

令和 2 年 4 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15943

研究課題名(和文)肺と他臓器のエクソソームによる相互コミュニケーションに着目したCOPD病態の解明

研究課題名(英文)The role of exosomes for the pathogenesis of COPD

研究代表者

牧口 友紀(Makiguchi, Tomonori)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：60815843

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): COPD患者由来肺線維芽細胞エクソソームを蛍光色素(PKH-67)によるラベリングを実施、取り込みを解析したところ、COPD患者由来肺線維芽細胞エクソソームはヒト上皮細胞に有意に取り込まれることが判明した。COPD患者血清エクソソームの解析では頻回増悪群にて減少している、microRNAとして、hsa-miR-524-3pなどの7つのmicroRNAが抽出された。一方、頻回増悪群にて上昇しているmicroRNAとして、hsa-miR-100-5p、hsa-miR-1911-3p、hsa-miR-6764-5pなどの31種のmicroRNAが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COPD患者血清エクソソームの解析では頻回増悪群にて減少している、microRNAとして、hsa-miR-524-3pなどの7つのmicroRNAが抽出された。一方、頻回増悪群にて上昇しているmicroRNAとして、hsa-miR-100-5p、hsa-miR-1911-3p、hsa-miR-6764-5pなどの31種のmicroRNAが低下していることが判明した。これらのエクソソームmicroRNAの解析によりCOPDの新規病態の解明につながり、かつ新規治療法の開発基礎につながる成果を得ることができた。

研究成果の概要(英文): We isolated the exosomes from lung fibroblasts of COPD patients and labelled the exosomes with PKH-67. We then performed the administration of the labelled exosomes onto cultured human lung bronchial epithelial cells. We found the incorporation of the labelled exosomes into the cells. We also performed the analysis of microRNAs in the exosomes from the sera of COPD patients with or without the history of frequent exacerbation. We found that the microRNAs including hsa-miR-524-3p were significantly decreased in the COPD patients with frequent exacerbation, whereas the microRNAs including hsa-miR-100-5p, hsa-miR-1911-3p, hsa-miR-6764-5p were increased.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：COPD

1. 研究開始当初の背景

細胞外小胞エクソソーム(exosome)は細胞内の小胞構造体である多胞性エンドソームに由来する分泌膜小胞の一つであり、microRNA など様々な細胞内構成因子を含んだ形で分泌され、細胞間のメッセンジャーとして重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。最近、細胞が老化することにより、エクソソームの放出量および構成成分が変化することが報告されており(Stem Cell Res Ther 2015;6:185; Nature Commun 2017;8:15729,)、老化および老化関連疾患での役割が注目されている。

慢性閉塞性肺疾患(COPD)はタバコ煙を主とする有害物質を長期吸入によって生じる慢性進行性の呼吸器疾患であり、その病態に炎症、酸化ストレス、肺の成長異常の他、早期老化(premature senescence)が関与しているとされ、その併存症も含め老化関連疾患の一つと考えられている。一方で、COPDの予後を規定する重要因子として身体活動性が指摘されており(Chest 2011;140:331-42)、COPDの病態において肺と他臓器の相互コミュニケーションが重要であると推測されているが、そのメカニズムは解明途上の状態である。

申請者の所属する研究室では COPD と老化の関係についての研究を進めており、老化抑制因子 Growth differentiation factor 11(GDF11)が COPD 患者の肺および血漿において呼吸機能の低下、併存症の合併数と相関して低下していることを明らかにしている。COPD 患者由来の線維芽細胞は細胞老化と組織修復能の低下を認めるが、GDF11 の投与により、細胞老化と炎症性メディエーターの産生が抑制され、組織修復能も改善しており、GDF11 は COPD で見られる細胞老化に関与する可能性が示唆された(Thorax 2017;72:893)。さらに、GDF11 の産生量は肺以外の中胚葉系組織、特に筋骨格系での発現が高いことが報告されており(Cell 2013;153:828)、COPD 患者の身体活動性および骨格筋量を解析した結果、血漿 GDF11 レベルとこれらの因子の強い相関を認めた(submitted article)。このことは肺局所の病態が全身の他臓器に影響する一方、骨格筋などの他臓器より放出される因子が肺病態に影響している可能性を示唆しており、臓器間の相互コミュニケーションが COPD の病態のさらなる理解に重要であると考えられた。申請者はこれまで肺疾患におけるエクソソームの動態解析を行っており、血清エクソソーム miR-21-5p が難治性肺疾患の一つである特発性肺線維症(IPF)患者にて上昇しており、且つ、予後予測因子となることを明らかにしている(Makiguchi T et al. Respir Res 2016;17:110)。このことは、肺疾患においても血中を含めた全身のエクソソームおよび内包される microRNA が変動し病態に影響している可能性を示唆している。

今回申請者は COPD 病態における早期老化のメカニズムを解明すべく、細胞間コミュニケーションのツールであるエクソソームおよび内包 microRNA に注目し解析を行う。

