

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08676

研究課題名(和文) マイクロRNAと脂肪幹細胞由来エクソソームを用いた、敗血症性AKI治療開発

研究課題名(英文) Development of a treatment for septic AKI using microRNAs and adipose stem cell-derived exosomes.

研究代表者

加藤 規利 (Noritoshi, Kato)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90716052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は先行研究において敗血症モデルマウスに対して、miR-146a発現プラスミドを全身投与した際に、主に脾臓に取り込まれ、高サイトカイン血症を抑制、生存率を改善させる事に成功してきた。今回我々は、敗血症治療のターゲットとして、脾臓に注目し脾臓への局所注射での治療効果を検討した。投与後の核酸の多くが脾臓、特にマクロファージに取り込まれる事がわかった。腎障害、肝障害などの臓器障害に保護的に働いた一方で生存率を改善させるには至らなかった。そこで対象疾患および治療的miRNAを変更し、葉酸腎症による腎線維化の抑制効果を検証し、一定の線維化抑制効果を確認するに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核酸医薬は、細胞治療や抗体医薬と異なり安価に合成できること、また一度治療に関わるプロトコールが完成すれば、疾患ごとに治療ターゲットを変えて、核酸を載せ替えることで、プラットフォームの汎用性が高いことが特徴である。昨今のSARS-CoV-2感染の病態に、SIRSといった全身性の高サイトカイン血症の関与がうたわれているが、我々の既報から、SepsisによるSIRSの治療ターゲット臓器として脾臓をあげている点は新しく、今後議論が広まることを期待している。またリボソームと成熟miRNAによる治療実験の報告は散見されるが、知見を蓄積していく必要があり、本研究もそれに役立てていきたい。

研究成果の概要(英文)：In our previous studies, we have succeeded in suppressing hypercytokinemia and improving survival in sepsis model mice by systemic administration of a plasmid expressing miR-146a, which was mainly taken up by the spleen.

In this study, we focused on the spleen as a target for the treatment of sepsis and investigated the therapeutic effect of local injection into the spleen. We found that most of the nucleic acids after administration were taken up by the spleen, especially by splenic macrophages. While the therapeutic effect was protective against organ damage such as kidney and liver damage, this did not improve the survival rate. Therefore, the target disease and therapeutic miRNAs were changed, and the inhibitory effect on renal fibrosis caused by folic acid nephropathy was examined, and a certain inhibitory effect on fibrosis was confirmed.

研究分野：miRNA

キーワード：miRNA リボソーム 敗血症 腎線維化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々の先行研究において、NF- κ B の下流シグナルを抑制する miR-146a の発現ベクターを、ポリエチレンイミン (PEI) をドラッグデリバリーシステム (DDS) として全身投与することで、敗血症モデルマウス (盲腸結紮穿孔; CLP) の高サイトカイン血症を抑制し、生存率を高めることを確認してきた。この時点での注目すべき点として、(1) miR-146a が有効な核酸医薬として働いたこと。(2) 投与した miR-146a 発現ベクターは主に網内系である脾臓に取り込まれていることがわかり、本モデルでは脾臓摘出を行うと、治療効果が消失することが確認されていることから、サイトカイン産生場所としての重要な役割を担っていることが明らかとなり、脾臓が治療の標的臓器となりうる点。(3) 分子量の大きなベクターを細胞内に運搬できる為、ドラッグデリバリーシステムとして PEI を用いたが、PEI の欠点を補うべく、リポソームやエクソソームも今後検証の余地があることが挙げられた。

昨今ゾルゲンスマといった遺伝子導入治療が臨床に応用されるようになり、治療法のプラットフォームとしてベクターを用いることは容認されるが、一方で敗血症モデルは急性疾患であり、目的細胞 (脾臓マクロファージ) に取り込まれ、効果を発揮させるためにモデル作成前に投与する必要があるので、改善すべき問題点も見られた。

2. 研究の目的

miRNA をベースとした核酸医薬を、より臨床応用可能な形に昇華させる為に、動物実験において pri-miRNA 発現ベクターを用いるところから、より即効性が期待される mature-miRNA を用いる事が適切であるかの検討を行う。また DDS として、化学物質である PEI の細胞毒性も懸念される為、より生体に害の少ないエクソソーム、リポソームの利用を検証する。

