

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16394

研究課題名(和文) 虚血プレコンディショニングによる生体内アペリン分泌増加を応用した血管新生治療

研究課題名(英文) Neovascularization via increase of intrinsic apelin by ischemic preconditioning

研究代表者

佐村 誠 (SAMURA, Makoto)

山口大学・医学部附属病院・診療助教(4日/週)

研究者番号：30773402

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)：遠隔臓器虚血プレコンディショニング(RIPC)施行24時間後に血中アペリン濃度は有意に増加し、実際のアペリン投与で増加したアペリン濃度と同等であった。

アペリン上昇に關与するAngiotensin-1の発現に注目したエクソソーム中のmicroRNAの解析で、マウスにおいてはAngiotensin-1発現を誘導するmiR-126-3pの発現亢進、Angiotensin-1発現を抑制するmiR-711の発現低下が見られた。ヒトにおいては、Angiotensin-1発現を抑制するmiR-204-3pの発現低下が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管新生療法は治療困難な重症虚血肢に対する新たな治療法として注目されているが、さらなる治療効果の改善が期待されている。アペリンは新生血管成熟化を期待されたペプチドであり、血管新生療法の治療効果をさらに向上させる可能性を秘めたペプチドである。しかし未だ薬剤化が困難であることが課題であった。今回、安全に施行可能な遠隔臓器虚血プレコンディショニングにより、生体内で分泌されるアペリンが増加し、ペプチド投与と同等の効果が得られる可能性が示され、今後の血管新生療法やアペリンを用いた研究の発展に寄与しうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：After 24 hours of remote ischemic preconditioning (RIPC), the blood apelin significantly increased to the equivalent level of apelin administration.

Focusing on the expression of angiotensin-1 involved in apelin elevation, analysis of microRNAs in exosomes after RIPC revealed that miR-126-3p, which induces angiotensin-1 expression was increased and miR-711, which suppresses angiotensin-1 expression was decreased in mice. In humans, miR-204-3p, which suppresses angiotensin-1 expression was decreased by RIPC.

研究分野：血管外科

キーワード：遠隔臓器虚血プレコンディショニング アペリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、細胞移植を用いた血管再生治療の課題である「細胞生着率の低さ」と「未熟な新生血管形成による血流回復不全」を解決するため、「低酸素刺激で機能を賦活化した末梢血単核球細胞移植」と「血管成熟因子アペリンの全身投与」による新たな血管再生治療法を考案し、その有効性を検証してきた。本併用療法において、同時投与したアペリンは、低酸素プレコンディショニングを施した末梢血単核球と血管平滑筋細胞の両方に作用し、血管新生亢進のみならず、相乗効果により血管平滑筋の新生血管周囲への遊走を増加させ、新生血管の成熟を促進することを明らかにした。しかし、ヒトに投与可能な薬剤としてのアペリンは未だ開発されておらず、実臨床への導入は困難である。そこで、アペリンは内因性のペプチドであり、臓器虚血に応答し、種々の細胞・臓器から分泌される点に着目した。安全に虚血刺激を加えることのできる骨格筋の虚血プレコンディショニング(遠隔臓器虚血プレコンディショニング)により、アペリンの生体内濃度を高めることで、全身投与よりも安全に、かつ同様の治療効果が得られると考えた。

2. 研究の目的

本研究は遠隔臓器虚血プレコンディショニング(RIPC)による生体内アペリンの増加が、先行研究同様に細胞移植治療との相乗効果を発揮しうるかを検証する。さらにエクソソームに含まれる microRNA の解析を行い、そのメカニズムを検証する。

3. 研究の方法

(1)RIPC マウスモデルの作製

C57BL/6 マウスをイソフルラン麻酔下で開腹し、腸骨動脈分岐部直上の腹部大動脈を taping し、腹部大動脈遮断による 5 分間虚血と 5 分間再灌流を 3 サイクル行った (*Sci Rep.* 2016;6:36758)。イソフルラン麻酔下で開腹したマウスを対照群とした。

(2)アペリン腹腔内投与

先行研究と同様に C57BL/6 マウスにアペリンペプチド 0.1 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ の腹腔内投与を行い、アペリン投与群を作製した。