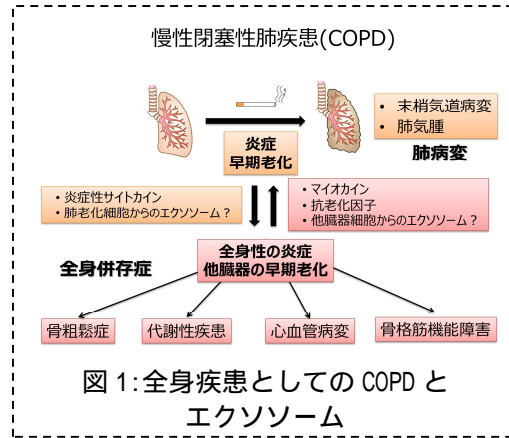


図 1: 全身疾患としての COPD とエクソソーム

2. 研究の目的

本研究では COPD 病態におけるエクソソームの動態、相互影響を解析し、役割の解明を目的とする。具体的には以下の点について解析を行う。

- (1) COPD 肺線維芽細胞(老化肺線維芽細胞)エクソソームの解析。
- (2) COPD 患者血清エクソソーム microRNA の解析。

申請者はこれまでに、血清エクソソーム miR-21-5p が難治性肺疾患の一つである特発性肺線維症(IPF)患者にて上昇しており、且つ、予後予測因子となることを明らかにしている(図 4; Makiguchi T et al. Respir Res 2016;17:110)。本研究成果により、肺疾患においても血中を含めた全身のエクソソームおよび内包される microRNA が変動し病態に影響していると推測した。今回申請者は全身疾患であり、且つ、老化関連疾患である COPD 病態の解明をすべく、肺と他臓器の相互病態形成因子としてエクソソームに着目した。肺実質細胞の中から、これまで老化細胞でのエクソソーム変容が報告されている間葉系細胞である肺線維芽細胞に、他臓器の細胞として、身体活動性が COPD の重要予後因子であることを考慮し、骨格筋細胞に焦点を当て、新規治療戦略の端緒となる新しい COPD 病態解明を目指す。

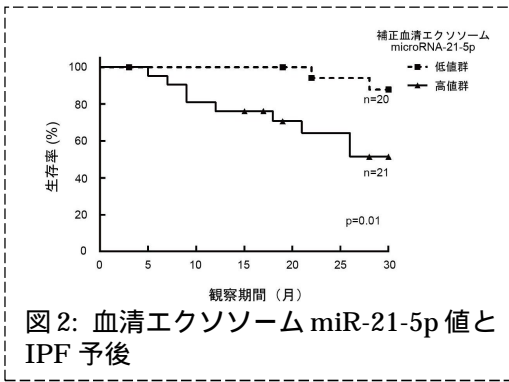


図 2: 血清エクソソーム miR-21-5p 値と IPF 予後

COPD を含めた肺疾患にて、肺線維芽細胞由来エクソソームおよび骨格筋細胞由来エクソソームに着目し、肺および骨格筋の相互作用の点から、COPD 病態を解明・解析した研究は行われておらず、独創的かつ新規性のある研究である。エクソソームは細胞間相互作用としての働き

胞恒常性にも重要であることが報告されており、老化及び老化関連疾患における働きが注目を集め始めており、本研究は COPD の病態さらなる理解とそれに基づく新規治療法開発につながる研究となる可能性が十分にあると考えられた。

3. 研究の方法

(1) COPD 肺線維芽細胞(老化肺線維芽細胞)エクソソームの解析

COPD 患者の肺癌手術肺検体から非癌部分肺組織を取り出し、分離培養した肺線維芽細胞(老化肺線維芽細胞) (Thorax 2017;72:893)の培養上清中のエクソソームを超速心法にて回収する。回収したエクソソームを蛍光色素にてラベリングし、培養気道上皮細胞に投与する。培養上皮細胞への取り込み、及び培養上皮細胞の形態学的変化を観察する。

(2) COPD 患者血清エクソソーム microRNA の解析

COPD 患者コホート研究にて、登録時に採取していた結成サンプルを用い、エクソソームを抽出する。COPD 患者群の中で、増悪頻回群と非頻回群に分類し、エクソソーム microRNA について、マイクロアレイによる網羅的発現解析を行い、比較検討を行う。

