

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11059

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞のexosomeを利用したmicroRNAによる肺高血圧症治療の検討

研究課題名(英文) Exosome of mesenchymal stem cells for the treatment of pulmonary hypertension with microRNA.

研究代表者

渡辺 至 (WATANABE, Itaru)

横浜市立大学・医学研究科・客員教授

研究者番号：20534142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞は血管障害に有用との報告がある。当研究でモノクロタリン誘発肺高血圧ラットに骨髄由来および臍帯血由来幹細胞を静注し、肺高血圧が完成期に肺高血圧の程度を観察した。ラットモデルにおいて、両由来の間葉系幹細胞の静脈投与による有意な肺高血圧軽減効果は認められなかった。先行研究においては、モノクロタリン誘発を含む実験的肺高血圧モデルにおいて改善の報告例もあるが、有効性についてより詳細な検討が必要と考えられた。miRNAに加えlong non-coding RNAを含む他のRNAが心血管障害における役割が重要視されている。デリバリーのターゲットを再検討を含む計画の検討が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

周術期において肺高血圧の合併は有意な心血管イベントの発症増加を来す。肺高血圧症の管理、治療について種々のガイドラインがあるものの、重症肺高血圧の管理は依然として困難な場合がある。間葉系幹細胞による心血管障害への治療の可能性が見出されているものの、その詳細な条件や機序については今後も更なる検討が必要と思われた。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells have been reported to be useful in vascular disorders. In our study, monocrotaline-induced pulmonary hypertension rats were intravenously infused with bone marrow-derived and cord blood-derived stem cells and the degree of pulmonary hypertension was observed during the completion phase. No significant reduction in pulmonary hypertension was observed in the rat model with intravenous administration of mesenchymal stem cells of both origins. Although some previous studies have reported improvement in experimental pulmonary hypertension models including monocrotaline-induced hypertension, more detailed investigation of efficacy is needed. In addition to miRNAs, the role of other RNAs, including long non-coding RNAs, in cardiovascular disorders has become increasingly important. It was considered necessary to consider a plan that includes reconsideration of the targets of delivery.

研究分野：麻酔

キーワード：肺高血圧 間葉系幹細胞 exosome miRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞 Mesenchymal Stem Cell (MSC)は、exosome を放出し内部の microRNA (miRNA) によって周囲の組織の遺伝子転写後調整を行う。MSC は障害部位ホーミング効果があり、また静脈内投与で肺にトラップされるため、障害肺への miRNA デリバリーとして有用と考えられた。MSC には骨髄、脂肪組織、臍帯血等の異なる由来の MSC が存在する。近年は、骨髄由来 MSC に加え臍帯血由来 MSC の投与が血管障害に有用との報告がなされている。Eur J Clin Invest 2012; 42 (8): 900-913

2. 研究の目的

当研究では間葉系幹細胞の肺高血圧治療の可能性、安全性、及び miRNA のベクターとしての役割を検討するため、モノクロタリン誘発肺高血圧ラットモデルを用い、骨髄由来間葉系幹細胞と臍帯血由来幹細胞を静注し、肺高血圧が完成する 28 日後に各ラットの血行動態等を観察した。

3. 研究の方法

・間葉系幹細胞培養

Mouse (C57BL/6) の bone marrow 由来 Mesenchymal Stem Cells の 2×10^6 cells を用い、3 枚の 10cm dish に播種し培養した。培地は、D-MEM/F12 with GlutaMAX に 10% FBS と $5 \mu\text{g/mL}$ Gentamicin を加え調整した。一週間後に、 2.8×10^5 cells/10mL medium/10cm dish に継代した。

同様に臍帯血由来 human MSC も培養調整した。

・モノクロタリン誘発肺高血圧ラット作成と間葉系幹細胞の静脈内投与

MSC の投与と同時に、8 週齢雄 SD ラットにモノクロタリン 60mg/kg を腹腔内投与し、肺高血圧ラットを作成した。4 週間後に循環動態、心臓超音波にて評価した。

上記のように培養した MSC は trypsin を用いて dish から剥がし、PBS にて洗浄後、MSC 1×10^6 cells または 1×10^7 cells を 1mL として PBS に懸濁した。ラット尾静脈より静脈内投与した。

投与後、ラットに特に外見上の変化はみられず。MSC 投与による死亡例はなかった。

・肺高血圧症モデル評価

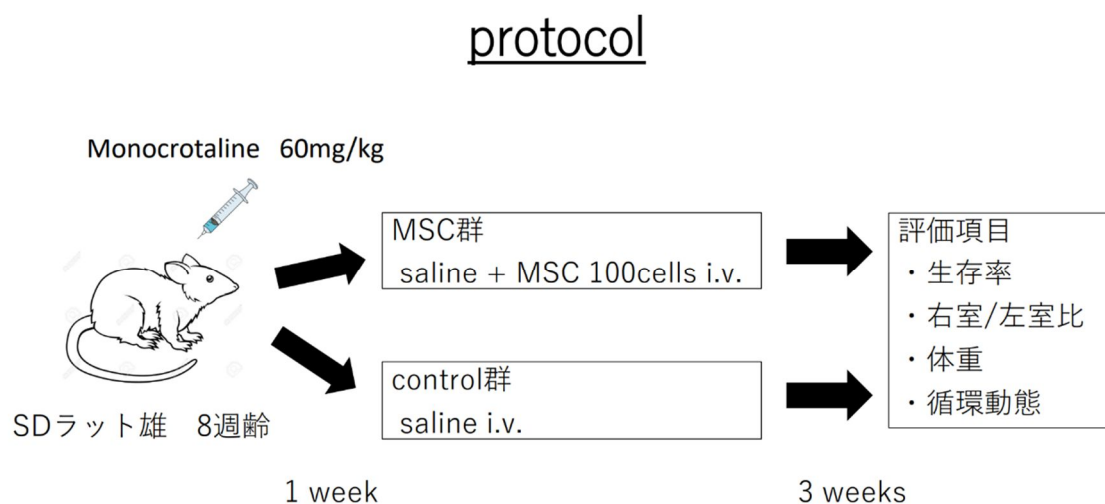
MSC をラットへ静注し、肺高血圧が完成する 28 日後に下記の各項目にて肺高血圧に対する MSC 投与の効果を検討した。

