

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08261

研究課題名(和文)人工呼吸器関連肺障害新生仔マウスを用いた新生児慢性肺疾患の病態解明

研究課題名(英文) Pathogenesis of neonatal chronic lung disease using neonatal mice with ventilator-associated lung injury

研究代表者

佐藤 真紀 (SATO, MAKI)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：50423794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウス新生仔用人工呼吸器を用いた研究を行う予定だったが、呼吸器の完成・導入が大幅に遅れたため培養細胞伸展装置を用いた実験を併行して行った。MLE12細胞を120%、1Hzで伸展を行った所、未伸展のコントロール群と比較し、伸展24時間で、microRNA(miR-34a, miR-21、TGFβ、IL-6のmRNAの発現が増加した。この結果は、in vivoでの実験を進める上で非常に重要な結果であった。今後は、当初予定していた動物実験を行ない、マウス肺でのmiRNAとmRNAの発現解析を行う予定である。また、miR-21抑制剤やmiR-34a抑制剤を用いたin vitro実験も行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本における総出生数は減少傾向にあるが、早産児や低出生体重児の割合は減少していない。超低出生体重児の生存率は改善していながらも、約30%は重症慢性肺疾患に至ると言われ、精神運動発達遅滞の併発率が高い。CLDの重要な病因の一つとされているのは人工呼吸器による圧損傷や量損傷などの肺傷害である。本研究では、未熟肺にかかる機械的ストレス(メカニカルストレス)とマイクロRNA(miRNA)に着目し、CLDの病態を解明することを目的とする。未熟児の後遺症なき救命のためには、CLDのさらなる病態解明と新規治療薬開発が急務であり、本研究によりCLDの新たなメカニズム解明と臨床応用への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：We planned to use a ventilator for neonatal mouse pups, but due to a significant delay in the completion and introduction of the ventilator, experiments using a cultured cell stretcher were conducted in parallel. microRNA(miR)-21, miR-34, TGFβ and IL-6 mRNA expression increased at 24 hours of extension compared to the unstretched control group. This result was very important for further in vivo experiments. We are now planning to conduct in vivo animal experiments as originally planned and analyze miRNA and mRNA expression in mouse lungs. We also plan to conduct in vitro experiments using miR-21 and miR-34a inhibitors.

研究分野：新生児

キーワード：新生児慢性肺疾患 人工呼吸器関連肺傷害 microRNA

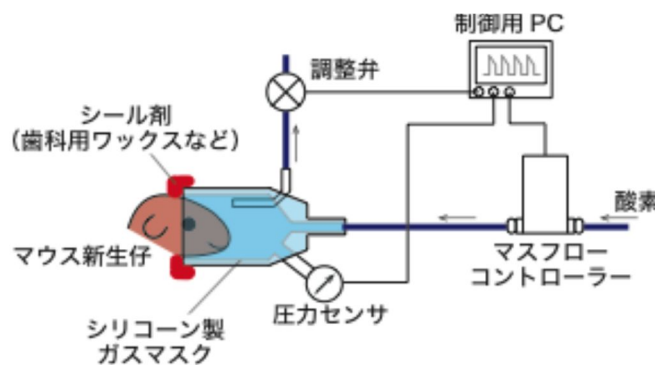
## 1. 研究開始当初の背景

新生児慢性肺疾患(chronic lung disease, CLD)は、未熟児にとって重篤な合併症の1つで、組織損傷による肺組織の線維化が本体である<sup>1)</sup>。CLDの重要な病因とされているのは人工呼吸器による圧損傷や量損傷などの肺傷害、酸素毒性と感染である。約30%の超低出生体重児が重症CLDに至り、精神運動発達遅滞の併発率が高い。未熟児の後遺症なき救命のためには、CLDのさらなる病態解明と新規治療薬開発が急務である。

体を構成するほぼすべての細胞は、生命活動において常に機械的ストレス(メカニカルストレス)を受けているが、各臓器のメカニカルストレスの受容については未だ不明な点が多い。本研究では、未熟肺にかかるメカニカルストレスとマイクロRNA(miRNA)に着目し、CLDの病態を解明することを目的とした。本研究によりCLDの新たなメカニズム解明と臨床応用への展開が期待される。

