

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870620

研究課題名(和文)急性肺傷害が及ぼすマクロファージ内microRNA発現変化と遺伝子治療への展開

研究課題名(英文)The association between acute lung injury and microRNA expressions in macrophages

研究代表者

竹下 淳(Takeshita, Jun)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号：40433263

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)：本研究は、microRNAがALI/ARDS病態時の単球・マクロファージにおいて如何なる発現変化をするかということの主眼においた。始めに、単球系培養細胞(THP-1細胞)および分離マクロファージ細胞から炎症モデル(LPS負荷)を作成した。次に変化を認めたmiRNAの遺伝子導入し、過剰発現および抑制によってTNF- α 等の発現の変化を検討した。マクロファージ炎症モデルにおいてmiR-21などのmiRNAの変化を認め、リアルタイムPCR法にて定量を行った。miR-21をマクロファージに遺伝子導入した結果、Western blot法にてIL-10やP-Akt(P308)のタンパク発現増加を確認した。

研究成果の概要(英文)：We focused on microRNA expressions in macrophages and monocytes in the presence of acute lung injury (ALI) or acute respiratory distress syndrome (ARDS). In the first step, we prepared a macrophage (and THP-1 cell) inflammatory model by lipopolysaccharide (LPS) exposure, and analyzed microRNA expressions. In the second step, we investigated the changes in intracellular signaling molecules (e.g., TNF- α) with the transgenesis of microRNA using Nucleofector. The results of the first step showed the altered expression of miR-21 based on comprehensive analysis and the real-time PCR method. MiR-21 transgenesis induced the increased expressions of IL-10 and P-Akt (P308) proteins based on Western blotting.

研究分野：周術期学

キーワード：micro RNA 肺傷害

1. 研究開始当初の背景

透過性亢進型肺水腫を特徴とした急性肺傷害 / 急性呼吸窮迫症候群 (Acute Lung Injury / Acute Respiratory Distress Syndrome: ALI/ARDS) 初期における病態成立については未だ不明の点が多いが、その基本病態は肺における過剰炎症反応であり、活性化したマクロファージ系と多核白血球系双方の関与が大きいと考えられる。肺胞マクロファージはリンパ球、多核白血球、内皮細胞などの細胞に対しシグナルを伝達し、肺における免疫系の中核として機能していると予想される。これまで我々は ALI/ARDS の病態成立において、アポトーシス関連因子も大きく関与している可能性を報告してきた。その中でも Fas/FasL 機構は、肺胞上皮細胞の細胞死及びそれに伴う血管透過性亢進に関与している。特に、当教室は炎症初期のマクロファージが産出する FasL 等と ALI/ARDS の関連や、炎症後期の炎症治癒におけるマクロファージの役割に注目してきた。

近年 miRNA が、ガンや生活習慣病、神経疾患、感染症など、ヒトの疾患の病因に関与することが報告されている。そして、最近、単球系細胞から産出されるサイトカイン産生に関して miRNA の発現が関与していることが報告されている。(J Immunol 2011;186;1723-34, Blood 2011; 117; 6172-83) その報告によると、LPS 刺激によるサイトカイン産生に関して、miR-146a, miR-142-3p の発現を人為的にノックダウンまたは阻害することでサイトカインの過剰産生が起こり、敗血症における致死率が上昇するとされている。

我々は miRNA の定量的発現を解析するため、リアルタイム PCR 法 (Taqman MicroRNA,

Applied Biosystems 社) を用いた予備実験により、単球系培養細胞 (THP-1 細胞) に LPS 負荷を与えた経時的な変化において、miR 21, miR-146a, miR-142-3p の発現が上昇した。また、これらの miRNA は、FasL, TNF- 発現に関連する細胞内情報伝達物質と対合できる塩基配列を持つことをデータベースで確認した。さらに miR 21 を単球系細胞に過剰発現させるため miR mimics を遺伝子導入すると FasL の細胞からの分泌(soluble FasL) が抑制され、miR inhibitor を遺伝子導入すると FasL (soluble FasL) が過剰分泌することを予備実験で確認した。