➤ 生存率

- 観血的血圧、右心圧、心拍出量測定。
- 心臓超音波検査
- 体重

プロトコルの概要を図1に示す。

図1



4 . 研究成果

正常ラットに培養骨髄由来幹細胞、臍帯血由来幹細胞を投与し、血行動態変動等の悪影響を及ぼさないことを確認した。

次に、下記のごとくモノクロタリンMCT投与ラットは4週間後に右心圧上昇を来しており、肺高血圧発症を確認した。

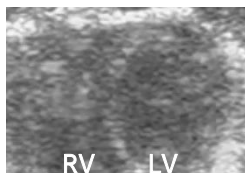
収縮期血圧	SBP (mmHg)	正常	136±6.07	MCT	119±2.25	p=0.0025
収縮期右室圧	RVSP (mmHg)	正常	36.3±1.07	MCT	70.1± 1.99	p<0.00001
心拍出量	CI (ml/100g)	正常	47.6±1.64	MCT	40.0±1.40	p < 0.005

次にモノクロタリン投与後に培養骨髄由来幹細胞、臍帯血由来幹細胞を静脈投与したグループと生理食塩水を投与したコントロールグループの検討を行った。

以下の臍帯血由来幹細胞を用いた結果を表に示す。体重、血圧、収縮右室圧、体血管抵抗、肺血管抵抗、右室/左室比（超音波画像）にて、肺高血圧モデルラットの肺高血圧、右心不全等の改善は見られなかった。骨髄由来幹細胞の結果も同様であった。

両グループとも肺塞栓、右心圧亢進等の合併症は見られなかった。

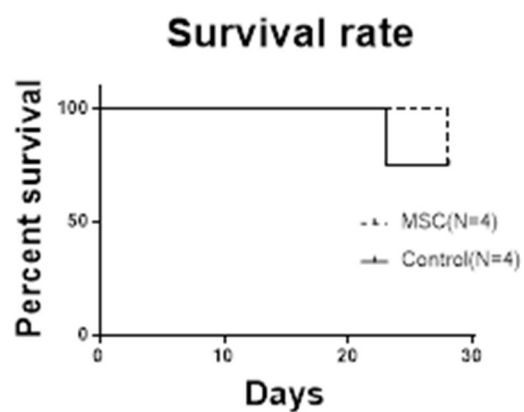
	MSC	control	p 値
Weight	373 ± 13.3	350 ± 0	0.155
mBP	83.9 ± 9.66	93.7 ± 2.15	0.295
RVSP	74.0 ± 7.14	85.1 ± 4.68	0.26
CI	45.2 ± 12.2	45.1 ± 5.48	0.99
SVRI	1.95 ± 0.311	2.12 ± 0.19	0.64
PVRI	1.73 ± 0.308	1.95 ± 0.271	0.63
RV/LV+septal	0.422 ± 0.023	0.438 ± 0.0031	0.701



ラット心臓超音波画像
短軸像、乳頭筋レベル
MSC グループ例 RV 右室、LV 左室

RVSP、PVRI は MSC 群で少し低い傾向にあるが、同様のプロトコールを行った先行研究と比較すると効果は微弱であった。

また、30 日間までの生存率において有意な差はなかった。



まとめ

本研究では、モノクロタリン誘発肺高血圧ラットモデルにおいて、骨髄由来および臍帯血由来幹細胞の静脈投与により有意な肺高血圧軽減効果は認められなかった。先行研究においては、モノクロタリン誘発を含む実験的肺高血圧モデルにおいて改善の報告例もあるが、有効性についてより詳細な検討が必要と考えられた。

この結果から当初の計画の変更を検討した。加えて研究期間中に non-coding RNA の内、当初ターゲットとして考慮していた miRNA に加え long non-coding RNA を含む他の RNA が心血管障害における役割が重要視されてきた。Heart Failure Reviews (2020) 25:795–815 本研究ではデリバリーのターゲットを再検討が必要と考え、この段階で研究を一度仕切り直し、ここで終了することとした。

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	古賀 資和 (KOGA Motokazu) (00637233)	横浜市立大学・医学研究科・客員研究員 (22701)	
研究分担者	水野 祐介 (MIZUNO Yusuke) (80433192)	横浜市立大学・附属病院・准教授 (22701)	
研究分担者	川上 裕理 (KAWAKAMI Hiromasa) (90407958)	横浜市立大学・附属市民総合医療センター・准教授 (22701)	

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