

令和元年6月19日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19432

研究課題名(和文)肺線維化病態におけるエクソソームを介した肺と骨髄のクロストークに関する研究

研究課題名(英文) Crosstalk of exosome between lung and bone marrow in lung fibrosis

研究代表者

猪俣 稔 (Minoru, Inomata)

日本医科大学・大学院医学研究科・研究生

研究者番号：50465291

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)：C57BL/6マウスに浸透圧ポンプでBLMを投与し、血清からエクソソームを濃縮し microRNA arrayで解析したところ、BLM投与後14日目の血清から採取したエクソソーム中に含まれるmicroRNA-16 (miR-16)が高値であった。同様のモデルで7日後にmiR-16 mimicを頸静脈的投与したところ、28日目のashcroft scoreではBLM群と比較し、miR-16 mimicを投与した群において有意にashcroft scoreが改善した。HFL-1に miR-16 mimic、TGF- β 1 を投与したところ、miR-16 mimicの投与により線維化マーカーの発現が抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺線維化病態において、線維化病変由来のエクソソームには線維化を悪化させるmicro RNAが含まれていることが明らかとなり、特発性肺線維症の病態解明や新規治療薬の開発にもつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Bleomycin was infused with osmotic pumps into C57BL/6 mice. Exosomes were extracted from serum of mice using ExoQuick. They were then, subjected to microarray analyses of each microRNA level in the exosomes using the miRNA microarray platform. In BLM-treated group, exosomal miR-16 increased by up to 10.32-fold on day 14 when compared with that in saline-treated group. MiR-16 mimic administration on day 14 after BLM-challenge significantly ameliorated pulmonary fibrosis. HFL-1 cells were pretreated with miR-16 mimic for 24 h before the addition of TGF- β 1. Treatment with miR-16 mimic significantly inhibited fibrotic marker analyzed by qRT-PCR and western blotting.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：micro RNA micro RNA 16 C57BL/6 bleomycin anti-fibrotic effect

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年腫瘍細胞由来のエクソソームが骨髄に作用し、骨髄細胞を“educate”することで、原発巣や転移先の細胞外マトリクス増生など微小環境を整える (pre-metastatic niche formation) という非常に興味深い報告がなされた (Nat Med 18:883-91、2012)。エクソソームは脂質二重膜の細胞外顆粒であるが、内部に microRNA (miRNA) や蛋白が含まれ運搬される (J Biol Chem 4:17442-52、2010)。エクソソームに含まれる蛋白や mRNA、miRNA はエクソソームの授受を介して細胞間を移動する (horizontal transfer of exosomal components)。肺線維化病態において、線維化病変由来のエクソソームが病態形成に関与する蛋白や mRNA・miRNA を骨髄細胞に伝達し、骨髄細胞を“educate”することで肺の線維化病態を悪化させている可能性がある。以上より、IPF において骨髄に運ばれたエクソソームが、骨髄細胞を介して肺内の線維化病態形成に関与していることが考えられる。骨髄由来の fibrocyte が肺へ遊走する機序は未だ不明な点も多く、ここにエクソソームが関与することも考えられる。また、エクソソームにより fibrocyte や fibroblast が細胞外マトリクスを過剰産生させる機序なども明らかにできれば、IPF の病態解明だけでなく、新規治療薬の開発にもつながる可能性があり、大変重要なテーマと考えられる。

2. 研究の目的

腫瘍細胞由来のエクソソームを媒介とした遠隔環境の modulation が、腫瘍性病変の進展に関与することが近年報告されている。腫瘍由来のエクソソームが骨髄細胞を“educate”し、記憶された signature が腫瘍性病変の進展に関与するという新規知見であるが、本研究では肺線維化病態由来のエクソソームに着目し、骨髄と肺とのエクソソームを介したクロストークの解明を目的とする。

3. 研究の方法

C57BL/6 マウスに浸透圧ポンプでブレオマイシン (BLM) を 7 日間持続的に投与、BLM 投与 7、14、21、28 日後の血清から ExoQuick™ でエクソソームを濃縮し microRNA array (3D-Gene™、TORAY) で解析した。BLM 投与 14 日後の血清エクソソームでコントロールに比べ変化を認めた microRNA に着目し、ヒト肺線維芽細胞 (HFL-1) で線維化マーカーの発現を解析した。HFL-1 に mimic mRNA、TGF- β 1 を投与し 96 時間後に real-time PCR (RT-PCR) ウェスタンブロッティングで解析した。

