

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 18 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461204

研究課題名(和文) 間質性肺炎におけるマイクロRNA、エクソソームを介する病態の解析と臨床応用

研究課題名(英文) MicroRNA and exosome in interstitial pneumonia

研究代表者

功刀 しのぶ (Kunugi, Shinobu)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：30350036

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)：マウスブレオマイシン肺臓炎モデルを作成し、正常肺と線維化期21日目での、血清、気管支肺胞洗浄液、肺組織の検討でのマイクロRNAの検討を行った。特に気管支肺胞洗浄液では、エクソソーム分画とそれ以外に分け、電顕的観察も加えて検討を行った。線維化期において、気管支肺胞洗浄液のそれぞれの分画でmiR-150の増加を認めた。

研究成果の概要(英文)：We performed micro RNA analysis of serum, bronchoalveolar lavage, and lung tissue of bleomycin-induced pneumonitis in mice. Particularly, We analyzed exosomal fraction and others fraction of bronchoalveolar lavage. In fibrotic stage, the elevation of miR-150 were confirmed.

研究分野：人体病理学

キーワード：気管支肺胞洗浄液 マイクロRNA エクソソーム II型肺胞上皮 間質性肺炎

1. 研究開始当初の背景

miRNA が転写後の遺伝子発現を調節する分子として注目を集め、さらに miRNA は細胞が分泌するエンドソーム由来の小胞顆粒であるエクソソームに含まれている事が報告されている。細胞間伝達の一つとして、また血中、尿や腹水・胸水等の体液に含まれるエクソソーム由来 miRNA の解析による疾患のバイオマーカーの同定の可能性が模索されている。サルコイドーシスにおいて、気管支肺胞洗浄液中のエクソソームの存在 (Qazi KR, et al. *thorax*65:1016-1024,2010) が報告されている。呼吸器疾患と miRNA との関わりは、肺癌では、連携研究者の清家らが肺癌手術組織 (106 例) を用いた解析で、肺腺癌患者の予後と相関する miRNA (miR-155,let-7a) の同定 (Yanaiharu N, Seike M, et al. *Cancer Cell*. 2006) や細胞株を用いた解析で、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤; EGFR-TKI 感受性に miR-21 が関与していることを明らかにし、EGFR-TKI 耐性化の克服に関する新たな知見を報告した (Seike M, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009)。肺線維症では、マウスプレオマイシン肺臓炎モデルにおいて、mir21 の高発現が見られ、線維芽細胞に発現している報告 (J. Exp. Med. 207(8) 1589-1597, 2010) や、mir 29 の発現が減少している (Pandit KV et al. *Am J Respir Crit Care Med* 182. 220-229, 2010) との報告がなされている。私達は、間質性肺炎の早期肺胞腔内線維化巣に侵入する間質細胞と肺胞上皮の再生、血管形成の程度で種々の病態が形成されることを示してきた (Am J Pathol 118: 452-75, 1985, Am J Pathol 137: 415-424, 1990)。エクソソームは脂質二重膜で囲まれた膜小胞で、分泌細胞由来の膜蛋白質と細胞質成分で構成され、後期エンドソームである多胞性エンドソーム (multi-vesicular endosome: 以下 MVB) と呼ばれる細胞内小胞の中で産生され、MVB が細胞膜と融合することにより細胞外に放出される。II 型肺胞上皮には、サーファクタントの貯蔵、分泌に関係するリソソーム関連細胞小器官、**ラメラ体**を有することは有名で、サーファクタントの一つ **SP-D** は間質性肺炎の病態マーカーとして臨床応用されている。ラメラ体は、リソソーム関連蛋白を有する他、後期エンドソーム関連蛋白の発現も報告され (Wasano K et al: *Histochemistry* 102,329-335,1994) 電顕的にラメラ体の成熟過程で MVB と癒合する事が報告されている (Weaver TE et al: *Cell & Developmental Biology* 13:263-270,2002)。私達は、間質性肺炎における分泌型 miRNA やエクソソーム由来 miRNA の主たる由来細胞の一つとして、肺胞上皮細胞の重要性を考え、マウスプレオマイシン肺線維症モデルを用いて、気管支肺胞洗浄液中からのラメラ体の抽出気管支肺胞洗浄液中のエクソソームの解析と組織の比較を行った。に用いる分画遠心法を応用し、

エクソソームの抽出を行いエクソソームの存在を確認している (図 1)。

2. 研究の目的

本研究では、プレオマイシン肺臓炎モデルにおける線維化形成過程に関わる血清及び気管支肺胞洗浄液中のマイクロ RNA (microRNA; 以下 miRNA)、エクソソーム由来 miRNA を同定し、主たる由来細胞の解明とその機能解析を行い、間質性肺炎の血清、気管支肺胞洗浄液の病態マーカーとへの臨床応用を目的とする。エクソソームの抽出を行いエクソソームの存在を確認している (図 1)。

3. 研究の方法

プレオマイシン肺臓炎モデルを用い、肺組織の miRNA の網羅的スクリーニングと血清、気管支肺胞洗浄液のエクソソームの抽出と組織でスクリーニングされた miRNA についてエクソソーム由来 miRNA の解析を行う。血清・気管支肺胞洗浄液のエクソソームは、免疫電顕的手法を用い、エクソソームの由来細胞の同定を行う。また高分解質量分析によるタンパク質解析を合わせてバイオインフォマティクス的手法により統合解析し、肺線維化に関わる血清・気管支肺胞洗浄液 miRNA/エクソソーム由来 miRNA の同定とその標的遺伝子およびタンパク質を同定する。高発現が見られた miRNA においては、antisense probe をマウスに気管内投与後のプレオマイシン肺臓炎を検討する。臨床応用を考え、ヒト ARDS, 肺線維症のパラフィン切片の miRNA In situ hybridization を行う。

