

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860850

研究課題名(和文) 新生児慢性肺疾患の重症化に関わるマイクロRNAの同定と臨床応用への検討

研究課題名(英文) miRNA profiling in serum exosome of premature infant with bronchopulmonary displasia and mouse lung exposed to hyperoxia.

研究代表者

郷 勇人 (Go, Hayato)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30443857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：慢性肺疾患(BPD)モデルマウス肺と患児の血清中エクソソームを用いたmiRNAプロファイルを行った。エクソソームmiRNA解析では、全例で発現していた45個のmiRNAの中でmiR-21が、BPD児で日齢28に有意に増加していた。

BPDモデルマウス肺のmiRNAアレイ解析では、6個のmiRNAの発現が有意に増加し、4個のmiRNAの発現が有意に低下していた。この結果、BPD罹患児の血清エクソソームとBPDモデルマウス肺で共通して発現が増加していたmiR-21をBPDの標的miRNAと同定した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed miRNA profiling to validate identified miRNAs as potential biomarkers for BPD (bronchopulmonary displasia) using serum exosome in premature infants and neonatal mouse lung exposed to hyperoxia. In human miRNA array, we identified 45 miRNAs were universally expressed in BPD patients and non BPD patients. miR-21 was upregulatd in BPD patients on DOL28.

In BPD mouse model, 6 miRNAs were upregulated and 4 miRNA were downregulated. miR-21 was detected as common miRNA that changed among BPD patients and BPD mouse model.

研究分野：新生児慢性肺疾患

キーワード：microRNA miR-21 新生児慢性肺疾患

1. 研究開始当初の背景

新生児慢性肺疾患は、日齢28日を超えても、酸素投与を必要とするような呼吸窮迫症状が持続する、未熟児にとって重篤な合併症の一つである。本疾患は、未熟肺への組織損傷による肺組織の線維化が本体であり、出生前後の様々な因子が加わり発症、重症化する。ステロイド投与、人工サーファクタント投与、利尿剤などの治療によっても超低出生体重児の約30%が重症慢性肺疾患に至る。本疾患は精神運動発達遅滞の併発率が高く、在宅酸素療法を要したり、呼吸器感染の併発により再入院する場合が多い。未熟児の後遺症なき救命のためには、本疾患の発症、重症化のメカニズムを解明し、新たな治療法を探索しなければならない。miRNAは蛋白質と複合体を形成して、標的となる mRNAの3'UTR(非翻訳領域)に結合し、mRNAの翻訳を阻害する18-25塩基長の一本鎖RNAで線虫で初めて発見された。現在、哺乳類を含めた他の生物種に1000種類以上ものmiRNAが保存されており、哺乳類の発生、器官形成や、癌、感染症、生活習慣病などのさまざまな病態にも関与し、近年注目を集めている。

miRNAは22塩基程度のRNAであり、標的mRNAの分解し、様々な生命現象や疾患の発症・進行に関わっている。また、miRNAは組織だけでなく、細胞が分泌するエクソソームと呼ばれる100nmの小胞にも安定して存在しているため、エクソソームmiRNAは疾患バイオマーカーとして注目されている。

2. 研究の目的

本研究では、未だ明らかにされていない本疾患の発症や重症化のメカニズムについて、マイクロRNA(以下miRNA)に重点をおき、本疾患罹患児の血液検体と本疾患モデルマウス肺を用いて、発症や重症化に関わる標的miRNAを同定する。さらに、標的miRNAの阻害剤(inhibitor)をマウスに投与し、その効果を分子生物学的、呼吸生理学的、病理組織学的に検討する。

3. 研究の方法

生後7日間の高濃度酸素暴露により、これまで申請者が用いた本疾患モデルマウスよりも重症度の強いモデルマウスを作製し、その肺を用いてmiRNAアレイを行う。併行して、ご家族から本研究への同意が得られた患児の血液検体(臍帯血、日齢28、修正36週)を用いて、miRNAアレイを行い、本疾患の発症や重症度に関わり、かつヒトとマウスで共通して