(3)血清中のアペリン濃度の測定

RIPC 施行 24 時間後(RIPC 24H)、48 時間後(RIPC 48H)にそれぞれ下大静脈から採血し、ELISA 法にてアペリン濃度を測定した。アペリン投与群は腹腔内投与 5 分後に下大静脈から採血した。

(4)マウスエクソソーム単離・microRNA 解析

RIPC 施行 24 時間後に下大静脈から採血し、Total Exosome Isolation Kit を用いてエクソソームを単離した。単離したエクソソームから Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit を用いて microRNA を単離し、miRNA Oligo chip を用いて解析した。

(5)ヒト RIPC プロトコール

上肢に血圧測定 Cuff を巻き、5 分間虚血 (200mm Hg 以上) と 5 分間再灌流を 4 サイクル行った (*Lancet.* 2009;374:1557-65)。上肢に血圧測定 Cuff を巻くのみの群を対照群とした。

(6)ヒトエクソソーム単離・microRNA 解析

マウス同様 RIPC 施行 24 時間後に血清作製用採血管を使用して血清を回収し、Total Exosome Isolation を使用してエクソソームを単離した。単離したエクソソームから Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit を用いて microRNA を単離し、miRNA Oligo chip を用いて解析した。

4. 研究成果

(1)RIPC による血中のアペリンの増加

血中アペリン濃度は対照群と比較し、RIPC 施行 24 時間後で最も有意に増加した(24 時間後 $P=0.017$ 、48 時間後 $P=0.038$)。この結果から、RIPC はアペリンの生体内濃度を高める有効な方法であることが明らかとなった。

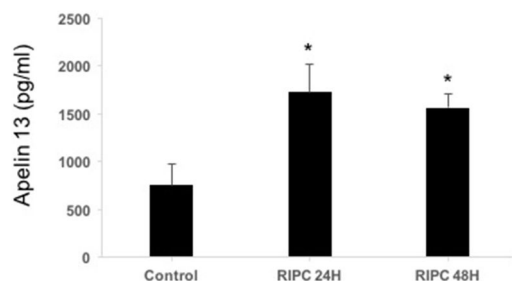


図1 マウスの血中アペリン濃度の比較

(2)RIPCによる内因性アペリンの増加とアペリン投与における血中アペリン濃度の比較

次に、RIPCで増加した内因性アペリンと実際のアペリン投与で増加したアペリン濃度を比較した。RIPC施行24時間後の血中アペリン濃度とアペリン投与直後における血中アペリン濃度は同等であった(図2)。この結果から、RIPCはアペリン投与と同等の血中アペリン濃度の上昇をもたらすことが明らかとなった。

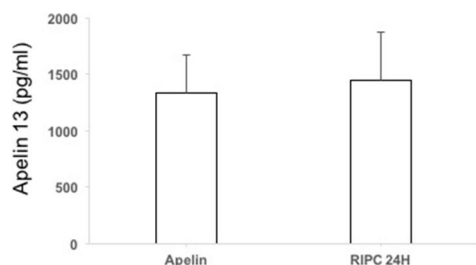


図2 アペリン投与とRIPCによる血中アペリン濃度の比較

(3)RIPCにおけるエクソソーム中のmicroRNAの解析

次にそのメカニズム解明のため、RIPC施行24時間後の血中エクソソームを単離し、アペリン発現上昇に関するmicroRNAの変化を検証した。アペリンの発現上昇に関してはAngiopoietin-1が重要であることが知られている(EMBO J.2008;27:522-534.)。

Angiopoietin-1発現に注目し、microRNAの解析を行った結果、マウスにおいてはAngiopoietin-1発現を誘導するmiR-126-3pの発現亢進、Angiopoietin-1発現を抑制するmiR-711の発現低下が見られた(表1)。ヒトにおいては、Angiopoietin-1発現を抑制するmiR-204-3pの発現低下が見られた(表2)。これらの結果からRIPCによりAngiopoietin-1の発現が亢進した結果、アペリンが上昇する可能性が示唆された。

microRNAs	Control	RIPC 24H	Fold change
mmu-miR-126-3p	20	67	3.28
mmu-miR-711	412	53	0.13

表1 マウスにおけるRIPCによるmicroRNAの変化

microRNAs	Control	RIPC 24H	Fold change
hsa-miR-204-3p	279	84	0.30

表2 ヒトにおけるRIPCによるmicroRNAの変化

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
--	---------------------------	-----------------------	----