

主論文の要約

**miR-146a Targeted to Splenic Macrophages
Prevents Sepsis-induced Multiple Organ Injury**

脾臓マクロファージへの miR-146a 導入は
敗血症に伴う多臓器障害を抑制する

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 腎臓内科学分野

(指導：丸山 彰一 教授)

船橋 嘉夫

【緒言】

敗血症は、感染に対する宿主の過剰な炎症反応により、生命を脅かす臓器障害が引き起こされた病態である。特に急性腎障害を伴う敗血症は予後不良である。敗血症においては Toll-like receptor (TLR) /nuclear factor kappa B (NF- κ B) 経路の関与が指摘されており、同経路の活性化は cytokine storm を惹起し、最終的に多臓器不全に至る。一方、microRNA (miRNA) は 20~30 塩基対で構成された non-coding RNA で、mRNA の特定の部位に部分相補的に結合することで、蛋白合成を阻害する役割を持つ。我々は miRNA を用いた敗血症の新規治療戦略の可能性を *in vivo* 及び *in vitro* で検討した。

【対象と方法】

In vitro において、TLR/NF- κ B 経路を阻害する各種 miRNA を RAW264.7 細胞に transfection した後に、1mg/ml の Lipopolysaccharide (LPS) にて刺激を行ない、蛋白及び遺伝子発現等を解析した。*In vivo* において、polyethyleneimine (PEI) を Drug Delivery System (DDS) として用い、miRNA-146a (miR-146a) 発現 plasmid を、10-12 週齢の雄性 C57BL/6 マウスに経静脈投与した。Plasmid 投与 7 日目に、cecum ligation and puncture (CLP) により敗血症を誘導し、生命予後、臓器障害の重症度、及び plasmid の分布等を解析した。生体内での分布を追跡するため、enhanced green fluorescence protein (EGFP) をコードした plasmid を用いた。

【結果】

1 : *In vitro* における、各種 miRNA の LPS 刺激に対する効果

既報から TLR/NF- κ B 経路を抑制し得る miRNA を選択し、miR-16、miR-126、miR-146a、miR-200b または miRNA の scramble control を transfection した RAW264.7 細胞を LPS で刺激した(Figure.1A)。miR-146a 導入群において、最も interleukin-6 (IL-6) 及び tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) の産生が抑制された(Figure.1 B, C)。miR-146a は細胞内において、Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK-1) と tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) の抑制を介して、NF- κ B 及び activator protein-1 (AP-1) の転写活性を抑制していた(Figure.1 D-H)。

2 : miR-146a 発現 plasmid による敗血症抑制効果

miR-146a 発現 plasmid または empty plasmid と PEI の混合物 (plasmid/PEI complex) をマウスに経尾静脈投与し、CLP によって敗血症を誘導した(Figure.2 A)。miR-146a 発現 plasmid 投与群で生存率の改善を認めた(Figure.2 B)。また、臓器障害の評価については、同群における CLP24 時間後の血清において blood urea nitrogen (BUN)、creatinine (Cre)、aspartate aminotransferase (AST)、alanine aminotransferase (ALT)、lactate dehydrogenase (LDH) の有意な抑制を認めた(Figure.2 C-G)。また、同群において CLP24 時間後の IL-6、TNF- α 、monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) の有意な抑制を認めた(Figure.2 H-J)。

3 : plasmid/PEI complex の臓器分布

Ex vivo imaging において、投与された plasmid/PEI complex は主に脾臓と肝臓への分布を認めた(Figure.3 A)。各臓器の免疫染色において、EGFP 陽性細胞は脾臓において他臓器より有意に多く認めた(Figure.3 B, C)。また、脾臓組織の免疫染色において、単球系マーカーCD68 と EGFP の共局在を認めた(Figure.4 A, B)。さらに miR-146a 発現 plasmid 投与群において、F4/80 または CD11b 陽性細胞での miR-146a の発現亢進と EGFP の発現を認めた(Figure.4 C-F)。Empty plasmid 投与群では F4/80 または CD11b 陽性細胞において EGFP の発現は認めしたが、miR-146a 発現亢進は認めなかった(Figure.4 C-F)。