発現する標的miRNAを同定する。以降は標的miRNAのinhibitorを新生仔マウスに経静脈投与し、標的miRNAの変化や呼吸生理学的、病理学的変化を検討する。

1) より重症度の強い新生児慢性肺疾患モデルマウスの作製(FiO₂ 95%、7日間) 生後12時間以内のC57BL/6マウスを酸素チャンバー内に母マウスと共にケージごと入れ、高濃度酸素(FiO₂ 0.95)に7日間暴露した。

2) 慢性肺疾患患児からの血液検体採取 在胎期間32週、出生体重1500g未満で出生した患児を対象とし、臍帯血、日齢28と修正36週の血液(100μl)を採取する。

3) 各検体からのTotalRNA抽出とRNAの品質チェック

miRNA解析には品質の良いRNAが必要なため、マウス肺は日齢7に採取後、直ちにRNA保存試薬(RNA later, Ambion)に浸漬する。ヒト血液検体は採取後、直ちに血清を分離し、-80°Cで冷凍保存する。RNA抽出後、2100バイオアナライザ(Agilent)にて、RNAの品質がRNA Integrity Numberが国際基準の7.0以上の検体を選定した。

4) miRNAアレイと発現プロファイルの検討 TaqMan Low Density Array rodent, human Card A and Card B(Applied Biosystems)にてアレイを行い、Expression Suite Software(Applied Biosystems)にて約700種類のmiRNAの発現量を定量PCRにより測定した。

5) 標的miRNA inhibitorの新生仔マウスへの投与

出生後12時間以内に標的miRNAのinhibitorとnegative controlを皮下投与する。Inhibitorには、Exqion社のLocked Nucleic Acid modified miRNA inhibitorを用いる。上記のすべての研究は、福島県立医科大学倫理委員会の承認を得て行った。

4. 研究成果

1) これまで我々が使用してきた、3日間の高濃度酸素暴露ではなく、7日間の高濃度酸素を暴露し、病理組織学的により重症度の強い慢性肺疾患モデルマウスを作成した。

2) また、重症慢性肺疾患モデルの体重増加は日齢4以降に緩やかになった。(Figure1)

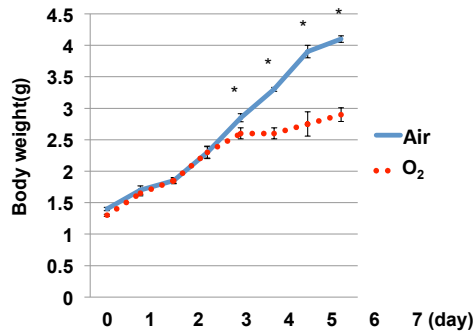


Figure 1. Body weight gain rate in hyperoxia was significantly lower than in control. (n=5-15) * P<0.05

3) マウス肺を用いた miRNA アレイ解析の結果、10 種類の miRNA (miR-21, miR-29ab, miR-221, miR-682, miR-692, miR-712, miR-335-3p, miR-449ab, miR-383, miR-503) が有意に変化していた。(Figure2)

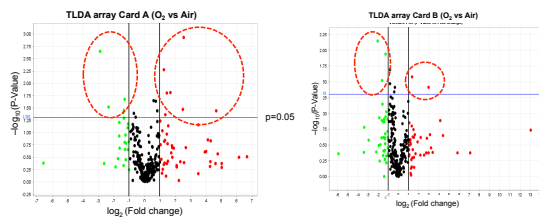


Figure 2. In BPD mouse model, 7 miRNAs (miR-21, miR-29ab, miR-221, miR-682, miR-692, miR-712) were upregulated and 5 miRNAs (miR-335-3p, miR-449ab, miR-383, miR-503) were downregulated. miR-21 was detected as common miRNA that changed among BPD patients and BPD mouse model. X-axis means log₂(Fold change). Y-axis: 1.301 of -log₁₀(P-Value) means p=0.05. n=3.