2. 研究の目的

近年、遺伝子発現を調節するのに大きな役割を演じることが知られている microRNA が ALI/ARDS 病態時の単球・マクロファージにおいて如何なる発現変化をするか解析し、microRNA に関連した遺伝子導入により ALI/ARDS に対し将来の遺伝子治療法になるかを In Vitro, In Vivo の実験系により探求することである。

3. 研究の方法

(1) ALI/ARDS における miRNA の経時的発現の変化の検討

In Vitro 系: 単球系培養細胞 (THP-1 細胞) およびヒトから分離したマクロファージ細胞に LPS 負荷を行った炎症モデルにおける miRNA の経時的な発現変化の確認を Ion PGM システムを用いて行うとともに、発現変化を認めた miRNA の定量を行う (リアルタイム PCR 法)。

In Vivo 系: LPS を用いた ALI/ARDS マウスモデルを用いて miRNA の経時的な発現変化を Ion PGM システムを用いて行うとともに、発現変化を認めた miRNA の定量を行う (リアル

タイム PCR 法)。

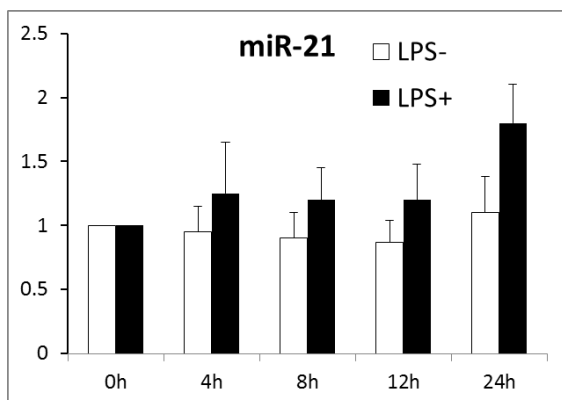
(2)ALI/ARDSにおけるmiRNAによる制御の検討

(1)において変化を認めたmiRNAの遺伝子導入による過剰発現および抑制によってFasL、TNF-等の発現の変化を検討することで、miRNAの発現がどのような影響を及ぼしているかを検討する。

4. 研究成果

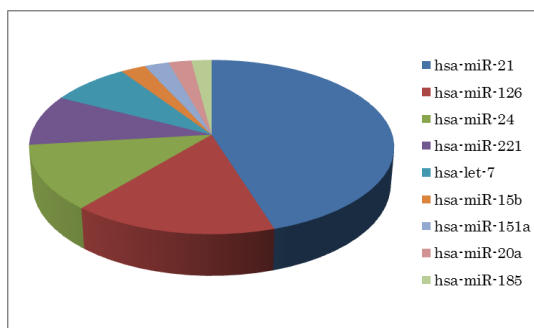
(1)ALI/ARDSにおけるmiRNAの経時的発現の変化の検討

マクロファージ炎症モデルにおいてmiR-21などのmiRNAの変化を認め、リアルタイムPCR法にて定量を行った。LPS投与24時間においてmiR-21では経時的に増加する傾向にあった。その他のmiRNAについても現在定量を進めているところである。



また、今後ALI/ARDSマウスモデルにおけるこれらのmiRNAの経時変化も観察する予定であるが、LPS投与量や観察時間などの検討に時間を要するために、本格的な稼働段階に至っていないのが現状である。

それらの検討項目をなるべく早期に決定することが喫緊の課題である。



Ion PGMシステムを用いたmiRNA解析(上図)では、同様にmiR-21の増加が認められている。こちらについては、他のmiRNAの関わりなどが無いのか、サンプル数を増加させて検討していく予定である。

(2)ALI/ARDSにおけるmiRNAによる制御の検討

上記の結果より、miR-21をマクロファージにNucleofector™法による遺伝子導入を行った。miR-21の過剰発現、抑制により、FasL、TNF-発現およびこれらに関連する細胞内情報伝達物質の変化を観察した。現在のところmiR-21の導入によりWestern blot法を用いてIL-10やP-Akt(P308)のタンパクレベルでの発現増加を確認した。その他の細胞内情報伝達物質についても今後同様にWestern blot法等で確認予定である。

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〕

出願状況(計0件)

該当なし

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0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〕

該当なし

6．研究組織

(1)研究代表者

竹下 淳 (Takeshita Jun)

京都府立医科大学 医学(系)研究科(研
究院)客員講師

研究者番号：40433263