

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860571

研究課題名(和文)肺動脈性肺高血圧症へのmiRNAを応用した体性幹細胞移植療法の開発

研究課題名(英文)Development of micro-RNA based Adipose-derived regenerative cell therapy for pulmonary arterial hypertension

研究代表者

江口 正倫(Eguchi, Masamichi)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：70585405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、肺動脈性肺高血圧症(PAH)モデルラットに脂肪由来幹細胞(ADRCs)の移植療法を行い、ADRCsが肺に生着し、パラクライン作用で炎症を抑制、PAHの進行を抑え、ADRCs細胞移植療法がPAHの新しい治療法になることを報告した(Life Sciences 2014)。また、PAH症例の肺循環で増加する16種類のmiRNAを見つけ、この中から、特に結合組織病に伴うPAHの血清で上昇する特定のmiRNA-Aを見出した。このmiRNA-Aは肺動脈平滑筋細胞に導入すると、増殖能、抗アポトーシス能を亢進させ、平滑筋細胞の肥厚に寄与していることを報告した(第80回日本循環器学会)。

研究成果の概要(英文)：We reported that, Adipose-derived regenerative cell (ADRC) therapy inhibited the development of pulmonary arterial hypertension (PAH) by reversing the changes in Endothelin expression and inflammatory cytokines. These findings suggest that ADRC therapy may open a novel strategy for treating PAH.

Micro-RNA(miRNA) are detectable in serum and might be useful biomarkers of human diseases. However, the role of miRNA in connective tissue disease-pulmonary arterial hypertension (CTD-PAH) is not fully understood. From the microarray analysis, 16 miRNAs increased in pulmonary circulation of patients with CTD-PAH. The expression miRNA-A which was one of the 16 miRNAs that was increased in the patients with CTD-PAH. MiRNA-A increased proliferation of PA smooth muscle cells (SMC) and protected against apoptosis. Our study identified miRNA as a novel biomarker of CTD-PAH. Interference with this pathway may offer novel approaches to treating CTD-PAH.

研究分野：循環器内科

キーワード：肺動脈性肺高血圧症 マイクロRNA エンドセリン 脂肪由来幹細胞(ADRCs) バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国での特発性及び家族性肺動脈性肺高血圧症(PAH)の有病率は100万人に6.67人と算出されており、その発症機序は未だ明らかではなく、未治療のPAHの予後は極めて不良である。血管内皮前駆細胞(EPC)を用いた肺血管内皮細胞の再生治療がいくつか報告され、新しい治療法として注目されている。一方で体性幹細胞に富んだ組織の一つとして脂肪組織があり、その組織を分解して得られる脂肪由来幹細胞(ADRC)には多くの幹細胞が含まれている。このADRCは培養や、磁気抗体で選んだりすることなく、ベットサイドで採取し、そのまま必要な組織に移植することができ、血管の新生を促進し、虚血病変の血流を改善することができるかと報告されている。

(2) micro-RNA(miRNA)は20から25塩基ほどの1本鎖RNAで、全遺伝子のおよそ3分の1の発現がmiRNAにより調節されていると考えられている。またmiRNAはmicrovesicle内に封入され細胞外に放出され、細胞間の相互作用に重要な役割を担っている。Weiらによると肺高血圧患者の血清で、いくつかのmiRNAが増減していることが解った(*C Wei PLOS 2013*)。しかし、これからのmiRNAがPAHの病因と関係しているかは不明である。また、Mesenchymal stem cells(MSCs)から放出されるmicrovesicle内にも多くのmiRNAが含まれており、その中には抗炎症作用を持つmiRNAも含まれており(*Collino F, PLoS ONE 2010*)、miRNAでpre-conditioningし細胞の分化能や抗炎症能、血管新生能、抗アポトーシス能などの組織再生能を高めたMSCsを心筋梗塞モデルに移植すると、より大きな治療効果がえられたことが報告されている。

2. 研究の目的

(1) 肺動脈性肺高血圧症(PAH)は予後不良の疾患で、近年治療薬が開発されて来たものの治療抵抗性の患者も多く、新たな治療法が開発が望まれている。脂肪由来幹細胞(adipose derived regenerative cells:ADRC)は、自己から豊富に採取できるため、その再生医療への応用が広まっている。PAHの病態には炎症が関与することが知られ、ADRCには血管新生作用と抗炎症作用があることよりPAHの治療に応用できる可能性がある。

(2) また、昨今microRNA(miRNA)がPAHのバイオマーカーとして注目されており、新しい治療薬としても期待されている。本研究ではPAHに対するADRCの治療効果を検討するとともに、miRNAを応用したADRCs移植療法をPAHへの新たな治療法として検討する。

