

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19413

研究課題名(和文) 肺線維芽細胞由来マイクロRNA含有エクソソームによるCOPDの病態、治療法の研究

研究課題名(英文) Roles of Exosomal miRNA release from lung fibroblasts in the pathogenesis of COPD

研究代表者

伊狩 潤 (Ikari, Jun)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：50734604

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：COPDにおいてmiR146aの発現は肺線維芽細胞において低下し、組織修復低下に関連する。本研究では肺線維芽細胞がExosomeを介してmiR146aを細胞外に産生し、IL-1/TNF- $\alpha$ が経時的、用量依存的に増加することを示した。またIL-1/TNF- $\alpha$ は細胞内miR-146a発現およびExosome産生を促進し、Exosomes内包miR-146a(Ex-miR146a)を増加した。さらに、COPD肺線維芽細胞ではEx-miR146aの産生が低下し、呼吸機能の重症度と逆相関した。以上より、肺線維芽細胞によるEx-miR146aの低下がCOPD病態に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In COPD, miR-146a is decreased in lung fibroblasts, leading to reduced repair function. Whether lung fibroblasts release exosomes contain miR-146a and whether this can be modulated by inflammatory cytokines is unclear. Human fetal lung fibroblasts (HFL-1) or primary adult control and COPD lung fibroblasts were cultured with and without IL-1 and TNF- $\alpha$  in vitro. HFL-1 cells secreted exosomes into cultured media both in the presence and absence of IL-1 and TNF- $\alpha$ . Cytokines stimulation significantly increased extracellular miR-146a secretion in a time and concentration dependent manner. Cytokines stimulated both exosomes secretion and intracellular miR-146a expression, leading to the augmented miR-146a release. COPD lung fibroblasts secreted less miR-146a into Exosomes than control lung fibroblasts. The current study demonstrates that lung fibroblasts release extracellular miR-146a, that this is modulated by cytokines and that COPD fibroblasts release less miR-146a.

研究分野：COPD

キーワード：エクソソーム マイクロRNA 肺線維芽細胞 COPD

## 1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は喫煙を主因とする慢性進行性の閉塞性気流障害を特徴とし、2030 年までに世界の死因第 3 位になると予測されることから、新たな治療法の開発は喫緊の課題である。

COPD の病態として、喫煙による組織障害と修復の不均衡が考えられている。肺線維芽細胞は細胞外マトリックスの産生等を介して肺組織修復に重要な役割を果たすが、COPD では炎症性メディエーターであるプロスタグランジン E2 (PGE2) の産生が亢進し肺線維芽細胞の修復能が抑制されている。

非翻訳 RNA の一種であるマイクロ RNA (miRNA) は標的遺伝子の翻訳を抑制するが、COPD 肺線維芽細胞では、miRNA の一種である miR-146a の発現が低下している。その結果、miR-146a の標的である COX2 の発現上昇を介して、PGE2 産生が亢進すると考えられている。以上より、肺線維芽細胞における miR-146a-PGE2 経路の異常は COPD 修復能低下の原因と考えられ、この経路に着目した治療法が期待されている。

近年、miRNA はエクソソーム (Exosomes) と呼ばれる膜小胞により細胞外に分泌され、他の細胞の遺伝子の発現を修飾することが明らかとなり、新たな細胞間情報伝達機構として注目されている。又、細胞外 miRNA 解析による疾患の病勢診断や、炎症制御、癌治療など様々な領域で治療応用が近年特に期待されている分野である。呼吸器領域では、気管支喘息病態への細胞外 miRNA の関与が指摘されているが、COPD における細胞外 miRNA の役割はこれまで明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、肺線維芽細胞による細胞外 miRNA 分泌機構を明らかにすることを目的とした。さらに、正常及び COPD 患者肺線維芽細胞による miR-146a 分泌能と臨床データとの相関を解析し、COPD の病勢診断、治療の礎となる研究を行うこととした。

## 3. 研究の方法

In vitro で、ヒト胎児肺線維芽細胞株 (HFL-1) を IL-1 及び TNF- 存在、非存在下で 4 日間培養した。まず、培養上清中の微小小胞の存在を粒子径分析装置にて解析した。次に、超高速遠心分離法により培養上清から Exosomes 分画を単離し、電子顕微鏡、ウェスタンブロット法により Exosomes の存在を解析した。また、粒子解析装置を使用しサイトカインにより Exosomes の産生数への影響を評価した。次に、分離した Exosomes 中の miR-146a 発現をリアルタイム PCR 法に