敗血症のような SIRS の状況で、本当に脾臓が直接的な治療目的臓器として有益であるかを確認するため、治療物質の直接的な脾臓内投与を行い、その生体内での分布、細胞の取り込みに関して、また治療効果に関して評価する。

全身炎症を基盤とした敗血症治療を目的としているが、miRNA ベースの核酸医薬開発と言う点で、他の炎症性疾患、線維化疾患に関しても応用を広げられるか検討を加える。

3. 研究の方法

(1) 脾臓内投与 (注射) による全身への影響の評価

通常生体内に存在しないと考えられる Cel-miR-39 及び、過去に治療的效果を確認している miR-146a を脾臓内に直接投与。全身臓器への分布を PCR にて確認するとともに、既報の全身投与で脾臓マクロファージに取り込まれていたことから、脾臓内でマクロファージを Sorting し、脾臓内での分布についても検証する。

(2) マウス敗血症モデル (CLP) モデルの作成と治療実験

CLP モデル作成と同時に、miR-146a を脾臓内に局所注射し、その 24 時間後に肝機能、腎機能を評価するとともに、生存曲線についても作成する。

(3) マウス敗血症モデル (LPS 腹腔内投与モデル) の作成と治療実験

CLP モデルの方が実際の敗血症をより模擬していると言われるが、モデル作成の手技が、様々な要因によって均一にならない恐れがあり、よりシンプルな LPS 腹腔内投与モデルにおいても、治療による臓器障害、生存率を評価する。

(4) 葉酸腎症モデルにおける miRNA 治療実験

尿細管への炎症、線維化を機序とする腎障害モデルに於いて、miRNA ベースの核酸医薬が奏功するかどうかについて検討を行う。

4. 研究成果

(1) 脾臓内投与 (注射) の影響

脾臓内に直接投与された miR-146a は、血流に乗り一部肝臓に流れるが、多くは脾臓内にとどまる。また、脾臓内から F4/80 陽性および陰性細胞を Sort し、miR-146a の発現を確認したところ、陽性細胞に優位に発現が増えており、投与した核酸は、主に脾臓内のマクロファージに取り込まれていることがわかった (図 1)。

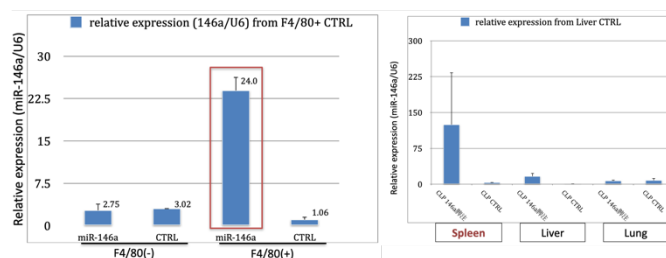


図 1

(2) CLP モデルにおける miR-146a 治療効果の検証

CLP モデル作成と同時に、miR-146a を脾臓内投与し、24 時間後の臓器障害を評価した (図 2)。治療群においてクレアチニン値は改善の傾向がみられたが、肝障害、LDH 上昇に関しては差がな

かった。ただし、生存率は逆に治療群で悪化するという結果であった。感染症の経過において初期の炎症はしっかり起きて、病原体を封じ込める、または除去すること、後期においては過剰な炎症反応、特に全身性のサイトカインストームが遷延しないことが重要であり、治療の強さ、時期の設定が鍵となる結果であった。

(3) LPS 腹腔内投与による敗血症 LPS 投与後 24 時間での BUN, Cr, AST, ALT, LDH, serum IL-6 を評価したが、治療群において IL-6 が低い傾向が見られるものの、いずれのパラメーターにおいても優位な改善は認めなかった。

