

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08233

研究課題名(和文) 体液エクソソームを用いた新生児慢性肺疾患の発症予測とmiR-21制御の治療効果

研究課題名(英文) Prediction of Neonatal Chronic Lung Disease Using Body Fluid Exosomes and Therapeutic Effects of miR-21 Regulation

研究代表者

郷 勇人 (Hayato, Go)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30443857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、早産児の尿中Extracellular vesicles (EVs) miR-21が、CLDのバイオマーカーになるかを検証することとmiR-21 transgenic マウスと野生型CLDマウスにmiR-21阻害剤を投与したマウスを用い、CLDにおけるmiR-21の役割を生理学的、分子生物学的に評価することを目的とした。成果は、尿中からEVを検出することはできたが、miR-21の発現解析まで行うことはできなかった。マウスでは、miR-21 inhibitor投与群とmiR-21ヘテロ欠損マウスでは、コントロール群に比べ、日齢7で有意に体重増加が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、これまで血中のEVs miR-21がCLDのバイオマーカーになり得ることを証明できたが、尿中のEVs miR-21に関しては、コロナウイルス感染状況下で、バイオマーカーになり得るかまでを検討することができなかった。miR-21抑制剤やmiR-21欠損マウスを用いた研究では、miR-21ノックアウトマウスよりもmiR-21ヘテロ欠損マウスで、体重増加や呼吸機能の改善が得られたことから、miR-21をノックダウンすることで、治療効果が得られる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to test whether urinary Extracellular vesicles (EVs) miR-21 in preterm infants is a biomarker for CLD and to evaluate the role of miR-21 in CLD using miR-21 transgenic mice and wild-type CLD mice treated with miR-21 inhibitors. 21 in CLD using miR-21 transgenic mice and wild-type CLD mice treated with miR-21 inhibitors. Although we were able to detect EVs in urine, we were not able to analyze the expression of miR-21. In mice, miR-21 inhibitor-treated and miR-21 heterozygous deficient mice showed significant weight gain at day 7 compared to controls.

研究分野：小児・新生児

キーワード：micro RNA miR-21 chronic lung disease extracellular vesicles

1. 研究開始当初の背景

CLDは、日齢28を超えても、呼吸窮迫症状が持続する、未熟児にとって重篤な合併症の1つで、酸素暴露、人工呼吸器、炎症などに伴う組織損傷による肺組織の線維化が本体である。約30%の超低出生体重児が重症CLDに至り、精神運動発達遅滞の併発率が高い。未熟児の後遺症なき救命のためには、CLDのさらなる病態解明と新規治療薬開発が急務である。新生児慢性肺疾患(CLD)は未熟児の重篤な合併症の一つで、酸素暴露や感染などが関わるがその病態メカニズムは明らかでない。申請者は、高濃度酸素暴露で作製したCLDマウス肺では、microRNA-21(miR-21)の発現が上昇し、CLDマウスにmiR-21抑制剤を投与すると呼吸機能が改善することを発見した。また、早産児の血清からmiRNAを内包するエクソソームを抽出することに成功し、CLD児では血清エクソソームmiR-21が日齢28に上昇することがわかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、①miR-21ヘテロ欠損CLDマウスと、miR-21抑制剤を投与した野生型マウスを用いて、CLDにおけるmiR-21の役割を分子生物学的、病理組織学的に評価し、miR-21が治療標的になるかを検証すること ②早産児の尿中のエクソソームmiR-21の発現解析を行い、CLDの低侵襲的な発症予測のバイオマーカーになるかを検証することである。

3. 研究の方法

- 1) miR-21ヘテロ欠損CLDマウスと野生型CLDマウスの作製
miR-21ヘテロ欠損マウスの雌雄を交配し、生後12時間以内の仔マウスを、母マウスと共に高濃度酸素チャンバー(FiO₂ 0.95)に7日間暴露し、非暴露群をコントロールとする。
- 2) miR-21抑制剤のマウスへの投与
CLDマウスに20mg/kg/dose(Blood, 120:1678-86, 2012)のmiR-21抑制剤と生理食塩水を皮下注射する(Proc Natl Acad Sci USA, 101:12658-63, 2004)。投与効果は生理学的、病理組織学的、分子生物学的(標的mRNAの解析やウェスタンブロットなど)に評価する。
- 3) 生理学的評価
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)で一回換気量、呼吸数を、日齢7と日齢14に評価する。
- 3) マウス肺からのtotal RNA抽出
マウスの右肺は日齢7に採取後、直ちにRNA保存試薬に浸漬し、左肺は次年度の組織標本用に保存する。RNA抽出にはmirVana miRNA Isolation kit(Ambion)を用いる。
- 4) CLDマウスにおけるmiR-21が制御するmRNAの同定
抽出したtotal RNAをmiR-21が制御するmRNAの発現解析を行い、標的mRNAを同定する。
- 5) 病理組織学的、分子生物学的評価
日齢7の肺組織標本を用いて、肺胞の発達遅延についてはRadial Alveolar Count(Am J Respir Cell Mol Biol, 40:511-8, 2009)を、標的miRNAの病理組織学的評価はIn situ hybridizationで行う(Am J Respir Cell Mol Biol, 45: 287-94, 2010)。
- 6) 早産児の尿の採取とmiR-21の発現解析
対象は32週未満で出生し、人工呼吸器を要した早産児でご家族の同意が得られた尿を出生時、日齢7、14、28、修正36週に採取する。尿は、採取後、-80℃で保存する。検体数は40症例を目標とする。を用いて採取し、遠心操作は先行論文(AJP lung. 311:L1218-32, 2016)を参考に行う。また、エクソソームには内部標準がないため、植物のmiRNAであるath-miR-159を一定量(3pg) total RNA抽出前に加え、外部標準とする。CLDの有無や重症度だけでなく、出生前後の交絡因子(出生週数、出生体重、絨毛膜羊膜炎の有無、酸素投与期間等)についても、体液中エクソソームのmiR-21の発現量に差があるかどうか比較検討する。

