

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：31201
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2015～2017
課題番号：15K09458
研究課題名(和文) 血小板産生制御機能をもつmicroRNAの探索

研究課題名(英文) microRNA in nascent platelet

研究代表者

古和田 周吾 (Kowata, Shugo)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：30418884

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)： 各種の血小板減少モデルマウスからの新生血小板では数種類の特定のmiRNA種が高発現している事が示唆された。新生血小板中では 活性酸素種が開始シグナルとなりautophagosome形成により、細胞内小器官の数の制御を通じて個々の血小板の質の保証と細胞集団としての均一性を担保し、同時にmiRNA制御が行われている可能性が示された。
臨床検体での測定系を考案し血小板減少を来す患者末梢血サンプルで測定した所、血小板減少の原因疾患を感度と特異性高く鑑別出来ることが明らかになった。特に免疫性血小板減少症、再生不良性貧血、骨髓異形性症候群の間では、感度特異度が優れていた。

研究成果の概要(英文)： Murine thrombocytopenia model showed that nascent platelets contained specific microRNAs. ROS triggered autophagy flux at megakaryocytic and nascent platelets, and autophagy regulated adequate distribution of cellular organelle and microRNAs in individual platelets. In human specimens, the ratio of autophagosome and RNA positive platelets were significant higher in immune thrombocytopenia. However, the ratio of autophagosome and microRNA positive platelets were significant lower in patients with myelodysplastic syndrome and aplastic anemia. Autophagy in nascent platelets may guarantee a quality of individual platelets via regulation of adequate distribution of cellular organelle and microRNAs in individual platelets.

研究分野：血小板産生

キーワード：新生血小板 Autophagy microRNA

1. 研究開始当初の背景

血小板は、骨髄巨核球より産生される無核の細胞である。ほ乳類の骨髄では1つの巨核球より数千の血小板が産生される。トロンボポエチンは、造血幹細胞より巨核球産生を促す主要なサイトカインであるが、巨核球からの血小板産生は抑制する。血小板産生を促す主要な因子は未だ不明なままである。

また血小板産生過程は、新生血小板の放出から始まるが、流血中で瞬時に行われており、細胞内オルガネラがどのように適切に分配され最終的に均一な細胞集団になることを担保されているのか、そのメカニズムは不明である。

一方、血小板中には microRNA が豊富に含まれており、血小板以外の細胞、例えば血管内皮細胞へ作用し機能的な影響を与えている。正常あるいは疾病での血小板内 microRNA 種が変動し、血小板産生機構に影響を与えている可能性がある。そこで我々は、「成熟あるいは新生血小板では異なる microRNA プロファイルを持ち、それが母細胞である骨髄巨核球に feed back シグナルを伝え、骨髄巨核球での血小板産生開始や未熟血小板の成熟を制御している」との仮説のもとに研究を計画した。

2. 研究の目的

血小板産生の制御システムにおける microRNA の関与およびその意義を明らかにする。具体的にはマウスの血小板減少モデルを用いて、新生血小板、成熟血小板、老化血小板での microRNA プロファイルを網羅的に検索し、さらに細胞生物学的にオルガネラの均一性制御との関連を解明する事を目的とする。

3. 研究の方法

(1)種々の血小板減少モデルマウスの作成と新生～老化血小板分画の抽出。

抗マウス血小板抗体、プロテアゾーム阻害剤、5FU, BCLX 特異的阻害剤等を投与し、その血小板回復期に、骨髄から近位～遠位(下大静脈、右心室、左心室、末梢静脈)より採血した。採血した全血検体は新生～老化の各段階ごとの血小板のみを分離(比重遠心分離またはセルソーター)後、以下の検討を行った。

(2)microRNA プロファイルの変化。

(1)により採取した新生～老化血小板のそれぞれを、microRNA マイクロアレイ法にて網羅的に解析し、新生～老化における特徴的プロファイルの検出。

(3)オルガネラ均一性担保機構の解明。

(1)により採取した新生～老化血小板の

それぞれを、電子顕微鏡による細胞内微細構造およびオルガネラの形態や分布の検討、フローサイトメトリーによる総 RNA 半定量、Autophagosome および Autophagy flux の定量、細胞内小器官(小胞体、ミトコンドリア)の定量。さらにマウス新生血小板を培養し、各種シグナル伝達および autophagy 関連薬剤の添加による経時的变化の評価。

(4)agonist 刺激した新生血小板と骨髄巨核球を共培養し time lapse imaging で血小板産生刺激または抑制効果の有無を評価。

(5)血小板減少症患者の末梢血にて上記項目を評価。

4. 研究成果

(1) 抗マウス血小板抗体、プロテアゾーム阻害剤、5FU, BCLX 特異的阻害剤等を投与し、その血小板回復期に採血を行うと、網状血小板比率および FSC の増加を認め最大で網状血小板比率 80% を越える条件を把握した。採血場所によるその変化は有意なものでは無かった。この結果は、新生血小板は特定の解剖学的位置や場所(肺動脈や末梢静脈)で成熟するのではなく、循環血液中で成熟している事を示した。