4. 研究成果

マウスプレオマイシン肺臓炎モデルにおいて、正常と線維化期 21 日のエクソソームの分画とそれ以外の分画の電顕的確認 (図 1) 及び RNA 量 (表 1) の測定を行った。

線維化期 2 日では、II 型肺胞上皮内に多数のラメラ体と MVB の癒合像が確認された (図 2)。気管支肺胞洗浄液のエクソソーム分画とそれ以外の分画の miRNA を抽出し、RT-PCR array を行った。miR-150-5p の上昇が見られ、線維化に関わる因子と推察された。

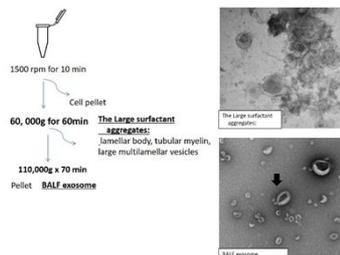


図 1: 気管支肺胞洗浄液分画方法とその電顕像.

	The Large surfactant aggregates	BALF exosome
Normal	270pg/ul	281pg/ul
BLM 21	2040pg/ul	107pg/ul

表 1: 気管支肺胞洗浄液分画 RNA 量
線維化期において、エクソソーム分画由来の RNA 量に変化はなかった。

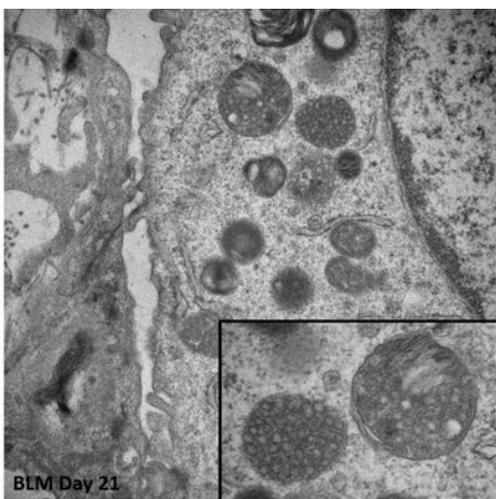


図 3 肺胞上皮電顕像
(ブレオマイシン肺臓炎線維化期 21日)
ラメラ体と後期エンドソームである多胞性エンドソーム (multi-vesicular endosome: MVB) との癒合が確認された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Role of canstatin in early fibrotic lesions of idiopathic interstitial pneumonias and migration of lung fibroblasts Terasaki Y, Nagasaka S, Kokuho N, Terasaki M, Kunugi S, Int J Clin Pathol 9(12):12714-12722,2016.

Localized Pulmonary Crystal-storing Histiocytosis Complicating Pulmonary Mucosa-associated Lymphoid Tissue Lymphoma Presenting with Multiple Mass Lesions Kokuho N, Terasaki Y, Kunugi S, Terasaki M, Hum Pathol. in press DOI:10.1016/j.humpath.2016.10.028

Pulmonary mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma associated with pulmonary sarcoidosis: a case report and literature review. Kokuho N, Terasaki Y, Terasaki M, Kunugi S, Hum Pathol. 51:57-63. 2016

DOI:10.1016/j.humpath.2015.12.019
Inter-Observer Agreement of Usual Interstitial Pneumonia Diagnosis Correlated with Patient Outcome Terasaki Y J Arch Pathol Lab Med. 2016 Sep 9. DOI:10.5858/arpa.2016-0012-OA

間質性肺炎の早期線維化巣における canstatin の発現とその作用の解析 寺崎泰弘, 國保成暁, 寺崎美佳, 功刀しのぶ, びまん性肺疾患に関する調査研究 平成 27 年度研究報告書 (査読無) p129-135 3月 2016 年
びまん性肺疾患の分類と診断「病理診断と問題点」特集ここまで進んだ! びまん性肺疾患の診断と治療 寺崎泰弘 (査読無) 内科 南江堂 p205-209, 2月 2016 年

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 3 件)

びまん性肺疾患の分類と診断「病理診断と問題点」特集ここまで進んだ! びまん性肺疾患の診断と治療 寺崎泰弘 (査読無) 内科 南江堂 p205-209, 2月 2016 年
上気道、肺、胸膜・縦隔 寺崎泰弘 集中講義病理学 改訂第 2 版メジカルビュー (査読無) p180-193, 6月 2016 年
循環器 集中講義病理学 功刀しのぶ 改訂第 2 版メジカルビュー (査読無)

[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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

功刀 しのぶ (KUNUGI SHINOBU)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号：30350036

(2) 研究分担者

寺崎 泰弘 (TERASAKI YASUHIRO)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50332870

(3) 連携研究者

三宅 弘一 (MIYAKE KOUICHI)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90267211

連携研究者

永坂 真也 (NAGASAKA SHINYA)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：00573239

連携研究者

寺崎 美佳 (TERASAKI MIKA)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：0050372785

連携研究者

清家正博 (SEIKE MASAHIRO)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：0030366687

連携研究者

石川 亜梨美 (ISHIKAWA ARIMI)
日本医科大学・医学部・研究員
研究者番号：0040598992
連携研究者

桑原 尚美 (KUWAHARA NAOMI)
日本医科大学・医学部・研究員
研究者番号：00599011

(4) 研究協力者

()