nishioka M, Suehiro Y, Sakai K, Matsumoto T, Okayama N, Mizuno H, Ueno K, Suzuki N, Hashimoto S, Takami T, Hazama S, Nagano H, Sakaida I, Yamasaki T. TROY is a promising prognostic biomarker in patients with colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2018; 15:5989-5994. doi: 10.3892/ol.2018.8079. 査読有
Kawamura D, Takemoto Y, Nishimoto A, Ueno K, Hosoyama T, Shirasawa B, Tanaka T, Kugimiya N, Harada E, Hamano K. Enhancement of cytotoxic effects of gemcitabine by Dcl1 inhibition through suppression of Chk1 phosphorylation in human pancreatic cancer cells. *Oncol Rep*. 2017;38:3238-3244. doi: 10.3892/or.2017.5974. 査読有
Hosoyama T, Ichida S, Kanno M, Ishihara R, Hatashima T, Ueno K, Hamano K. Microgravity influences maintenance of the human muscle stem/progenitor cell pool. *BBRC*. 2017; 493:998-1003. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.09.103. 査読有
Takeuchi Y, Ueno K, Mizoguchi T, Samura M, Harada T, Oga A, Murata T, Hosoyama T, Morikage N, Hamano K. Development of Novel Mouse Model of Ulcers Induced by Implantation of Magnets. *Sci Rep*. 2017;7:4843. doi: 10.1038/s41598-017-05250-y. 査読有
Nakamura T, Hosoyama T, Murakami J, Samura M, Ueno K, Kurazumi H, Suzuki R, Mikamo A, Hamano K. Age-related increase in Wnt inhibitor causes a senescence-like phenotype in human cardiac stem cells. *BBRC*. 2017;487:653-659. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.110. 査読有
Takeuchi Y, Ueno K, Mizoguchi T, Samura M, Harada T, Oga A, Murata T, Hosoyama T, Morikage N, Hamano K. Ulcer Healing Effect of Autologous Mixed Sheets Consisting of Fibroblasts and Peripheral Blood Mononuclear Cells in Rabbit Ischemic Hind Limb. *Am J Transl Res*. 2017;9:2340-2351. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5446516/> 査読有
Tanaka Y, Hosoyama T, Mikamo A, Kurazumi H, Nishimoto A, Ueno K, Shirasawa B, Hamano K. Hypoxic preconditioning of human cardiosphere-derived cell sheets enhances cellular functions via activation of the PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 pathway. *Am J Transl Res*. 2017;9:664-673. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5340701/> 査読有
Samura M, Hosoyama T, Takeuchi Y, Ueno K, Morikage N, Hamano K. Therapeutic strategies for cell-based neovascularization in critical limb ischemia. *J Transl Med*. 2017; 15:49. doi: 10.1186/s12967-017-1153-4. 査読有

〔学会発表〕(計3件)

Koji Ueno, Takahiro Mizoguchi, Akira Fujita, Makoto Samura, Kimikazu Hamano. Development of a Simple Method for Human Fibroblast Multi-Layers in Refractory Cutaneous Ulcers. 5th TERMIS World Congress, 2018
上野耕司、溝口高弘、藤田陽、佐村誠、濱野公一、難治性皮膚潰瘍に対する積層化細胞シート作製の基礎的検証、第17回日本再生医療学会総会、2018
上野耕司、溝口高弘、藤田陽、佐村誠、濱野公一、難治性皮膚潰瘍に対する細胞シートから分泌されるエクソソームはbFGFを内包している、第9回日本RNAi研究会、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〕
なし

6．研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

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。