

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11097

研究課題名（和文）microRNAによる妊娠高血圧症候群の病態解明と遺伝子治療への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the pathology concerning gestational hypertension by microRNA and its application to gene therapy

研究代表者

中嶋 康文（NAKAJIMA, Yasufumi）

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：70326239

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：過去の研究報告で、妊娠高血圧症候群患者の胎盤及び血液中で変化したmiRNAのmimicと、そのmiRNAに特異的なmiRNA阻害薬を、ヒト血管内皮細胞（HUVEC, HMEC-1）に遺伝子導入し、miRNAのターゲットとなる（相補配列を有する）mRNAとタンパク質の発現が変化することを、培養細胞実験で確認した。臨床研究では、コロナ禍のために正常妊娠および妊娠高血圧症妊婦被験者のリクルートに難を要する状況が継続し、可能な範囲で研究を継続してきた。次世代シーケンサーを施行するための人数をようやく得ることができ、外部委託業者にその網羅的解析を依頼した。現在、その研究結果待ちの状態である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠高血圧症候群等のCommon Disease（頻度の高い疾患）は、遺伝リスクと環境リスクの組み合わせにより起こると考えられており、その割合は疾患ごとに違っている。miRNAは環境的な要因として、種々の侵襲により発現が上昇し、また遺伝的な要因としてmiRNAに遺伝子多系があることも知られている。1つのmiRNAが複数の遺伝子の発現に関与していることから、今まで1つのタンパク質の発現変化で説明が出来なかったCommon Diseaseの病態解明、バイオマーカー、治療薬としてmiRNAの解析は期待できる。

研究成果の概要（英文）：We used the same miRNA as reported significantly changed in placenta and plasma from the previous study of patients with gestational hypertension in cell culture study. By injecting miRNA-specific mimic and inhibitor in HUVEC and HMEC-1 cell with electroporation, we have confirmed the changes in target mRNA and protein to the specific miRNA. We also started the clinical study in patients with gestational hypertension. Outsourced research is underway of investigating comprehensive microRNA analysis.

研究分野：集中治療、麻酔

キーワード：敗血症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群は全妊娠の 6-10%に合併し、その 1/4 は重症とされる。重症の場合には迅速、かつ適切な治療が必要とされ、適切な措置が遅れてしまった場合、周産期死亡率は 10%を越えると言われている。近年、産科集中治療領域の臨床・研究が注目され、緊急高血圧症、妊娠高血圧腎症、子癇、常位胎盤早期剥離、DIC 等の管理において産科集中治療は、重要な役割を担う。妊娠中期～後期にかけて発症する妊娠高血圧症候群は、高血圧や子癇、HELLP 症候群の症状の一つの血小板減少による凝固障害、肥満とは無関係の急性妊娠脂肪肝、常位胎盤早期剥離、肺水腫(胸水、腹水)等の発症リスクがあることが広く知られている (Lancet 2010; 376: 631-44. Review.)。

妊娠高血圧症候群の基本病態として、従来より Two-stage disorder theory が唱えられており、胎児絨毛細胞と母体脱落膜細胞及び免疫担当細胞の相互作用や、遺伝的な背景、環境因子により、絨毛細胞のらせん動脈の血管壁への置換(リモデリング)不全が起き、胎盤の虚血低酸素環境により、胎盤の絨毛細胞から抗血管新生因子である soluble FLT1 (VEGF receptor 1 の分泌型) や、soluble ENG (TGF- β receptor の分泌型)産生増加のため (Stage 1)、血管内皮障害と血管攣縮をもたらす、母胎に高血圧や蛋白尿を、胎児には機能不全を引き起こすとされている (Stage 2)。

2. 研究の目的

(培養実験) 過去の研究で有用性の高い実験結果を得た miRNA を、ヒト血管内皮細胞 (HUVEC)、血管内皮系培養細胞に遺伝子導入を行い、ターゲットとなるタンパク質の発現変化を確認する。