3. 研究の方法

(1)ADRCがPAHに対して治療効果を有するかを検討する。

Wister RAT () に Monocrotalin(MCT) 50mg/kg を投与し PAH モデルラットを作成した。MCT を投与して1週間後、PAH モデルラットは ADRCs 投与群(M/A 群)と、PBS 投与群(MCT 群)に分けられ、M/A 群には 1×10^7 個の細胞(ADRCs)が尾静脈から投与された。PA 圧は心エコーで非観血的に評価した。Koskenvuoらは、肺動脈の流速を測定し、acceleration time(AT)と deceleration(Dc)が観血的に測定した肺動脈(PA)圧に相関することを報告しており、今回我々はPAHモデルラットのATとDcを計測した。また、圧測定装置を用いて右心室圧(RVBP)を観血的に評価した。さらに、MCT投与後7週目、組織を採取し病理学的に評価を行った。移植した細胞が肺に生着できたことを確認するため、DiIで染色したADRCsを移植し翌日肺組織を評価した。

(2)肺組織循環で増加するmiRNAの探索とPAHへの作用機序、治療への応用を検討。

当院では2012年からPAH症例の心臓カテテル検査時、肺動脈(PA)と左心室(LV)内から血清を採取し保存している。既に報告のあるPAHの血清で発現が増加するmiRNAの中から、あるいはmiRNA arrayを行い網羅的に、肺循環を通過した血液の中で増加しているmiRNAを探索し、PAHのバイオマーカーとしての妥当性を検討する。結合組織病の約10%にPAHを合併する事が知られており、結合組織に伴うPAH(CTD-PAH)は特発性PAH比べてもさらに予後が悪いことが報告されている。今回我々は特にCTH-PAHに注目し、症例を検討した。

さらに検出されたmiRNAに関しては肺動脈モデルラットと培養肺動脈平滑筋細胞を用いた研究でその作用機序を明らかにし、PAHの治療への応用を検討する。

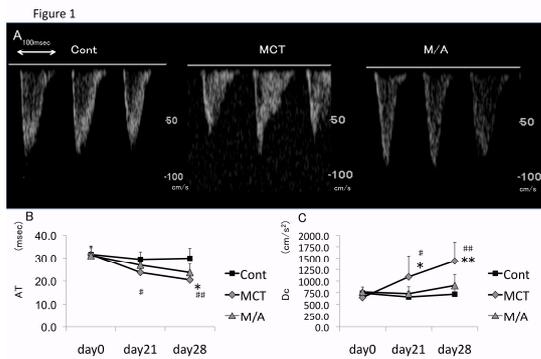
(3) PAHに対して、miRNAを応用したADRC細胞移植療法の治療効果を検討する。

PAH治療効果の期待されるmiRNAあるいは病因となるmiRNAのantagomiR(拮抗剤)を併用してADRC移植する。あるいは、ADRCの生着能やADRCが持つ組織再生能を高めるようなmiRNAでpre-conditioningして移植することで、その相加相乗的な治療効果を検討する。

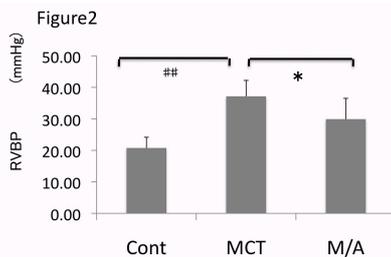
4. 研究成果

(1) ADRCs が PAH に対して治療効果を有するかを検討した。

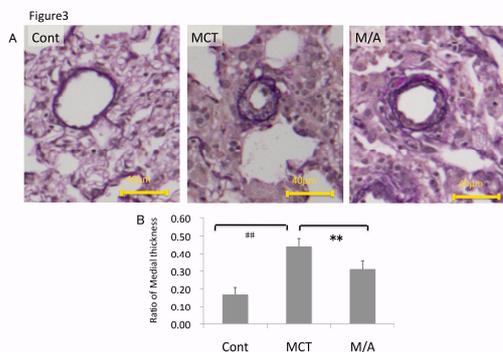
MCT を投与後 一週間目に ADRCs あるいは PBS を尾静脈から投与した。M/A 群では MCT 群と比較して心エコーで AT, Dc とともに day21, day28 で有意に改善が認められた (Figure1)。このことは M/A 群の肺動脈圧が有意に低いことが示唆された。