(2) 網状血小板比率および血小板数から、新生血小板量が最大の時期に全血採血し、新生血小板 rich なサンプルを、BSA グラディエント法、Optiprep 試薬、またセルソーター(On chip sort)にて RBC および WBC を除去した。Purity はフローサイトメトリーで計測し、最終的に混入する RBC, WBC を 0.1% 以下でパイアピリテイ 98% 以上で回収する方法を確立した。microRNA アレイへ用いたサンプルは上記の高純度のサンプルを選んで行った。一方精製過程や培養血小板の結果より採血後には血小板の microRNA 量が極端に低下する時期があることが判明した。これは microRNA を含む細胞質が、分泌や RNAase 等による酵素分解以外にも何らかの機序で急速に失われている事を示した。下記の実験結果から生体内で条件を再調整し microRNA マイクロアレイによる網羅的検討を再度進めている。

(3) 新生血小板が成熟老化する過程を電子顕微鏡により超微細構造を詳細に追った。その結果 autophagy により細胞内オルガネラ、特にミトコンドリア、リボゾーム、小胞体が処理されている像を認めた。中には血小板断面の 80% を越える autolysosome が観察出来た検体もあった。そこで新生血小板の autophagy flux を各種血小板減少モデルマウスで測定した所、新生血小板の autophagy 亢進は生体内では 24 時間以内に basal level に復した。

次に新生血小板を *in vitro* で培養し、Autophagy flux を亢進させた場合、それに引き続き RNA が減少することが観察された。この現象は microRNA 種も autophagy により分解されうる事を示唆した。そこで実際に新生血小板を *in vivo* および *in vitro* で追跡していくと粗面小胞体やリボゾームが autophagosome により消化されているのが観察できた。また新生血小板の autophagosome 中にミトコンドリアを認め、mitophagy も同様に生じていることを見いだした。一方、血小板産生を行えるレベルまで成熟した巨核球の細胞質では活性酸素種 (ROS) が上昇している。

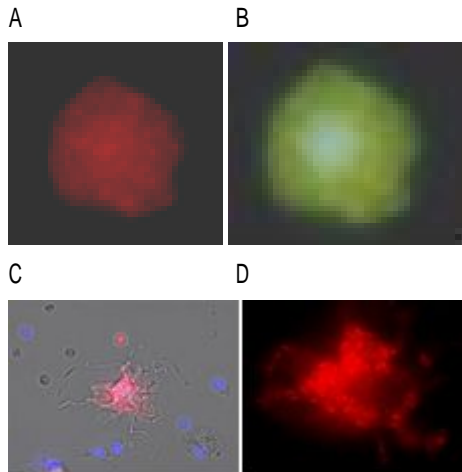


図1 巨核球の血小板産生像
AB: 成熟巨核球 (赤: ミトコンドリア、青: 核、緑: 細胞質)。C: 血小板産生期の明視野像 (赤: ミトコンドリア、青: 核)。D: C の拡大図。既にミトコンドリアの分離が始まっている。

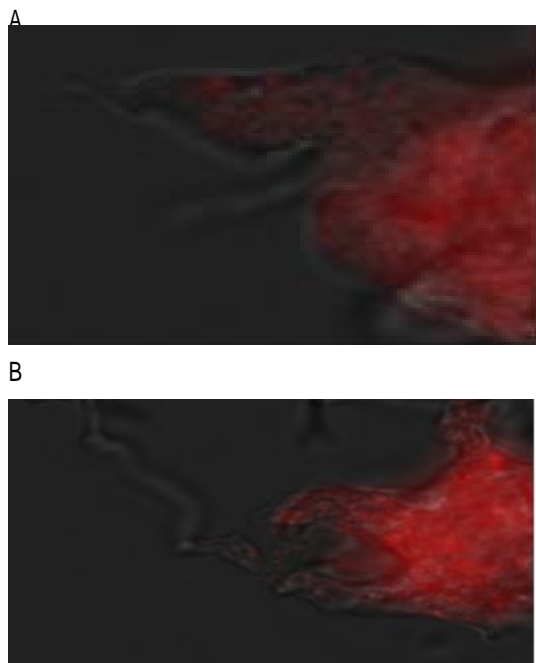


図2: 巨核球の血小板産生期のミトコンドリアの輸送 A: 太い突起形成 (赤: ミトコンドリア)。B: A の30分後。先端からの proplatelet

形成

そこで ROS レベルを血小板産生過程(図1 - 3)でそれぞれ測定した所、巨核球、巨核球より分離直後、成熟血小板では徐々に低下していた。これらから、血小板分離時(図2)に新生血小板(図3)では mitochondria が継続して盛んに ATP と ROS を産生しているが、時間とともに mitophagy によりミトコンドリアを減少させていく、または過剰に分配されたミトコンドリアを消去していくことが想定された。

