

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10848

研究課題名(和文)脳血管攣縮におけるmicroRNAを介したシグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of microRNA-mediated signaling in cerebral vasospasm

研究代表者

吉川 雄一郎(Kikkawa, Yuichiro)

埼玉医科大学・医学部・客員准教授

研究者番号：80423515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、くも膜下出血後の血液、髄液中のmicroRNA(miR)がどのように脳血管攣縮発症に関与するのかを検討した。患者の血液、髄液を採取し、microarrayならびにPCR解析により発現を検討した。miR15aの発現は、髄液中では発症3日後、血清中では発症5日後をピークに有意に上昇した。また、関連分子KLF4のmRNAは、髄液中では発症1日後に、血清中では発症3日後に有意に低下することが明らかとなった。KLF4の早期の持続的な低下とそれに続くmiR15aの上昇は、くも膜下出血後の脳血管におけるphenotypeの変化を介して脳血管攣縮発症に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、血管恒常性維持における様々なmicroRNA(miR)の関与が示唆されているが、脳血管攣縮発症におけるその役割や機能に関しては、ほとんど研究されていない。本研究では、血管新生、血管増殖に関与する可能性があるmiR15aの発現と、miR15aを介して抗増殖、抗血管新生作用を有すると考えられるKLF4の有意な発現変化を明らかにし、これにより、miRによる遺伝子発現制御機構がSAH後の脳血管収縮性変化の獲得に関与している可能性が示唆された。分泌型miRNAが血液や髄液中で安定して存在していることから、今後、臨床上有用な生物マーカーとなる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to explore the role of microRNA(miR) in the development of cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage (SAH). Peripheral blood and cerebro-spinal fluid (CSF) samples were collected from SAH patients, and microarray analysis and PCR analysis were performed. miR-15a expression was significantly increased in both the CSF and plasma, with a peak around 3 to 5 days after SAH, whereas the expression of Kruppel-like factor 4 (KLF4) was significantly decreased around 1 to 3 days after SAH and remained lower than in controls. Our results suggest that an early and persistent decrease in KLF4 followed by an increase in miR-15a may contribute to the altered vascular phenotype, resulting in development of cerebral vasospasm.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳血管攣縮 くも膜下出血 microRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳血管攣縮は、くも膜下出血 (SAH) 発症後、遅発性に生じる脳動脈の持続的かつ可逆的狭窄であり、脳虚血を引き起こすことにより患者の生命予後を大きく左右するが、その発症機序は明らかではない。したがって、脳血管攣縮を完全に予防するには至っておらず、その発症を予測するような疾患特異的な生物マーカーも存在しない。近年、平滑筋機能や血管恒常性維持における miRNA の関与が少しずつ明らかになってきているが、くも膜下出血後の脳血管攣縮における miRNA の関与はこれまでに報告がない。

これまで、動物モデルにおいて、SAH 後に血管平滑筋の収縮機構や弛緩機能、血管リモデリングなどの分子メカニズムに多様な変化が生じることにより、血管収縮性増大がもたらされることが明らかになっている (Kikkawa et al., J Cereb Blood Flow Metab 2010, Kameda et al., Br J Pharmacol 2011, Kikkawa et al., J Cereb Blood Flow Metab 2012, Kikkawa et al., Biomed Res Int 2014, Kurogi et al., Brain Res 2015)。こうした SAH 後の血管における形質変化を制御するメカニズムを考えたとき、以下の点から、miRNA の発現は重要な意味を持つ可能性があると考えられる。1) miRNA は複数の遺伝子の発現制御を行う、2) 赤血球をはじめとした血球成分には分泌型 miRNA が豊富に含まれる、3) 分泌型 miRNA が細胞内に取り込まれた後も機能を維持しさまざまな転写後制御に関与しうる。したがって、髄腔内への出血を契機として発症するくも膜下出血後の脳血管攣縮の分子機構に miRNA が重要な機能を果たしている可能性が予測される。

### 2. 研究の目的

本研究では、くも膜下出血後の血管収縮性増大に関わる種々のメカニズムにおいて、miRNA がどのような分子生物学的機能を担い脳血管攣縮発症に関与しているのかを明らかにする。また、分泌型 miRNA が血液や髄液中で安定して存在していることから、臨床における生物マーカーや治療標的としての miRNA の可能性を探索する。