4：脾臓における炎症及び apoptosis

miR-146a 発現 plasmid 投与群の脾臓において、CLP24 時間後の IL-6 発現と、CLP6 時間後の NF- κ B 活性の抑制を認めた(Figure.5 A, B)。また、apoptosis の評価として CLP24 時間後に脾臓の cleaved caspase-3 免疫染色及び TdT-mediated dUTP nick and label (TUNEL) 染色を行なったところ、miR-146a 発現 plasmid 投与群において cleaved caspase-3 陽性細胞及び TUNEL 陽性細胞数の有意な低下を認めた(Figure.5 C-E)。

5：腎臓における炎症及び組織障害

CLP24 時間後の腎臓組織は、miR-146a 発現 plasmid 投与群において尿細管障害の抑制、尿細管における neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) 発現の抑制、Ly6B 陽性細胞の浸潤抑制、IL-6 の発現抑制を認めた(Figure.6 A-E)。一方、miR-146a 発現 plasmid 投与群の腎臓における miR-146a の発現亢進及び EGFP の発現は認めなかった(Figure.3 B, Figure.6 F)。

6：脾臓摘出後 CLP マウスに対する miR-146a 発現 plasmid の効果

Plasmid 投与の 7 日前に脾臓摘出を加え、plasmid 投与 7 日後に CLP によって敗血症を誘導した(Figure.7 A)。脾臓摘出が加わると、miR-146a 発現 plasmid 投与により見られた生存率改善効果、臓器障害抑制効果、炎症抑制効果は認められなかった(Figure.7 B-J)。

【考察】

我々は miR-146a 発現 plasmid/PEI complex を用いて、敗血症における脾臓マクロファージの役割と治療ターゲットとしての可能性を示した。miR-146a は TLR のアダプター分子である IRAK-1、TRAF6 の発現抑制を介して、NF- κ B の転写活性を負に制御し、敗血症モデルマウスにおける臓器障害、サイトカインストームを抑制した。

敗血症の予後改善は臨床医学における大きな課題であり、本研究は敗血症の病態解明と新規治療法開発に資するいくつかの知見を持つと考えられる。第一は、脾臓における NF- κ B 活性が、臓器障害やサイトカインストームの出現に先立って活性化されており、同時に脾臓の NF- κ B 活性を抑制することで腎を含む多臓器障害の抑制効果を示した点である。本研究により、敗血症の誘導には脾臓、特に脾臓マクロファージが primary な役割を担っていることを示し、新たな治療のターゲットとなり得る可能性を示したと考えられる(Figure.7 K)。

第二は、我々は今回 miR-146a による脾臓マクロファージの apoptosis 抑制効果を示している点である。現在敗血症においては、過剰な炎症反応 (early phase) に引き続き単球系とリンパ球系の apoptosis に起因する免疫抑制状態が起こり (late phase)、結果的に二次感染から死亡に至る病態が提唱されている。我々が示した miR-146a による脾臓マクロファージの apoptosis 抑制効果は、NF- κ B よりむしろ AP-1 活性の抑制による可能性が考えられるが、脾臓への miR-146a 導入が敗血症の early phase と late phase の両方の病態改善に寄与する可能性を示唆している。

第三は、本研究は miR-146a と PEI という新たな治療戦略の可能性を示している点である。敗血症に対する miRNA による臨床試験は、現在のところ行われていない。我々は投与された miR-146a 発現 plasmid/PEI complex が脾臓マクロファージに分布することを示した。一方、腎臓における plasmid の分布と miR-146a の発現亢進は認めなかったものの、機能的にも組織学的にも敗血症による急性腎障害は抑制されていた。しかし、脾臓摘出により miR-146a の敗血症抑制効果は消失した。これは miR-146a 発現 plasmid/PEI complex が作用すべきターゲットを失った可能性を示していると考えられる。また、投与した plasmid が脾臓マクロファージにおいて作用することで敗血症における過剰な炎症反応を抑制したことを示しており、特定の miRNA と DDS と組み合わせを用いた、脾臓マクロファージをターゲットとした新たな敗血症治療の可能性を示している。

【結語】

我々は、脾臓マクロファージへの miR-146a 導入が敗血症病態を抑制することを示した。本研究結果により、miRNA と PEI を用いた脾臓マクロファージをターゲットとした敗血症治療の可能性を示した。