4. 研究成果

(1) MicroRNA array

C57BL/6 マウスに浸透圧ポンプで BLM を 7 日間持続的に投与し、BLM 投与 7、14、21、28 日後の血清から ExoQuick™ でエクソソームを濃縮し microRNA array で解析したところ、BLM 投与後 14 日目の血清から採取したエクソソーム中に含まれる microRNA-16 (miR-16) が他のエクソソーム中と比較し高値であった (図 1)。

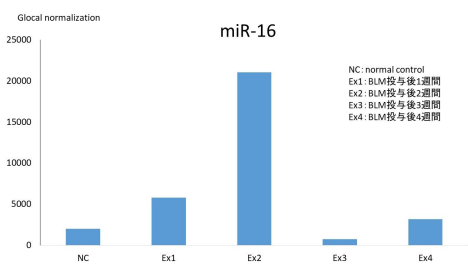


図 1 MicroRNA array

(2) miR-16 mimic による線維化抑制効果 (in vivo)

C57BL/6 マウスに浸透圧ポンプで BLM (100 mg/kg) を 7 日間持続的に投与し、7 日後に miR-16 mimic (4nM/body) を頸静脈的投与、その後 28 日後に sacrifice を行い肺組織の線維化所見を解析した。HE 染色では、normal control 群と比較し BLM 群で胸膜直下の線維化が認められたが、BLM に miR-16 mimic を追加した群では線維化が抑制された (図 2)。

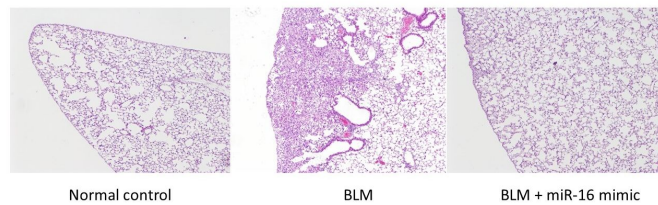


図 2 HE 染色

また、同モデルにおいて ashcroft score を比較したところ、BLM 群と比較し、BLM に miR-16 mimic を投与した群において有意に ashcroft score が改善した。Hydroxyproline に関しては、BLM 群と比較し miR-16 mimic 投与群において低下していたが有意差は認められなかった。

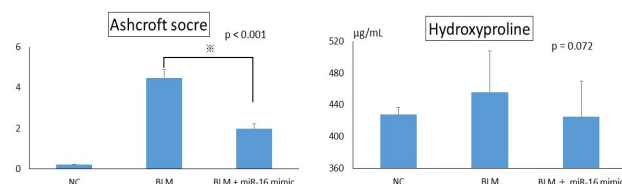


図 3 Ashcroft score、Hydroxyproline

(3) miR-16 mimicによる線維化抑制効果(in vitro) HFL-1にmiR-16 mimic(50 nM)を投与後48時間後にTGF-β(10 ng/mL)を投与し、さらに48時間後にharvestを行い線維化マーカーを解析した。ウェスタンブロッティングではTGF-βによって発現増強したα-smooth muscle actin(α-SMA)、p-SMAD、PTEN、suppression of plasma secreted protein acidic and rich in cysteine(SPARC)はmiR-16 mimicの投与により発現が減弱した(図4)。

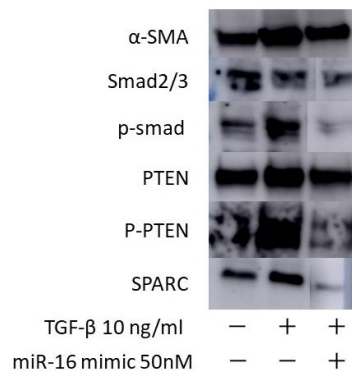


図4 ウェスタンブロッティング

また、同様のモデルにおいてRT-PCRではTGF-βによりα-SMA、collagen type I、SPARCの発現が増強し、miR-16 mimicの投与により有意に発現が抑制された(図5)。

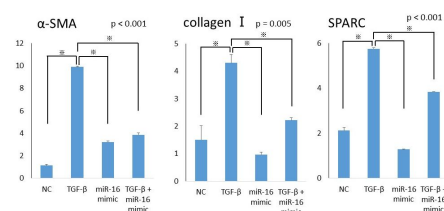


図5 RT-PCR

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

第58回日本呼吸器学会学術講演会

エクソソーム由来 microRNA の肺線維化マーカー抑制効果に関する検討

2018 American Thoracic Society International Conference
Antifibrotic Effect of microRNA-16 In Human Lung Fibroblasts

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。