より解析した。Exosomes 合成阻害薬 (GW4869) 存在下で同様に細胞外 miR-146a の発現を解析し、細胞外 miR-146a 分泌が Exosomes 依存性か否か、解析した。次に、健常者 (n=10) および COPD (n=10) 患者由来の肺線維芽細胞を in vitro で培養した。培養上清から遠心分離法により Exosomes 分画を単離し、粒子分析計及びウェスタンブロット法により解析した。又、健常者および COPD 患者由来肺線維芽細胞の Exosomes 中 miR-146a の発現の相異をリアルタイム PCR 法により評価した。さらに、呼吸機能、6 分間歩行距離などの臨床データと細胞外 miR-146a 分泌量との相関を解析した。

## 4. 研究成果

(1) 微小粒子における、Exosomes の表面抗原、内在抗原である CD63 および アクチンの発現をウェスタンブロット法で確認したところ、両者ともに陽性であった。以上より、肺線維芽細胞は Exosomes を産生することが明らかになった。

(2) Exosomes 内への miR-146a の発現をサイトカイン存在、非存在下で解析した。無刺激状態では miR-146a の発現は極めて低値であったが、IL-1 /TNF- 存在下ではその発現が顕著に増加した。また、時系列の検討では培養後 3 日目まで miR-146a の発現は増加した。さらに、IL-1 /TNF- による miR-146a の産生において容量依存効果を認めた。以上より、無刺激状態では肺線維芽細胞は miR-146a を産生しないが、IL-1 /TNF- 刺激はその産生を顕著に増強することが明らかになった。

(3) 細胞内 miR-146a の産生と Exosomes 内 miR-146a 産生の相関関係について解析した。肺線維芽細胞を IL-1 /TNF- 存在、非存在下で 4 日間培養し、細胞内より RNA を抽出、miR-146a の発現をリアルタイム PCR 法により評価した。結果、IL-1 /TNF- 容量依存性に細胞内の miR-146a 発現は顕著に増加した。また、細胞内 miR-146a と培養上清中の Exosomes 内 miR-146a の発現は正の相関関係を認め、細胞内での miR-146a 産生が細胞外産生に重要であることが示唆された。

(4) 培養液中には microvesicle 等の Exosomes 以外の微小粒子混入の可能性が否定できないため、Exosomes 産生阻害剤を使用し培養上清中の miR-146a 発現への影響を解析した。Exosomes 合成に必要な nSmase を阻害する GW4869 存在下で肺線維芽細胞を培養し、上清中の miR-146a の発現をリアルタイム PCR 法により解析した。結果、IL-1 /TNF- による miR-146a の発現は GW4869 存在下では顕著に抑制され、細胞外 miR-146a は主に Exosomes 依存性に細胞外に産生されると考えられた。

(5) IL-1 /TNF- による肺線維芽細胞の Exosomes 産生への影響を評価した。肺線維芽細胞を IL-1 /TNF- 存在下で4日間まで培養し、Exosomes 産生数をナノ粒子解析装置により評価した。結果、肺線維芽細胞は時間依存性に Exosomes を産生することが明らかになった。又、IL-1 /TNF- は容量依存性に Exosomes 産生を優位に増強することが明らかになった。以上より、肺線維芽細胞は無刺激状態においても Exosomes を産生しており、IL-1 /TNF- は Exosomes の産生をさらに増強すると考えられた。

(6) 健常者および COPD 肺線維芽細胞における Exosomes 産生を評価した。患者背景は、GOLD ガイドラインに準拠する COPD の重症度は中等度から重症患者が多く、%FEV1 や拡散能は COPD 群で顕著に低下していた。健常者および COPD 肺線維芽細胞を in vitro で同様に培養し、培養上清を粒子径分析装置にて解析した。結果、両者ともに微小粒子を産生しており、特に Exosomes を優位に産生していた。また、遠心分離したペレット内の Exosomes の存在をウェスタンブロット法により解析したところ、Exosomes で陽性となる CD63 の発現を認めた。よって、成人肺線維芽細胞は Exosomes を産生していると考えられた。

