

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：35309

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15869

研究課題名(和文) 遠隔虚血プレコンディショニングによるmicroRNAを介した心筋保護の機序解明

研究課題名(英文) The role of remote ischemic preconditioning in myocardial protection.

研究代表者

大野 佑子 (Ohno, Yuko)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・助教

研究者番号：70813872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：心筋の虚血再灌流障害において、RIPCによって増加したmicroRNAが心筋保護に関与するという報告がされているが、本研究では、虚血再灌流障害に対するRIPCの心筋保護効果の機序の解明を行った。特に、細胞が分泌するエクソソーム内に含まれるmicroRNAに着目し、ヒト検体と動物実験の両方から検討を行った。RIPC前後で血液から分離したエクソソーム内のmicroRNAが明らかに変化することが明らかとなり、ヒトとラットの両方で共通して変化しているmicroRNAを絞り込むことができた。そこからmRNAとの関連も踏まえてさらにターゲットを絞り込むことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最終的なターゲットまで絞り込めれば、虚血性心疾患の治療後の虚血再灌流障害に対して、従来の個々の遺伝子をターゲットとした治療戦略にも応用できるだけでなく、microRNAをターゲットとした新しい治療戦略を提供できる可能性がある。また、治療応用の観点ではmicroRNAを封入したnanoparticleを利用した、新規のドラッグデリバリーシステムの開発に応用できる。さらに心筋保護のみならず、移植医療での摘出臓器の虚血からの保護や脳梗塞急性期の再灌流障害に対しても応用させ、幅広い分野での新たな治療法を提供できる可能性もある。

研究成果の概要(英文)：A report that microRNA which increased participates in myocardium protection is done by RIPC in the ischemic myocardium disorder to reperfuse. In this study, We elucidated the mechanism of the myocardium protection effect of RIPC on ischemic obstacle to reperfuse. Particularly, I paid my attention to microRNA included within the exosome and considered from both human specimen and animal experiment. It was revealed that microRNA in the discrete exosome dragged a change from blood clearly in approximately RIPC and was able to narrow down microRNA which was common in both rat with Human, and changed. I was based on the connection with the mRNA from there and was able to narrow down a target more.

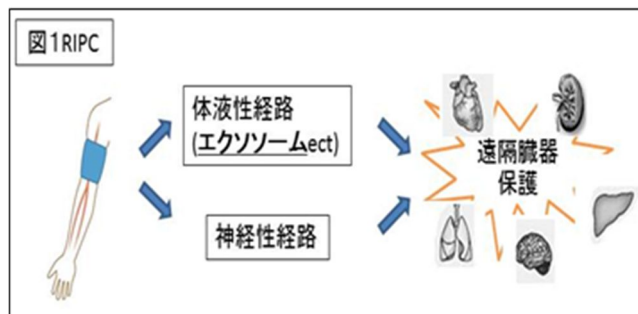
研究分野：虚血再灌流障害の予防・治療

キーワード：遠隔虚血プレコンディショニング 虚血性心疾患

### 1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患は悪性新生物、脳血管障害にならぶ3大死因の一つである。虚血性心疾患の予防、治療法の開発は重要な課題である。現在では虚血性心疾患に対する急性期治療として血栓溶解法やカテーテル治療などの再灌流療法が普及している。しかし、虚血再灌流障害により治療後の心筋梗塞や心不全により予後が不良になる例も数多くあり、虚血再灌流障害抑制を目的とした治療法の開発は不可欠である。

近年、さまざまな臨床の領域において虚血再灌流障害に対する遠隔虚血プレコンディショニング(RIPC)の関与が注目されている。RIPCは上腕もしくは下肢を駆血帯にて5分間駆血し、その後5分開放する。それを3回繰り返す手技である。これまでの報告ではRIPCを行うことにより、心筋のみならず、脳、肺、肝臓や腎臓での再灌流障害に対し



ても保護効果があることも明らかとなっている(図1)。しかし、RIPCの基礎的機序は未だ十分明らかではない。近年、RIPCによる虚血再灌流障害に対する効果が消滅したという報告がなされた(J mol Cell Cardiol. 2014 Mar;68:75-8.)。細胞が分泌するエクソソームはmicroRNAを多く含んでおり、遠隔臓器の細胞に作用して、遺伝子発現レベルの調製を行うことができる。このことからRIPC後の心筋保護の作用にはエクソソーム内のmicroRNAの関与が示唆される。

### 2. 研究の目的

国外の動物実験では、RIPCによってエクソソーム分泌が促進され、そのエクソソームを虚血再灌流障害モデルのドナーラットに還流させると、心筋梗塞サイズが縮小するという報告がなされた。このことにより、エクソソームがRIPCによる虚血臓器の保護にかかわっていることが示唆される。しかし、どのような機序で臓器保護に作用しているかはいまだ不明である。本研究ではこのエクソソームの量的変化を調べ、さらにエクソソーム内のmicroRNAの変化を検討し、RIPCによるエクソソーム-microRNAネットワークを介した虚血再灌流障害に対する心筋保護の分子機序を明らかにする。