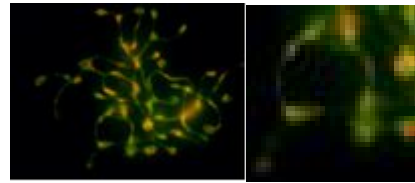


図3: 巨核球より分離した proplatelet 形の新生血小板 (緑: 細胞質。赤: ミトコンドリア)

(4) 実際に刺激新生血小板と巨核球の共培養を time-lapse imaging で評価を行ったが巨核球の血小板産生亢進または低下を証明出来なかった。この頃、他の研究者らにより血小板は生体内で他の細胞由来の microRNA を取り込み保持していることが示され (Lyndsay, Semin Thromb Hemost.2016)、先に判明した特定の microRNA 種が、母細胞の巨核球由来であるか、新生血小板として分離した後に取り込まれた他細胞由来物かを区別する必要とが生じたが解析は困難であった。また Dicer-1 欠損マウスの解析により、血小板中の microRNA 種は血小板機能に関わる事が示された (Jesse W .Blood.2016;127:1743)。以上から我々の特定した microRNA 種は、骨髓巨核球に feed back シグナルを伝える機能を持つよりも、血小板の機能を制御している可能性が強いと考えられた。

これらの理由により、新生血小板中の microRNA 種が巨核球に影響を与えている仮説を証明する為に、microRNA 種を生体内巨核球でラベルした後に回収する方法を進めている。また新生血小板中が成熟血小板になる過程では、Autophagy がオルガネラレベルの変化と血小板の形態的機能的成熟を制御している可能性が明らかとなった。

(5) ヒト末梢血を用いた血小板減少症の新たな鑑別

岩手医科大学倫理委員会の承認のもと、血小板減少や血小板低下を来したヒト末梢血検体を用いて上記指標を測定した。疾患により Autophagosome 形成率、ミトコンドリア量と膜電位を指標にした場合、血小板減少を来した原因の鑑別と診断に有用な可能性が

示された。

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3件)

1. 古和田周吾. 血小板放出後の成熟.
血液フロンティア. 2017.6月号.p65-70
2. 外川亮. 古和田周吾. 末梢血液による血小板造血の評価. 岩手医学雑誌.12巻. 2017
3. 下山格. 古和田周吾. マウス全血中の血小板前駆体の解明. 岩手医学雑誌.vol67.225-31.2015.

[学会発表](計8件)

1. 古和田周吾、村井一範、伊藤薫樹、石田陽治, 新生血小板における Autophagy. 第79回日本血液学会学術集会. 東京.10月.(2017)
2. 古和田周吾. 血小板前駆体の成熟過程.
会長招請シンポジウム「巨核球/血小板の基礎研究」第39回日本血栓止血学会学術集会.2017年6月名古屋国際会議場(招待講演).
3. 古和田周吾, 石田陽治. 巨核球からの血小板産生過程のイメージング.2016年 第64回日本輸血・細胞治療学会総会. 京都. (招待講演).
4. 古和田周吾 ITP の基礎と臨床 沖縄血液研究会 2016年5月沖縄宜野湾市(招待講演)
5. Shugo Kowata, Yoshiaki Okano, Ryou Togawa, Tatsuo Oyake, Kazunori Murai, Sumio Isogai, Jiro Hitomi, Shigeki Ito, Yoji Ishida : Dynamics of platelet progenitors in mice and human. 第78回日本血液学会学術集会. 10月. 横浜. (2016)
6. 古和田周吾 生体内における血小板産生過程の解析 2015年 巨核球/血小板学術講演会 東京(招待講演)
7. 古和田周吾, 外川亮, 岡野良昭, 石田陽治: 血小板前駆体から成熟血小板まで. 第661回岩手医学会例会. 盛岡. 10月. (2015)

8. Shugo Kowata, Kazunori Murai, Ryou Togawa, Yoshiyuki Okano, Tatsuo Oyake, Shigeki Ito, Yoji Ishida : Platelet progenitors after leaving bone marrow. 第77回日本血液学会学術集会. 金沢. 10月. (2015)

[図書](計2件)

1. Shugo Kowata, Yoji Ishida. Megakaryopoiesis and thrombopoiesis. Autoimmune thrombocytopenia. Springer Science Business Media.p9-19.2017
2. Shugo Kowata, Yoji Ishida. Splenectomy. Autoimmune thrombocytopenia. Springer Science Business Media.p159-64 2017.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古和田 周吾 (Kowata Shugo)
岩手医科大学・医学部・講師
研究者番号：30418884

(2) 研究分担者

石田 陽治 (Ishida Yoji)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：70151389