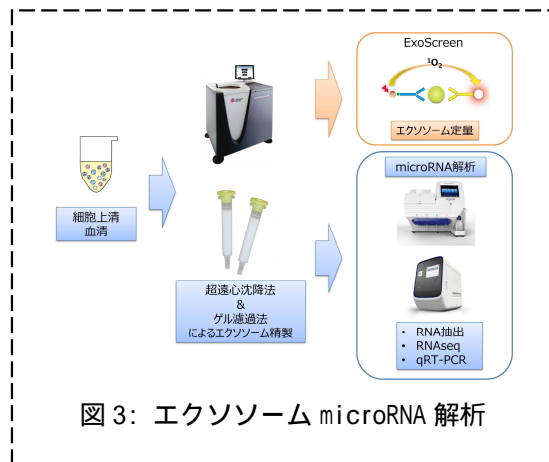


図 3: エクソソーム microRNA 解析

4. 研究成果

(1) COPD 肺線維芽細胞(老化肺線維芽細胞)エクソソームの解析

COPD 患者由来肺線維芽細胞エクソソームの分離解析を試みた。肺癌手術患者の切除肺検体から、非癌部分肺組織を切り出し、肺組織を酵素処理し得られた肺細胞より、接着様式の違いにより分離培養した初代培養肺線維芽細胞を樹立した。肺線維芽細胞はそれぞれ、非喫煙者肺癌患者、喫煙者 non-COPD 患者、および COPD 患者の肺癌手術肺検体から樹立され比較検討ができるようにした。ヒト初代培養肺線維芽細胞を通常血清含培地で培養した後、培地を無血清培地の交換し、24 時間培養、上清を回収した。上清を 0.22 μm のフィルターにてろ過した後、培養上清を超速心沈降法にてエクソソームが濃縮された浮遊液を回収した。回収した浮遊液の蛋白濃度を Qubit 蛍光光度計にて測定したあと、エクソソームの相対定量を Exoscreen 法により (Nature Commun 2014;5:3591)実施した。ヒト初代培養肺線維芽細胞にも CD9 陽性のエクソソームが含まれていることを確認した。現在、上清中に放出されるエクソソームの放出量が、非喫煙者肺癌患者、喫煙者 non-COPD 患者、および COPD 患者の肺癌手術肺検体から樹立された線維芽細胞群にて差異がないか解析中である。さらに、肺線維芽細胞由来エクソソームの生理活性がそれぞれの患者群で異なるかについて、培養ヒト気道上皮細胞に投与した。まず、分離したエクソソームを蛍光色素 (PKH-67) によるラベリングを実施、取り込みを解析したところ、COPD 患者由来肺線維芽細胞エクソソームはヒト上皮細胞に有意に取り込まれることが判明した。

(2) COPD 患者血清エクソソーム microRNA の解析

COPD 患者血清エクソソームの解析を主体として行った。2012 年 12 月から 2014 年 8 月まで登録した COPD 患者 314 人の経過を 2 年間観

察し、増悪回数について前向き調査した。この中で、増悪頻度が年 2 回以上の患者群を増悪頻回群とした。増悪頻回群 8 名と、性別、年齢、治療内容が合致した非増悪群 (増悪が年 0 回) 8 名を抽出し、血清よりエクソソームを抽出。抽出したエクソソームサンプルより RNA を抽出した。RNA サンプルの品質チェック泳動検査にて、small RNA 領域及び、抽出確認用の合成 RNA のピーク (500nt, 1000nt) を確認することができ、本サンプルの品質が確認できたので、マイクロアレイ (3D-Gene® miRNA Oligo chip) による、網羅的な microRNA 発現解析を行った。結果、頻回増悪群にて減少している、microRNA として、hsa-miR-524-3p などの 7 つの microRNA が抽出された。一方、頻回増悪群にて上昇している microRNA として、hsa-miR-100-5p, hsa-miR-1911-3p, hsa-miR-6764-5p などの 31 種の microRNA が低下していることが判明した。これらの microRNA のうち、老化や炎症制御に関与している microRNA も含まれており、今回同定された microRNA は COPD および増悪の病態に関与している可能性が示唆された。

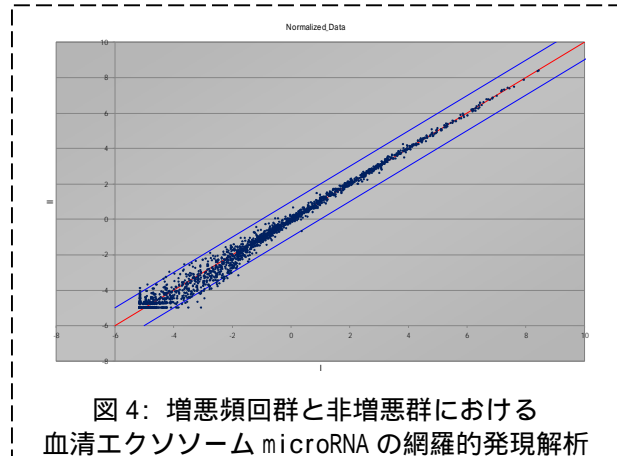


図 4: 増悪頻回群と非増悪群における血清エクソソーム microRNA の網羅的発現解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mitsuhiro Yamada, Tomonori Makiguchi, Yusuke Yoshioka, Takahiro Ochiya, Masakazu Ichinose
2. 発表標題 Serum extracellular vesicular miR-21-5p is a predictor of the prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis
3. 学会等名 the 8th Congress of the International Society for Extracellular Vesicles (ISEV2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

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