### 3. 研究の方法

(動物モデルにおける予備実験) ラット総頸動脈を穿刺し 4-0 ナイロン糸で頭蓋内内頸動脈終末部を perforation し、人為的にも膜下出血を生じさせた (12 個体)。コントロールモデルでは総頸動脈穿刺のみにとどめ内頸動脈終末部の perforation を行わなかった (12 個体)。モデル作成中における ICP 上昇にともなう一過性全脳虚血によると考えられる致死率は約 1/4 で、ヒトにおけるそれとほぼ同等であった。翼状針を用いて、採血は大腿動脈、髄液採取は経皮的穿刺による大槽からの採取を行った。sampling した検体は、12000 rpm, 15 min の遠心後に上清を -80 で凍結保存し解析時に解凍した。発症 48 時間のサンプリングの後に、カーボンブラックインク注入ならびに灌流固定を行い、全脳を摘出し、脳底動脈の血管系の測定を行い脳血管攣縮の有無を確認した。脳底動脈径は SAH モデルの 78% の狭窄を認めた。血漿から exosome を分離し、さらに exosome から total RNA を抽出した。Small RNA 分画を確認した後に、microarray を用いて microRNA の網羅的遺伝子発現解析を行った。髄液サンプルは十分な量が sampling できなかったため、exosome 中ではなく、全 microRNA として解析した。

#### (ヒトくも膜下出血における実験)

人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (厚生労働省) に法り、埼玉医科大学国際医療センター IRB の承認のもと行った。患者から書面でインフォームドコンセントを取得した。コイル塞栓術を行った破裂脳動脈瘤によるくも膜下出血患者 8 例を対象とした。対象として、正常圧水頭症が疑われ入院し、最終的に疾患が否定された 3 名の健常患者から採取した血液と髄液 (髄液排除試験時) を用いた。発症 0、1、3、5、7、9、11、13 日に 3 c c の採血を行い、発症 0、1、3、5、7、9、日にくも膜下出血の治療として留置している腰椎もしくは脳槽ドレーンから髄液 4 c c を採取した。血漿、髄液から exosome を分離し、さらに exosome から total RNA を抽出した。Small RNA 分画を確認した後に、microarray を用いて microRNA の網羅的遺伝子発現解析、PCR 解析を行った。

(血漿、髄液からの exosome の分離と microRNA の確認) 血漿は thrombin 処理を行った後に ExoQuick Plasma prep and Exosome precipitation kit (System Biosciences Inc) を用いた。髄液 (ヒト) は ExoQuick-TC precipitation solution (System Biosciences Inc) を用いた。続いて、Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit (Invitrogen) を用いて small RNA を含む total RNA の抽出を行った後に、Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) を用いて、small RNA 分画を確認した。さらに代表的な miRNA である let7 の発現を RT-PCR を行い確認した。

### 4. 研究成果

2500 以上の遺伝子の microarray 解析の結果、血清中、髄液中いずれにおいても、day1 から day3 にかけて、2 倍以上もしくは 0.5 倍以下の変動を示した遺伝子は、合計 12 遺伝子存在した (Table1)。

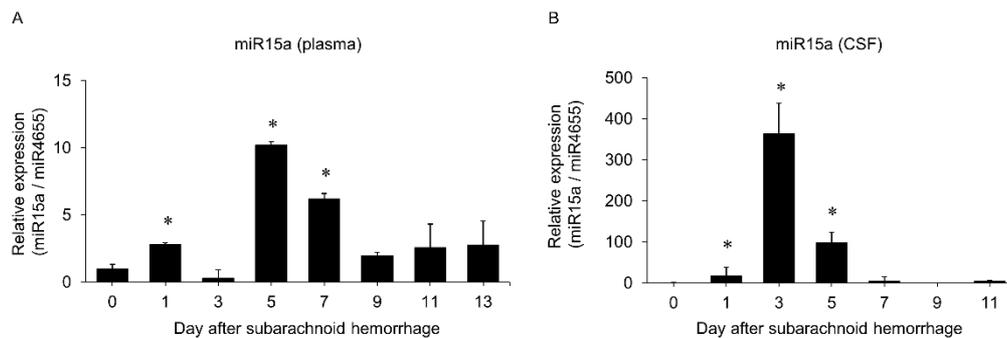
**Table 1. microRNAs that were up- or down-regulated in both CSF and plasma in two samples on day 3 after subarachnoid hemorrhage.**