## 2. 研究の目的

(1) マウス新生仔用人工呼吸器を作製し、人工呼吸器関連肺傷害CLDマウスを作製する(下図)



(2) その肺におけるmiRNA発現解析を行い、発現変化しているmiRNAのうち、メカニカルストレスに関連する標的miRNAを同定する

(3) 標的miRNAの阻害剤、促進剤をCLDマウスに投与後、病理組織学的、生理学的に評価し、CLDの治療標的に成り得るかを検証する。

## 3. 研究の方法

(1) マウス新生仔用人工呼吸器作製

室内気飼育した新生仔マウスをコントロール群とする。CLD群、コントロール群の肺を採取し、直ちにRNA保存試薬に浸漬し保存する。

(2) miRNA発現解析と標的miRNAの同定

右肺はtotal RNAを抽出、左肺は蛋白抽出に用いる。RNA抽出にはmirVana miRNA Isolation kit(Ambion)を用いる。10ngのRNAをTaqMan Low Density Array Card(Applied Biosystems)を用いてmiRNA発現解析を行う。これらのmiRNAの発現結果から標的miRNAを同定し、CLDの治療標的を探索する。また、CLD関連蛋白について解析する。

(3) 標的miRNAに対する阻害剤、促進剤投与

CLDモデルマウスに標的miRNA阻害剤、促進剤を皮下投与し<sup>2)</sup>、CLD病変の変化を生理学的、分子生物学的、および病理組織学的に観察する。投与効果は標的miRNAが制御する遺伝子やタンパク発現などの分子生物学的評価を行う。

## 4. 研究成果

コロナウイルス感染蔓延に伴う行動制限により、マウス新生仔用人工呼吸器完成と導入に至るまでに、当初の予定より2年程度遅れ、2022年10月に完成した。現在、動物実験を施行中である。In vivoでの実験が遅れたため、in vitroでの実験を併行して行った。

マウスの肺上皮細胞(MLE12)を培養細胞進展装置に曝露し、機械的伸展をかけ、in vivoで行う予定であったmRNA・miRNAの発現解析を行った。

シリコンチャンバー(図1)にコラーゲンコーティング(cellmatrix 1-P®)を施し、細胞培養前にPBSで洗浄後、MLE12を $5 \times 10^5$  cells/4cm<sup>2</sup>/chamberで培養した。培養24時間後に、細胞がチャンバーの8割程度の面積に1層に培養されているのを確認後、細胞伸展装置(図1)にかける前に培地を交換した。細胞伸展装置はインキュベーター(37℃、CO<sub>2</sub> 5%)環境内に設置し、伸展強度・時間は120%、1Hz、24時間とした。培地交換時間を基準として、伸展時間を1、4、12、24時間で細胞を回収した。コントロール群は、培地交換から同時間伸展をかけていない細胞とした。

上記条件の細胞伸展で、時間経過とともにチャンバーからの細胞剥離は認めましたが、培養細胞はチャンバー面積の8割以上は維持できており、細胞数においても  $5 \times 10^5$  cells/4cm<sup>2</sup>/chamber ほどを回収できた。また、24時間伸展した細胞は、伸展方向に対して垂直に整列する傾向があった。

回収した細胞より Total RNA を抽出したところ、コントロール群では 60-120ng/μL ほど、ストレッチ群では 80-170ng/μL とストレッチ群濃度が高い傾向にあった。

Real time PCR で各種 mRNA ならびに miRNA の検索を行ったところ、型肺胞上皮細胞で発現するカルシウム依存性メカノレセプターチャネルである、transient receptor potential vallinoid4(TRPV4)は有意な変動は示さなかったにも関わらず、miR-34a, miR-21, TGFb, IL-6 の mRNA・miRNA の発現が増加していることが明らかになった(図2)。

この結果は、In vivo での実験を進める上で非常に重要となる結果であった。2022年11月に仔マウス用の人工呼吸器が完成した(図3)。現在は、当初予定していた in vivo 動物実験を行ない、マウス肺での miRNA と mRNA の発現解析を行う予定である。また、miR-21 抑制剤や miR-34a 抑制剤を用いた In vitro 実験も行う予定である。

