

## 難治性血管炎に対する標的 RNA 療法の基盤技術創出

王 英正

岡山大学病院 新医療研究開発センター再生医療部

### 【研究の背景】

川崎病は小児に発症する原因不明な急性血管炎症候群であり、免疫グロブリン静注 (IVIG) とアスピリンの併用療法が標準治療であるが、約 20% の症例で治療抵抗性があり、冠動脈疾患発症の高リスク群とされている。一方、川崎病発症を誘発する病原体が不明で、ヒト病理組織の入手困難さにより、心血管後遺症に導く多彩な分子生物学的機序の究明が未だ不十分である。

### 【目 的】

川崎病血管炎は、(1) 発症早期の好中球浸潤を伴う急性壊死性血管炎、(2) 血管壁を破壊する単球やマクロファージの集積によって引き起こされる慢性血管炎、(3) 惹起された炎症部位における内膜筋線維芽細胞の持続的増殖により、冠動脈の拡大と内腔が閉塞することが知られている。本研究では、病態進展の中心となるマクロファージならびに血管平滑筋細胞に注目し、川崎病モデルマウスを用いて、各種細胞自身より分泌される exosomes 由来のマイクロ RNA (miR) プロファイルを網羅的に解析し、川崎病血管炎に対する新たな on-target-RNA 療法の基盤技術創出を目的とする。

### 【方 法】

- ① RNA-sequencing を用いた川崎病マウスでの心臓由来細胞の bioinformatics 解析  
*Lactobacillus casei* (LCWE) 注入後 0, 7, 14, 28 日後に川崎病マウス由来の心臓組織用いて CD45 陽性細胞からマクロファージ (Adgre1, Itgax, CD14, Csf1r, Ccr2, CD68)、CD45 陰性細胞から内皮細胞 (CD34) を sorting し、それぞれの exosomes を抽出後、Illumina 社の次世代シーケンサー NovaSeq 6000 で RNA-sequencing を行う。2g/kg の IVIG を前投与したマウスに LCWE を注入後、7 日及び 28 日目に exosome を回収し、治療抵抗性の炎症プロファイルを作成する。データ解析は Cell Ranger software を使い、二次元の t-stochastic neighbor embedding (t-SNE) に変換後、clustering や heat map 解析は Seurat R package を用いて再構成し、既報のマウス RNA アトラスと照合し、Bayesian approach (SCDE) にて z-score が 1.96 以上もしくは -1.96 以下をそれぞれ有意に変動した RNAs として選別する。
- ② RNA 導入したマクロファージと内皮平滑筋細胞における細胞機能の検証 (2 次スクリーニング)  
候補となる新規 miR を選定後、上昇型に対しては antago-miR、減少型には miR-mimic をそれぞれ作成する。マクロファージの極性解析については、ヒト THP-1 細胞用いて、M1 及び M2 マクロファージはそれぞれ LPS+IFN- $\gamma$  または IL-4+IL-13 で誘導する。内皮機能は TNF- $\alpha$  刺激下の HUVEC における管腔形成能や血管増殖因子である FOXO3a を含む各種接着・細胞膜結合タンパクである VCAM-1, VAMP3, SNAP23 の発現量を検討する。また、マウス大動脈より培養した平滑筋細胞に TGF- $\beta$  ならびに PDGF-BB 刺激による細胞増殖能 (BrdU assay) 及び遊走能 (transwell 法) や細胞マーカーである SM22a, SRF, Myocd について検討する。
- ③ Crispr-dCas9 システムによる細胞種特異的 RNA 調節型レンチウイルスの樹立と in vivo 検証  
絞り込みした miRs を標的細胞特異的に発現制御するシステムを構築する。3 つの転写活性因子 (VP64, P65, RTA) を dCas9 の C 末端に結合させた dCas9-VPR を過剰発現型ウイルスベクター内に導入し、一方、dCas9-VPR を dCas9-