4. 研究成果

- miR-21 KO マウス、ヘテロ欠損マウス、WT における高濃度酸素曝露後の体重増加
 下記に示すように miR-21KO マウスやヘテロ欠損マウスでは酸素曝露後、WT より、日齢 7 での体重がより増加し、また、ヘテロ欠損マウスが KO マウスよりも体重がより増加することが明らかになった。

	Birth	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
WT	1.27±0.01	1.35±0.02	1.68±0.03	1.99±0.04	2.23±0.07	2.32±0.04	2.40±0.05	2.69±0.06
HT	1.35±0.03	1.36±0.02	1.55±0.03	1.93±0.02	2.32±0.04	2.63±0.06§	2.89±0.10§	3.32±0.08§
KO	1.27±0.05	1.42±0.10	1.55±0.11	1.87±0.07	2.17±0.10	2.53±0.10	2.92±0.17§	3.05±0.15§

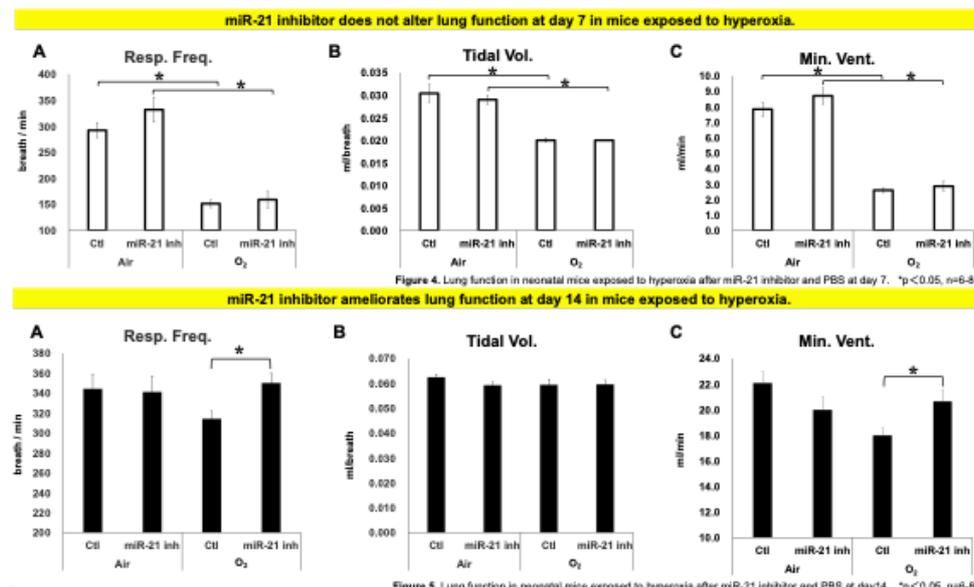
- miR-21 抑制剤投与マウスにおける生理学的評価
 下図のように、miR-21 抑制剤投与マウスではコントロール群に比べ、酸素曝露後、7 日、14 日に、体重がより回復していることが明らかになった。

Body weight gain during postnatal period

	Birth	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 14
Mock	Air	1.31±0.02	1.43±0.02	1.62±0.03	1.82±0.04	2.19±0.04	2.71±0.06	2.91±0.09	3.34±0.10
	O ₂	1.27±0.01	1.35±0.02	1.68±0.03	1.99±0.04	2.23±0.07	2.32±0.04	2.40±0.05	2.69±0.06
miR-21 Inhibitor	Air	1.21±0.00	1.36±0.03	1.55±0.04	1.89±0.03	2.14±0.11	2.72±0.05	2.99±0.05	3.38±0.17
	O ₂	1.30±0.05	1.35±0.03	1.55±0.08	1.88±0.06	2.19±0.07	2.45±0.09	2.57±0.04	2.85±0.08§

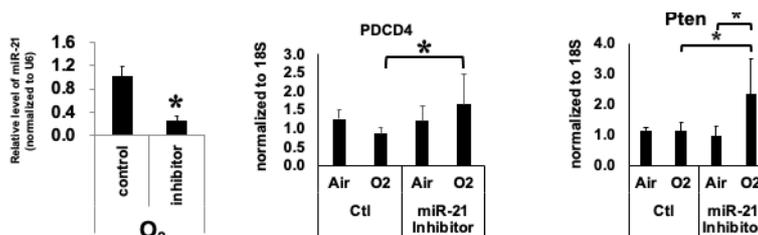
N=5-37

- miR-21 抑制剤投与マウスにおける生理学的評価
 また、呼吸機能検査では、下図のように、miR-21 抑制剤投与マウスではコントロール群に比べ、酸素曝露後、日齢 7 では分時換気量や 1 回換気量に変化はなかったものの、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。



- miR-21 抑制剤投与マウスにおける分子生物学的評価

また、qPCR による発現解析を行ったところ、miR-21 抑制剤投与後に、miR-21 の発現が低下し、PDCD4 や PTEN の発現が酸素曝露後に増加していた。



- これまで、早産児の尿中からエクソソームを検出できることを確認していたが、コロナウイルス感染蔓延のため、尿中エクソソーム中の miRNA 発現解析までは行えなかった

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
研究分担者	橋本 浩一 (Koichi Hashimoto) (50322342)	福島県立医科大学・医学部・准教授 (21601)	

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