図1

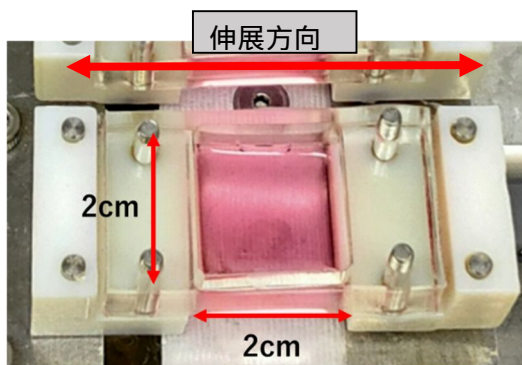


図3

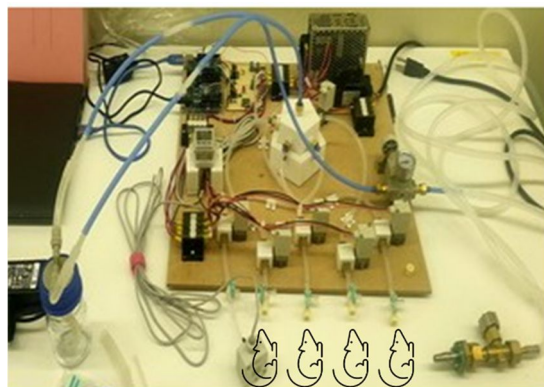
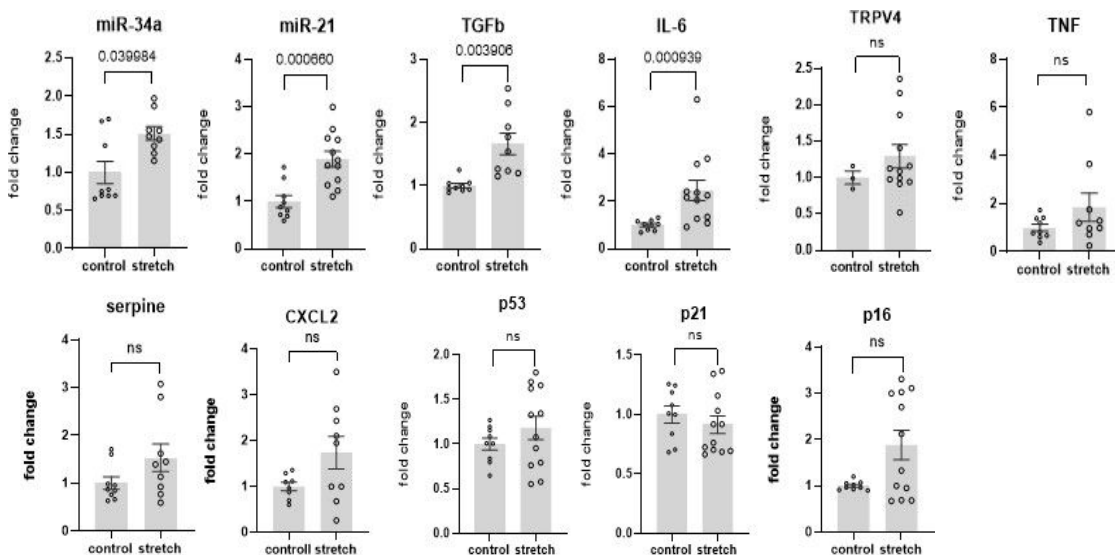


図2



< 引用文献 >

- 1) Children. 2017 Aug;24;4(9):75. DOI: 10.3390/children4090075
- 2) Blood. 2012 Aug;23;120(8):1678-86.

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	郷 勇人  (GO HAYATO)  (30443857)	福島県立医科大学・医学部・准教授   (21601)	
研究分担者	桃井 伸緒  (MOMOI NOBUO)  (10285033)	福島県立医科大学・医学部・教授   (21601)	
研究分担者	橋本 浩一  (KOICHI HASHIMOTO)  (50322342)	福島県立医科大学・医学部・准教授   (21601)	
研究分担者	吉野 大輔  (DAISUKE YOSHINO)  (80624816)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授   (12605)	

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