KRAB (Krüppel-associated box of the Kox1 gene)に置き換えることで RNA を抑制的に制御するシステムを構築する。また、細胞特異的に RNA 調節を行うため、マクロファージ誘導型では miR-181b-signal-guide (sg) RNA-miR-181b を pre-sgRNA として設計し、内在性 NF- $\kappa$ B プロモーター下で標的 miR の発現調節を行う。さらに、内皮平滑筋細胞への標的的手法は、miR-126-5p-sgRNA-miR-126-5p をセンサーとし、GATA2 プロモーター制御下で血管増殖抑制作用を持つ標的 miR の発現を誘導する。上記の miR 誘導型ウイルスベクターをそれぞれ pCMV-VSV-G のレンチウイルスベクターと組み込み、川崎病マウスモデルに経静脈的に注入し、移植後 7, 14, 28 日目における冠動脈病変の進展度による治療有効性について最終判定する。

## 【結 果】

超音波粉砕した 1,000  $\mu$ g の LCWE を C57BL/6 の腹腔内に注入し、0, 7, 14, 28 日後に川崎病マウス由来の心臓組織を用いて CD45<sup>+</sup>ならびに CD45<sup>-</sup>/CD34<sup>+</sup>細胞をそれぞれ sorting 後、exosomes を抽出し、small RNA sequencing を行った。IVIG 投与した 2 群の川崎病マウスを含め、合計 6 群間をそれぞれ CD45<sup>+</sup>ならびに CD45<sup>-</sup>/CD34<sup>+</sup>細胞に分けて比較検討した。各群における Illumina 解析は 6,889,562 から 8,004,844 reads となり、110 から 150 個の miR を検出した。CD45<sup>+</sup>細胞では LCWE 注入後 2 倍以上に変化した miR のうち、32 個が上昇型で、89 個が減少型であった。一方、CD45<sup>-</sup>/CD34<sup>+</sup>細胞においては、75 個が上昇型で、77 個が減少型であった。さらに、非特異的 miR ならびに治療標的となる候補 miR の選別法は、IVIG 投与したマウス組織由来の CD45<sup>+</sup>ならびに CD45<sup>-</sup>/CD34<sup>+</sup>細胞の miR プロファイルと subtraction することで絞り込むことに成功した。

CD45<sup>+</sup>及び CD45<sup>-</sup>/CD34<sup>+</sup>細胞においては、6 個の miR (miR-24-3p, miR-125b-5p, miR-130a-3p, miR-199b-5p, miR-221-3p, miR-145) と 2 個の miR (miR-1307-3p, miR-92b) がそれぞれ有意に上昇し、また、5 個の miR (miR-21-3p, miR-23a-3p, miR-128-3p, miR-181c-5p, miR-210-3p) と 3 個の miR (miR-501-3p, miR-223-3p, miR-660-5p) がそれぞれ CD45<sup>+</sup> 及び CD45<sup>-</sup>/CD34<sup>+</sup>細胞において有意に減少した。また、上昇型を示す miR は TGF/WNT 情報伝達を介する細胞骨格維持や細胞死ならびに免疫応答に関する IL-15 の情報経路を制御する機能の特徴とし、減少型 miR も同様に TGF/WNT 情報制御が多く占め、epithelial-to-mesenchymal transition を担う経路や HMGB-1 を介する免疫制御経路の下流標的因子を制御していることが明らかとなった。

## 【考 察】

今回の研究成果により、心臓組織内の各種細胞間における miR を介した cross-talk は、急性炎症にตอบสนองして、細胞生存、細胞増殖や細胞死といった組織機能低下をカバーするための潜在的予備能であることがわかり、特に、IVIG 投与群と比較検討することで、IVIG 治療抵抗性症例の急性炎症惹起時ならびに慢性炎症期における miR を介した複数の細胞間 paracrine 機能により、難治性血管炎が形成されることが明らかとなった。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

同定した急性炎症時に有意な発現減少を示した一連の候補 miR 群のうち、miR-223-3p, miR-21-3p, miR-210-3p は川崎病血管炎症例の血清を用いた RNA sequencing でも同様に報告されており<sup>1)</sup>、今後、より緻密な in vitro 検証を踏まえ、臨床応用につながる in vivo モデルでの治療評価を行い、難治性血管炎に対する標的 RNA 治療薬の開発根拠を随時構築していく。

## 【参考・引用文献】

1. Nat Rev Rheumatol. 2020;16:391-405.