

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 大津 裕
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 1110 号
学位授与の日付 令和5年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 低酸素低糖刺激後ヒト末梢血単核球エクソソーム中の miR-155-5p の低下

論文審査委員 主査 教授 五十嵐 博中
副査 教授 藤井 幸彦
副査 准教授 清水 宏

博士論文の要旨

【背景と目的】

近年、脳梗塞患者の機能回復を促進する方法として、細胞療法が注目されている。申請者の研究室では、低酸素低糖刺激 (oxygen-glucose deprivation, OGD) を加えたラット末梢血単核細胞 (OGD-PBMC) が組織保護的な極性に変化し、脳梗塞ラットに経頸動脈投与することで脳内の血管内皮増殖因子 (VEGF) 増加を介して脳梗塞治療効果を有することを過去に示した。一方で、低酸素条件下では、低酸素誘導因子 (HIF-1 α) の増加により VEGF が増加することも報告されているが、OGD-PBMC で HIF-1 α を介した系が働いているかは検証されていなかった。また、OGD-PBMC と脳内常在細胞との細胞間相互作用の機序は明確ではなかった。そこで、OGD-PBMC の脳梗塞に対する治療効果の機序について、細胞間相互作用にエクソソームが関与していると想定し、HIF-1 α 発現と VEGF 分泌に関わる miRNA に注目して検討した。

【方法】

ヒト OGD-PBMC を一過性局所脳梗塞モデルラットに経頸動脈投与して、脳内への生着を検証した。さらに、ミクログリアに対する極性変化の誘導の有無を、抗 VEGF 抗体を用いて蛍光免疫染色で検証した。次に、通常培養を行なった PBMC (Normoxic-PBMC)、OGD-PBMC それぞれのエクソソーム由来の 200bp 以下の RNA を濃縮し、HIF-1 α の発現に関与する miRNA を比較した。その結果を踏まえ、HIF-1 α と VEGF を増加させる可能性のある miRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド投与による阻害を行い、Normoxic-PBMC と OGD-PBMC における HIF-1 α と VEGF の発現をウエスタンブロッティングとルミネックスアッセイで評価した。

【結果】

ヒト OGD-PBMC は、投与3日後には梗塞部位周囲で確認されたが、投与21日後には確認されなかった。一方、VEGF を発現しているミクログリアは Normoxic-PBMC 投与群に比して、OGD-PBMC 投与群で 3.9 倍に増加した ($P < 0.05$)。解析した 2632 個の miRNA の中で、Normoxic-PBMC に比して、OGD-PBMC において、7.0%が増加し、7.4%が減少していた。その中で、HIF-1 α または VEGF の発現増加に関わるとして単離されている miRNA では、唯一 miR-155-5p が、Normoxic-PBMC と比して、OGD-PBMC では 0.37 倍にダウンレギュレートしていた ($P = 0.01$)。miR-155-5p 阻害を行ったヒト OGD-PBMC では、HIF-1 α の発現が 3 倍に増加した ($P < 0.05$)。また、VEGF の発現も 1.36 倍に増加した ($P < 0.05$)。一方、Normoxic-PBMC では miR-155-5p 阻害にて HIF-1 α

の発現は検出されなかった。

【考察】

低酸素条件下では、HIF-1 α の増加により VEGF が増加することが知られている。また、miR-155 は、HIF-1 α mRNA の 3' -UTR に結合し、HIF-1 α の発現量を抑制する。そして、miR-155-5p の低下は、ミクログリアや幹細胞、がん細胞において、低酸素条件下で、VEGF の増加を介して血管新生を促進し、組織保護的な極性変化を起こすとされている。本知見はそれを OGD-PBMC に拡張した。これらより、OGD-PBMC の虚血脳組織保護効果の分子機序の一つとして、miR-155-5p-HIF-1 α -VEGF 系の関与があると考えた。

一方、何故、OGD 刺激によって、miR-155-5p が減少するのかは、明確ではない。高血糖状態では、NF- κ B、AP-1、STAT3 を介して、miR-155-5p は増加すると考えられている。また、Normoxic-PBMC では miR-155-5p の阻害により HIF-1 α の発現増加は認めなかった。このことから miR-155-5p を介した HIF-1 α の発現増加が血糖依存性に変化する可能性がある。

最後に、投与した OGD-PBMC は脳内に長期生着しなかった。一方、ミクログリアでの VEGF 発現は増加し、かつ継続した。このことから、OGD-PBMC からミクログリアに情報が伝達され、それがミクログリアで継続していると想定した。今回の研究では、OGD-PBMC 由来のエクソソームが、ミクログリアに影響した可能性を示唆する。今後、OGD-PBMC 由来のエクソソーム投与で PBMC やミクログリアでの極性変化が誘導されるか、さらに何故、それが持続するのか、極性が変化したミクログリア由来のエクソソームの検討を行う必要がある。

【結論】

脳梗塞に対して組織保護効果をもつ OGD 刺激後 PBMC では、エクソソーム中の miR-155-5p の減少を認めた。miR-155-5p の減少は転写因子 HIF-1 α 発現を増加させ、VEGF の分泌を増加する。さらに、OGD-PBMC の神経保護効果の分子機序として、エクソソームを介した miR-155-5p-HIF-1 α -VEGF の系を見出した。

審査結果の要旨

脳梗塞病変に対する実験的末梢血単球移植に際し、低酸素低グルコース刺激を加えた単球(OGD-PBMC)は組織保護効果を有し、その機序は HIF-1 α により増加した VEGF がその効果の主体と推察され、申請者はこの点を明らかにするために一過性 MCA 閉塞ラットモデルでの VEGF の広がりおよびエクソソーム由来の RNA 解析を行った。

VEGF を発現しているミクログリアは control-PBMC 投与群に比して、OGD-PBMC 投与群で 3.9 倍に増加した。解析した 2632 個の miRNA の中 miR-155-5p が control-PBMC と比して、OGD-PBMC では 0.37 倍にダウンレギュレートしていた。miR-155-5p 阻害を行ったヒト OGD-PBMC では、HIF-1 α の発現が 3 倍に増加した。また、VEGF の発現も 1.36 倍に増加した。

本研究においては OGD-PBMC エクソソームにおける miR-155-5p がミクログリアの VEGF 増加作用を阻害することを明らかにしており、今後の虚血性脳疾患の治療の展開が望め臨床に寄与すること大である。よって博士論文として妥当であると判断した。