	CSF 1	CSF 2	Plasma 1	Plasma 2
hsa-miR-16-5p	4.60	3.76	-4.45	-1.84
hsa-miR-19b-3p	4.00	4.05	-3.61	-2.01
hsa-miR-15a-5p	3.66	2.31	-4.56	-1.69
hsa-miR-103a-3p	4.00	2.29	-3.05	-1.57
hsa-miR-15b-5p	3.34	2.36	-3.88	-2.25
hsa-miR-92b-3p	4.03	2.31	-2.75	-1.57
hsa-miR-29a-3p	1.36	2.29	-1.44	-1.17
hsa-miR-191-5p	1.55	2.20	-2.88	-1.28
hsa-miR-22-3p	2.17	1.80	-2.82	-1.12
hsa-miR-30d-5p	1.23	1.41	-2.02	-1.32
hsa-miR-6724-5p	-1.54	-1.33	-2.33	-1.70
hsa-miR-2467-3p	1.72	1.84	1.20	1.87

Abbreviations: CSF = cerebrospinal fluid

この中で angiogenesis に関与すると考えられる miR15a の経時的発現を RT-PCR を用いて解析したところ、髄液中では day3 をピークに、血清中では day5 をピークに有意に上昇することが明らかとなった (Fig1)。

Fig 1

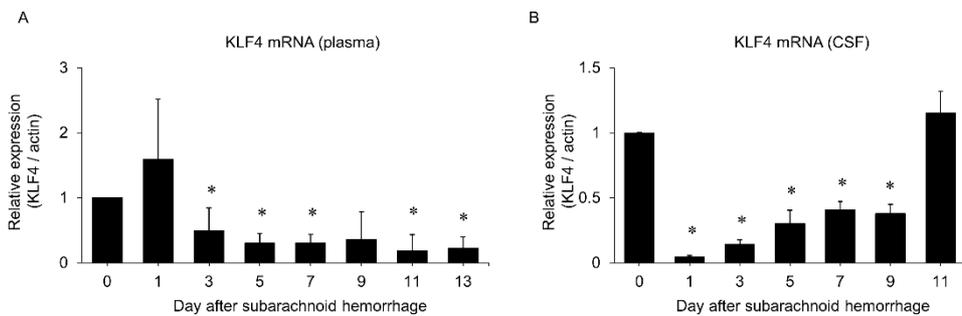


また、miR15a を介して抗増殖、抗血管新生作用を有すると考えられる KLF4 の mRNA は、髄液中では day1 に、血清中では day3 に有意に低下することが明らかとなった (Fig2)。髄液中、血中のいずれにおいても、KLF4 の発現は SAH 後早期に低下し持続したが、その一方で miR15a の発現は KLF4 の変化に続き一過性の上昇を示した (Fig1,2)。