(臨床研究) 本研究では、正常及び妊娠高血圧症候群妊産婦を対象に、胎盤、から Total RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて mRNA, miRNA 発現の網羅的解析を行う。上記2群間の胎盤の miRNA 発現変化の差を、多変量解析を用いて統計処理を行う。統計的有意差のあった miRNA が細胞内情報伝達系に、如何に作用しているかを、パスウェイ解析を用いて行う。

3. 研究の方法

(細胞培養実験) 過去の研究報告で、妊娠高血圧症候群患者の胎盤及び血中エクソソームで変化した miRNA の mimic (Pre-miRTM miRNA Precursor Molecules, Ambion 社)と、その miRNA に特異的な miRNA 阻害薬 (Anti-miRTM miRNA Inhibitor, Ambion 社)を、ヒト血管内皮細胞 (HUVEC, HMEC-1)に遺伝子導入する。

miR Base 等の検索サイトを用いて予測される miRNA のターゲットとなる(相補配列を有する) mRNA とタンパク質の発現が変化することを、培養細胞実験で確認する。遺伝子導入方法は、Nucleofection 法 (Amata, 現有設備。従来の Electroporation 法を改良した手法)を用いる。実験結果として、ターゲットとなる特定の関連タンパク質の発現が miRNA mimic を遺伝子導入することで発現抑制され、miRNA 阻害薬を遺伝子導入することで発現が増加することを、RNA の発現変化を PCR 法、タンパク質の発現変化をウエスタンブロット法、フローサイトメトリー法により確認する。

(臨床研究)

miRNA の網羅的解析

対象 正常及び妊娠高血圧症候群妊産婦

(1) 検体採取 胎盤(娩出時)

(2) 血液中エクソソームの分離

超遠心法、またはエクソソーム単離キット(ライフテクノロジー社)で分離する。

(3). **miRNA の抽出** 胎盤及びエクソソームより mirVanaTM miRNA Isolation Kit 等を用いて抽出する。

(4). **包括的miRNAの発現プロファイリング** 次に、定量性のある網羅的miRNA プロファイリングを、従来のマイクロアレイ法より優れた次世代高速シーケンサーIon PGM システム (Life Technology 社、既存)を用いて絶対的な定量法を施行。

1. Small RNA のライブラリ作製 Ion Total RNA-Seq Kit を用いてフラグメント化
2. 逆転写酵素を用いて、cDNA に変換
3. ピーズ調整(4時間)エマルジョン PCR 法を用いて、cDNA を増幅
4. シーケンシング(3時間)シーケンサーによる miRNA 発現定量
5. データ解析(1時間)サーバーに SFFまたはFASTQ 形式のデータが転送される。miR Base と照合し、網羅的解析を行う。発現定量解析には、CLC バイオ社の解析ソフト(Genomic Work Bench)を使用する。上記の発現定量結果から、周術期において多変量解析、主成分分析により有意に変化のあった miRNA を選別する。

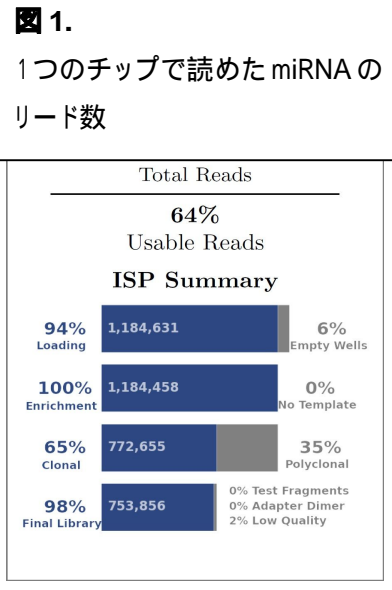
4. 研究成果

過去の臨床研究論文により、妊娠高血圧症候群患者の胎盤及び血中エクソソームで変化したと報告のあった miRNA の mimic (Pre-miRTM miRNA Precursor Molecules, Ambion 社)と、その miRNA に特異的な miRNA 阻害薬 (Anti-miRTM miRNA Inhibitor, Ambion 社)を、ヒト血管内皮細胞 (HUVEC, HMEC-1 細胞)に遺伝子導入を行った。