4) 慢性肺疾患罹患児、非罹患児の血中から血清を分離し、血清中からエクソソームを抽出した。エクソソームの蛋白を抽出後、ウェスタンブロットにて CD9、CD63 の発現を確認した。これにより、早産児の血中からエクソソームを抽出できることを確認できた。(Figure3)

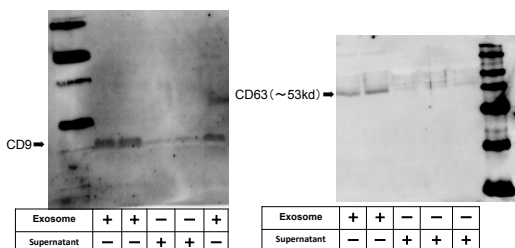


Figure 3. Western blot of CD9 and CD63.

5) 慢性肺疾患罹患児 (n=3) と非罹患児 (n=3) から血清エクソソームから抽出した total RNA を用いて、miRNA プロファイルを行った結果、すべての患児で発現している miRNA は 45 種類認め、そのうち慢性肺疾患罹患児で有意に発現変化している miRNA のうち、マウス肺でも同様に発現変化している miRNA は miR-21 であった。(Figure4)

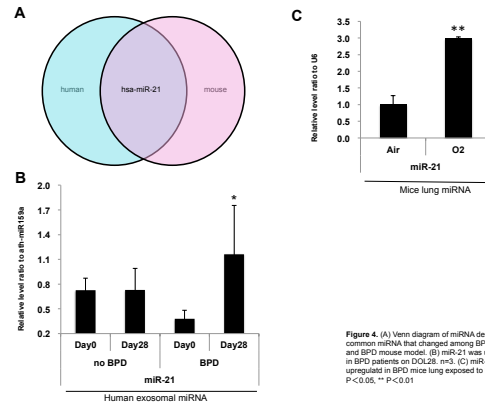


Figure 4. (A) Venn diagram of miRNA detected as common miRNA that changed among BPD patients and BPD mouse model. (B) miR-21 was upregulated in BPD patients on DOL28. n=3. (C) miR-21 was upregulated in BPD mice lung exposed to hyperoxia. * P<0.05. ** P<0.01

6) miR-21 inhibitor のマウスへの皮下投与を行っているが、10mg/kg の投与では抑制効果を得られなかった。したがって、高用量の miR-21 inhibitor を投与し、病理組織学的評価や生理学的評価を行うことが今後の課題として残った。

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 4 件)

1. Go H, Ping La, Namba F et al. (2016) MiR-196a regulates heme oxygenase-1 by silencing Bach1 in the neonatal mouse lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 311:L400-L411
2. 郷 勇人 (2016) 感染症とマイクロ RNA. *周産期医学* 11月号.
3. Maeda H, Go H, Momoi N(5) et al. (2016) Plasma TGF-β1 Levels Are Elevated in Down Syndrome Infants with Transient Abnormal Myelopoiesis. *Tohoku J Exp Med.* 240(1):1-5.
4. Imamura T, Sato M, Go H et al. (2016) The Microbiome of the Lower Respiratory Tract in Premature Infants with and without Severe Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J Perinatol.* 20 [Epub ahead of print]

[学会発表] (計 2 件)

1. 郷 勇人, 前田創, 佐藤真紀, 桃井伸緒, 細矢光亮. 重症慢性肺疾患モデルマウス肺におけるマイクロ RNA プロファイリング. 第52

回日本周産期新生児学術集会. 2016年7月16日～18日. 富山.

2. Hayato Go, Fumihiko Namba, Nobuo Momoi, Mitsuaki Hosoya. miRNA profiling in serum exosome of premature infants with bronchopulmonary displasia and mouse lung exposed to hyperoxia. 2017 PAS meeting. 2016年5月6日～9日、サンフランシスコ(米国).

[図書] (計0件)

[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

郷勇人 (Go Hayato)

福島県立医科大学総合周産期母子医療センター 助教

研究者番号：30443857