### 3. 研究の方法

具体的には以下の3つの項目に分けて検討する。

#### (1) ヒト、ラットのRIPC前後の血清中のエクソソームの質的・量的変化の解明

ラットに対してRIPCを行う。RIPCの方法としては、1肢をバンドにて5分間完全虚血とした後、5分間開放する。これを3回繰り返す。RIPC前後に採取した血清からエクソソームを抽出し、その中のmicroRNAを精製後、量的・質的变化を解析する。マウスの血清からエクソソームの分離を行いwestern blottingにて確認する。さらにマイクロアレイを用いて、RIPC施行前後のラット由来エクソソーム内のmicroRNA発現プロファイルの比較、クラスター解析をおこなう。ヒトでも同様にRIPC前後で採取したエクソソーム内のmicroRNAアレイを行い、ピックアップしたmicroRNAと同じ、または近いmicroRNAに変化があるか検討する。まず、炎症、アポトーシス、酸化ストレスなどに関連するmicroRNAを中心に検討を進め、標的遺伝子の絞り込みを行っていく。

#### (2) マイクロRNAにより制御される遺伝子ネットワークの解明

まず、前の実験において、候補としたmicroRNAについてTargetScan TargetScan、Pictar、miRDBなどのサイトでターゲット候補となる遺伝子(mRNA)をピックアップする。次に、マウスにおいてRIPCの前後で心臓で変化するmRNAのアレイ解析を行う。ターゲットと予測される遺伝子についてmRNAのアレイデータと照合して、発現関係がmicroRNAとmRNAで逆となっている遺伝子候補をピックアップする。さらにその中から虚血再灌流障害に直接影響を与えている可能性のあるものにターゲットを絞り込み、役割について検討する。

#### (3) 心筋虚血再灌流モデルラットでの候補マイクロRNA導入による治療効果の検討

ラットの左前下行枝を短時間結紮し、その後開放して虚血再灌流障害による心筋障害を誘導させる。RIPC後に採取したエクソソームを、この心筋虚血再灌流障害モデルのマウスに投与し、エクソソームが与える心筋障害への影響を検討する。その後、上記1)2)で検討を行ったmicroRNAのmicroRNA mimicを用いて目的のmicroRNAの関与を証明する。またmicroRNA inhibitorでターゲットmicroRNAの活性を阻害し、前の実験で見られた心筋保護の効果が抑制されるか確認する。mimicでの導入がうまくいかなかった場合、ウイルスベクターを用いた導入も検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 第一にラットに対してRIPC前後の血清内のエクソソームを抽出し、その中に含まれるmicroRNAについてアレイ解析を行った。RIPC施行後に顕著に増加しているmicroRNAの中から学術的にも有用だと考えられる、mmu-miR-25-5p、mmu-miR-23b-3p、mmu-miR-27b-3p、mmu-miR-133a-3p、mmu-miR-205-5p、mmu-miR-99a-3pをピックアップした。ヒトでも同様の実験を行い、ピックアップしたmicroRNAと同じ、または近しいmicroRNAに変化があるか検討した(図2)。この結果からmicroRNAをさらに絞り込み、miR-25-5pとmiR-99a-3pについて細胞実験で効果を確認することとした。まず細胞に過酸化酸素を用いてアポトーシスを起こさせ、それを抑制する効果があるか検討したが、この2つについては明らかな効果は見られず、他のmicroRNAについても検討を行っていく予定である。

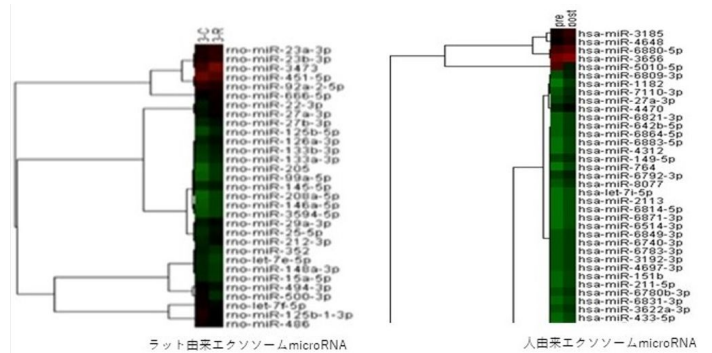


図2 RIPC前後のエクソソーム内microRNAアレイのクラスタ解析

(2) 同時に前の実験で候補としたmicroRNAについてTargetScanをもちいてターゲット候補となる遺伝子(mRNA)をピックアップした。マウスにおいてRIPCの前後で心臓において変化するmRNAのアレイ解析を行った。これらから得られたターゲットについて、in vivoでの実験を継続して行っており、その生態での効果を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------