KLF4 の低下は SAH 後の vascular proliferation や angiogenesis に寄与している可能性があり、

miR15a は KLF4 と相互作用することによってこの調節に関与している可能性が示唆された。

Fig 2



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Taro Yanagawa, Masaki Takao, Masami Yasuda, Tomoya Kamide, Hiroki Sato, Kaima Suzuki, Toshiki Ikeda, Yuichiro Kikkawa, Hiroki Kurita	4. 巻 176
2. 論文標題 Clinical and Neuropathologic Analysis of Intracerebral Hemorrhage in Patients With Cerebral Amyloid Angiopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Neurol Neurosurg .	6. 最初と最後の頁 110-115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.clineuro.2018.11.020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yuichiro Kikkawa, Kaima Suzuki, Akio Teranishi, Taichi Tachikawa, Hiroki Kurita	4. 巻 161(2)
2. 論文標題 Ruptured Intrameatal Anterior Inferior Cerebellar Artery Aneurysm Associated With Obstructed Internal Auditory Artery in a Patient With Sudden Hearing Loss and Vertigo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Neurochir (Wien) .	6. 最初と最後の頁 403-406.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/s00701-018-3771-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Munehiro Otsuka, Yuichiro Kikkawa, Tomoya Kamide, Kaima Suzuki, Aoto Shibata, Toshiki Ikeda, Hiroki Kurita	4. 巻 161(4)
2. 論文標題 Factors Related to Improvement of Cerebrovascular Reserve After Superficial Temporal Artery to Middle Cerebral Artery Anastomosis for Patients With Atherosclerotic Steno-Occlusive Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Neurochir (Wien) .	6. 最初と最後の頁 799-805
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/s00701-019-03841-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yuichiro Kikkawa, Tomomichi Kayahara, Akio Teranishi, Aoto Shibata, Kaima Suzuki, Tomoya Kamide, Toshiki Ikeda, Hiroki Kurita	4. 巻 132
2. 論文標題 Predictors of the Resolution of Cavernous Sinus Syndrome Caused by Large/Giant Cavernous Carotid Aneurysms After Parent Artery Occlusion With High-Flow Bypass	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Neurosurg .	6. 最初と最後の頁 e637-e644
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.wneu.2019.08.059.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tatsuki Kimura, Tomoya Kamide, Koki Onodera, Shinya Tabata, Aoto Shibata, Kaima Suzuki, Ririko Takeda, Toshiki Ikeda, Yuichiro Kikkawa, Satoshi Iihoshi, Shinya Kohyama, Hiroki Kurita	4. 巻 135
2. 論文標題 Clinical Features of Neurogenic Pulmonary Edema in Patients With Subarachnoid Hemorrhage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Neurosurg .	6. 最初と最後の頁 e505-e509.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.wneu.2019.12.060.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomomichi Kayahara, Yuichiro Kikkawa, Hiroyuki Komine, Tomoya Kamide, Kaima Suzuki, Aoto Shibata, Shunsuke Ikeda, Toshiki Ikeda, Hiroki Kurita	4. 巻 162(2)
2. 論文標題 Predictors of Subacute Hematoma Expansion Requiring Surgical Evacuation After Initial Conservative Treatment in Patients With Acute Subdural Hematoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Neurochir (Wien) .	6. 最初と最後の頁 357-363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s00701-019-04187-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yanagawa T, Takao M, Yasuda M, Kamide T, Sato H, Suzuki K, Ikeda T, Kikkawa Y, Kurita H	4. 巻 176
2. 論文標題 Clinical and neuropathologic analysis of interacerebral hemorrhage in patients with cerebral amyloid angiopathy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Neurol Neurosurg	6. 最初と最後の頁 110-115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clineuro.2018.11.020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 吉川雄一郎	4. 巻 28 (11)
2. 論文標題 専門医に求められる最新の知識. 脳血管攣縮の病態と治療: 最新の知見	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 脳神経外科速報	6. 最初と最後の頁 1100-1107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki K, Kato Y, Hayashi T, Maruyama H, Kikkawa Y, Kurita H	4. 巻 174
2. 論文標題 The dose of direct oral anticoagulants and outcomes of intracerebral hemorrhage: Preliminary findings.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Neurol Neurosurg	6. 最初と最後の頁 63-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clineuro.2018.09.011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kikkawa Y, Ikeda T, Takeda R, Nakajima H, Ogura T, Ooigawa H, Kurita H	4. 巻 105
2. 論文標題 Results of Early High-Flow Bypass and Trapping for Ruptured Blood Blister-Like Aneurysms of the Internal Carotid Artery	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 World Neurosurg	6. 最初と最後の頁 470-477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2017.06.033.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi Y, Takeda R, Kikkawa Y, Ikeda T, Suzuki K, Shibata A, Tiezzi G, Araki R, Kurita H	4. 巻 383
2. 論文標題 Multiple simultaneous intracerebral hemorrhages: Clinical presentations and risk factors.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Neurol Sci	6. 最初と最後の頁 35-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2017.10.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小野寺康輝、吉川雄一郎、田端晋也、松澤良、柴田碧人、吉川信一郎、武田純一、上出智也、池田俊貴、高橋秀寿、神山信也、高尾昌樹、栗田浩樹
2. 発表標題 破裂脳動脈瘤患者における持続脳槽洗浄と多剤薬物治療によるスパズム予防の治療成績
3. 学会等名 第35回スパズムシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉川雄一郎、木村辰規、松澤良、栢原智道、柴田碧人、武田純一、上出智也、池田俊貴、栗田浩樹
2. 発表標題 くも膜下出血後の髄液・血液中のmiR15aの発現変化とその役割
3. 学会等名 第61回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kikkawa Y, Kamide T, Uramaru K, Suzuki K, Takeda R, Tsuchiya R, Ikeda R, Shibata A, Kurita H
2. 発表標題 Microcirculatory Impairment is Caused by Independent Mechanisms From Major Arterial Spasm Both in the Acute and Chronic Phase After Experimental SAH
3. 学会等名 International Stroke Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kikkawa Y et al.: Sasaki T, Ohkuma H, Kanamaru K, Suzuki M (eds):	4. 発行年 2017年
2. 出版社 NARUNIA Inc	5. 総ページ数 156
3. 書名 Neurovascular Events after Subarachnoid Hemorrhage	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	栗田 浩樹  (Kurita Hiroki)  (70262003)	埼玉医科大学・医学部・教授   (32409)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	林 健  (Hayashi Takeshi)  (40314679)	埼玉医科大学・医学部・教授     (32409)	