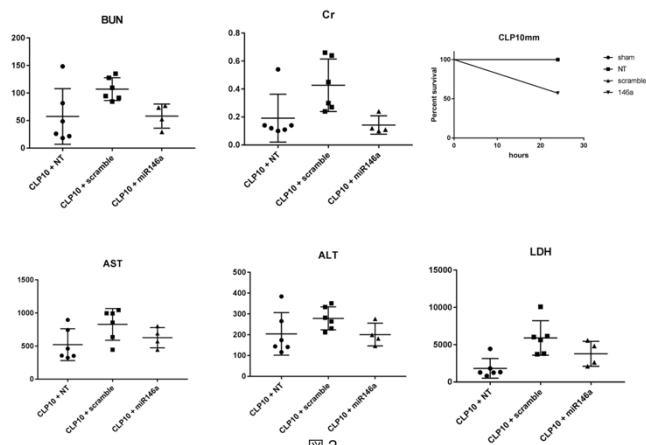


図 2

(4) 葉酸腎症モデルにおける抗線維化治療 腎線維化に対する miR-146a の有効性に関して過去に報告があり (Int J Nanomedicine. 2015 May 11;10:3475-88.), 葉酸腎症を作成し、Day0, 2, 4 に miR-146a を投与、7 日目に Sacrifice し評価を行った。結果は仮説に反して、治療群で腎機能が悪化した (図 3)。組織による評価においても、治療群で腎線維化が亢進しており、原因としては (2) に挙げたことと同様に、適度な炎症が起きなかったために障害が進行したのと思われた。

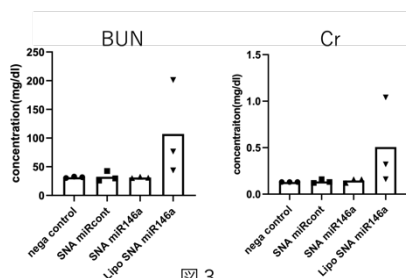


図 3

葉酸腎症モデルにおいては、NF- κ B の下流シグナルを負に制御して、抗炎症的に働く miR-146a は不適切と考えられ、他の候補 miRNA を検討した。

線維化の Regulator と考えられる TGF β を負に制御する候補として、miR192, miR-29b, miR-29c, miR-200b, miR-200c を挙げ、in vitro の系において TGF β 刺激下における α SMA の発現抑制効果について検討した。その結果、miR-200b 及び miR-200c において、 α SMA の優位な発現抑制を認めた。

そこで miR-200b を選択し、葉酸腎症作成後 Day2, 3 で、リポソームを DDS として経静脈的に投与。7 日目に Sacrifice し治療効果を評価したところ、腎機能に差を認めるには至らなかったが、組織上間質の線維化が抑制された。

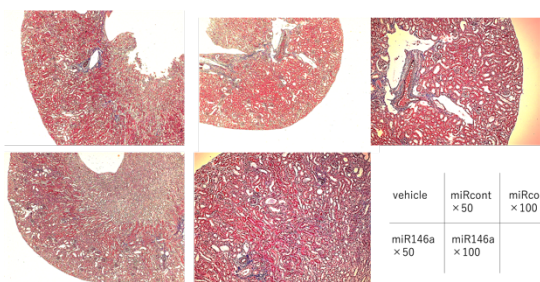


図 4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Funahashi Yoshio, Kato Noritoshi, Masuda Tomohiro, Nishio Fumitoshi, Kitai Hiroki, Ishimoto Takuji, Kosugi Tomoki, Tsuboi Naotake, Matsuda Naoyuki, Maruyama Shoichi, Kadomatsu Kenji	4. 巻 99
2. 論文標題 miR-146a targeted to splenic macrophages prevents sepsis-induced multiple organ injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1130 ~ 1142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41374-019-0190-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Noritoshi Kato, Fumitoshi Nishio, Takuji Ishimoto, Tomoki Kosugi, Shoichi Maruyama
2. 発表標題 Exosomes from CKD Patients Have Atherosclerogenic Properties
3. 学会等名 18th ASIANPACIFIC CONGRESS OF NEPHROLOGY
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshio Funahashi ; Noritoshi Kato; Takuji Ishimoto; Tomoki Kosugi; Shoichi Maruyama
2. 発表標題 NOVEL PATHOPHYSIOLOGIC ROLE OF MIR-146A FOR SPLENIC MACROPHAGE INTERFERENCE IN SEPSIS-RELATED KIDNEY INJURY
3. 学会等名 56th ERA-EDTA CONGRESS
4. 発表年 2019年

〔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	前田 佳哉輔 (Maeda Kayaho) (00836306)	名古屋大学・医学部附属病院・助教 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	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	丸山 彰一 (Maruyama Shoichi) (10362253)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	古橋 和拡 (Furuhashi Kazuhiro) (50835121)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901)	
研究分担者	勝野 敬之 (Katsuno Takayuki) (60642337)	愛知医科大学・医学部・准教授 (33920)	

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