(7) 健常者および COPD 肺線維芽細胞内および Exosomes 内の miR-146a 発現を評価した。健常者および COPD 肺線維芽細胞を IL-1 /TNF- 存在、非存在下で培養し、細胞および Exosomes を回収後に RNA を抽出し miR-146a の発現をリアルタイム PCR 法により評価した。IL-1 /TNF- は細胞内 miR-146a 発現を顕著に増加した。過去の報告に一致し、健常者と COPD 肺線維芽細胞を比較するとその発現は COPD 肺線維芽細胞で有意に低下した。また、Exosomes 内 miR-146a の発現は、IL-1 /TNF- 非存在下では極めて低値であったが、IL-1 /TNF- はその産生を顕著に増加した。さらに、COPD 肺線維芽細胞における Exosomes 内 miR-146a の産生は健常者よりも有意に低下した。また、細胞内および Exosomes 内 miR-146a の発現を相関解析すると、両者に正の相関関係を認め、細胞外 miR-146a の産生は細胞内 miR-146a 産生量と相関することが明らかになった。

(8) Exosomes 内 miR-146a の発現量と呼吸機能の関連を評価したところ、FEV1 と miR-146a に負の相関関係を認めた。以上より、COPD 肺線維芽細胞では Exosomes 中 miR-146a の細胞外への産生が低下しその重症度と相関することが明らかになった。

(9) 本研究の主な成果として、IL-1 /TNF- 存在下において肺線維芽細胞は Exosomes

依存性に miR-146a を分泌することが明らかになった。又、COPD 肺線維芽細胞では miR-146a の産生が顕著に低下し、気流障害の程度と相関していた。以上より、肺線維芽細胞による miR-146a 産生は COPD の病態に重要な役割を果たす可能性がある。これまで COPD 特に肺線維芽細胞の Exosomes 産生や細胞外 miRNA 機構に関する報告はほとんどなく、本研究は COPD 病態に Exosomes や細胞外 miRNA が関連する可能性を明らかにした点がインパクトのある知見と考える。

(10) 本研究の課題、今後の展望について下記に記す。今後、細胞外 miR-146a の生理的役割を明らかにする必要がある。肺線維芽細胞は気道上皮細胞や血管内皮細胞と相互に作用し肺恒常性を維持していることから、その相互作用に Exosomes 内 miR-146a が関連している可能性がある。COPD では肺内で PGE2 の産生亢進が組織修復能低下と関連し、miR-146a はその原因と考えられていることから、細胞外 miR-146a の PGE2 産生への関連を明らかにする必要がある。今後は肺線維芽細胞 Exosomes による PGE2 産生を含めた、他細胞の機能修飾効果を評価していく必要性がある。また、Exosomes 内 miR-146a と呼吸機能に関連があったことから、患者血中の Exosomes 内 miR-146a の発現を解析し、COPD 病態での細胞外 miR-146a の機能や意義について今後さらに検討していく必要があると思われる。

## 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 件)

〔学会発表〕(計 2件)

1. F. Makino, J. Ikari, J. obaid, N.M Wu, M. Farid, J. Meyer, X. Song, A. Nelson, H. Basma, Xiang D. Liu, S.I. Rennard. CD63+ Extracellular Vesicles (EVs) and CD81+ EVs from Human Lung Fibroblasts Play an Opposite Role After Stimulation with IL-1 / TNF- , American Thoracic society conference, 2015年5月19日、デンバー(米国)

2. F. Makino, J. Ikari, M. Makino, A. Nelson. H. Basma, Xiang D. Liu, S.I. Rennard. Extracellular Vesicles (EVs) from Normal Human Lung Fibroblasts Cells (NHLF) and COPD/Pulmonary Emphysema Cells Stimulated by IL-1 /TNF- Mediate Divergent Effects. American Thoracic society conference, 2016年5月16日、サンフランシスコ(米国)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊狩 潤 (Ikari, Jun)  
千葉大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号：50734604

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

多田裕司 (Tada, Yuji)  
千葉大学・大学院医学研究院・講師  
研究者番号：50344990