観血的圧測定でも右心室圧 (RVBP) は MCT 群と比較して M/A 群で有意に低下が認められた (Figure2)。

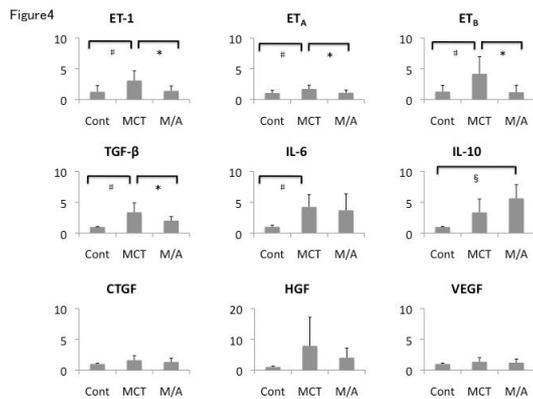


次に MCT 投与後 7 週目、PAH モデルラットの組織を採取し、病理組織学的な評価を行った。肺動脈の肥厚が MCT 群と比較して M/A 群で低下しており、肺動脈のリモデリングが抑えられていた (Figure3)。



また、移植した細胞が肺に生着できたことを確認するため、DiI で染色した ADRCs を移植し肺組織を評価し、移植細胞が肺組織に存在している事が確認できた。

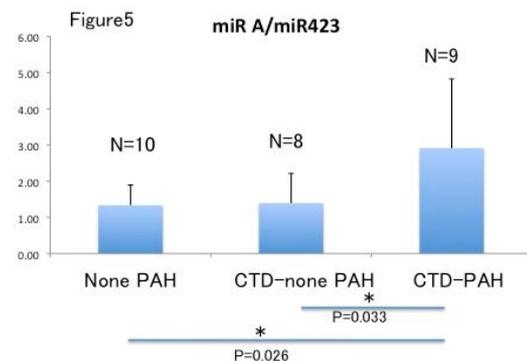
ADRCs の細胞移植療法が PAH モデルラットの PA 圧の上昇を抑える働きのメカニズムを解明するため、肺組織でのメッセンジャー RNA の発現を確認した。Endothelin (ET), ET receptor A, ET receptor B, TGF-beta の発現が M/A 群で MCT 群と比較して有意に低下していた (Figure4)。



ADRCs の細胞移植療法は TGF-beta などの炎症系シグナルを抑えることで、MCT による PAH モデルラットの肺高血圧の進行を抑えることができたと考えられた。このことは ADRCs 細胞移植療法が肺高血圧症の新たな治療になりうるということが示唆された。

2 肺組織循環で増加する miRNA の探索と PAH への作用機序、治療への応用を検討した。

当院では 2012 年から PAH 症例の心臓カテーテル検査時、肺動脈 (PA) と左心室 (LV) 内から血清を採取し保存している。これらの検体で micro array を用い PAH 症例の肺循環で増加し、Control の肺組織循環で上昇しない、かつ PAH 症例の血清中で Control と比較して高値の miRNA を 16 種類、見出した。この候補の中から、特に CTD-PAH の血清で上昇する特定の miRNA-A に注目した (Figure5)。



この miRNA-A は肺高血圧が疑われた症例の mPA 圧との相関関係が認められた。この miRNA-A を肺動脈平滑筋細胞に導入すると、増殖能が亢進し、抗アポトーシス能が亢進することが認められ、肺動脈の肥厚に関与している可能性が示唆された。

<引用文献>

Chuanyu Wei, Circulating miRNAs as potential marker for pulmonary hypertension, PLoSone 8,2013, e64396

Federica Collino, Microvesicles derived from adult bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs, PLoSone 5, 2010, e11803

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

Eguchi M, Ikeda S, Maemura K. (7人1,2,7番目), Adipose-derived regenerative cell therapy inhibits the progression of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Life Sciences* (査読有)118: 306-12, 2014. doi: 10.1016/j.lfs.2014.05.008.

機 関 リ ポ ジ ト リ ア ド レ ス

<http://naosite.lb.nagasaki-u.ac.jp/dspace/handle/10069/3549>

[学会発表](計 1件)

江口正倫、Comprehensive Searching of Circulating microRNAs as a Novel Biomarker for Connective Tissue Disease-Pulmonary Arterial Hypertension、第80回日本循環器学会学術集会 2016.3.20、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

江口 正倫 (EGUCHI, Masamichi)

長崎大学 病院(医学系)・助教

研究者番号: 70585405

(4)研究協力者

前村 浩二 (MAEMURA Koji)

池田 聡司 (IKEDA Satoshi)