miR Base 等の検索サイトを用いて予測される miRNA のターゲットとなる(相補配列を有する)タンパク質の発現が変化していることを、培養細胞実験で確認した。遺伝子導入方法は、Nucleofection 法(Amaxa, 現有設備。従来の Electroporation 法を改良した手法)を用いた。実験結果として、リアルタイムPCR法でターゲットとなる特定の mRNA が変化している事を確認後、関連タンパク質の発現が miRNA mimic を遺伝子導入することで発現抑制され、miRNA 阻害薬を遺伝子導入することで発現が増加することを、ウェスタンブロット法、フローサイトメトリー法により確認した。(図2、3)

臨床研究においては、コロナ禍のために正常妊娠および妊娠高血圧症候群妊婦被験者のリクルートに難を要する状況が継続し、研究期間において可能な範囲で研究を継続してきた。次世代シーケンサーを施行するための人数をようやく得ることができ、外部委託業者にその網羅的解析を依頼した。現在、その研究結果待ちの状態である。

さらに現在、関西医科大学において後進の医局員が得た病態解明と創薬を目標とした妊娠高血圧症候群患者の血小板中 microRNA 解析という文科省の研究課題において同様の実験系を行うことになり、引き続き臨床研究を、さらに発展、継続している。



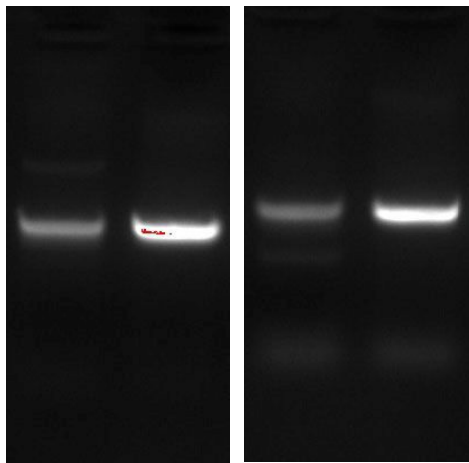


図2 . miRNA 遺伝子導入後の mRNA 発現変化

Semi-quantitative PCR 画像

FLT1 mRNA の発現が、has miR 200c-3p mimic 及び、hsa-miR-100-5p mimic を遺伝子導入することで、抑制されている。



FLT1



-actin

図3 . miRNA 遺伝子導入後のタンパク質発現の変化

ウエスタンブロット画像

FLT1 のタンパク質の発現が、miR 200c-3p mimic を遺伝子導入することで、抑制されている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計18件（うち査読付論文 18件 / うち国際共著 11件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Nakayama Y, Takeshita J, Nakajima Y, Shime N.	4. 巻 24
2. 論文標題 Ultrasound-guided peripheral vascular catheterization in pediatric patients: a narrative review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Crit Care	6. 最初と最後の頁 592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13054-020-03305-7	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 Jun Takeshita 1 2, Kazuya Tachibana 1, Yasufumi Nakajima 2, Gaku Nagai 1, Ai Fujiwara 1, Hirofumi Hamaba 1, Hideki Matsuura 1, Tomonori Yamashita 1, Nobuaki Shime 3	4. 巻 11
2. 論文標題 Long-Axis In-Plane Approach Versus Short-Axis Out-of-Plane Approach for Ultrasound-Guided Central Venous Catheterization in Pediatric Patients: A Randomized Controlled Trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatr Crit Care Med .	6. 最初と最後の頁 e996-e1001.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PCC.0000000000002476.	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 Takeshita J, Tachibana K, Nakajima Y, Shime N.	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 Bent peripheral venous catheter inserted using ultrasound-guided dynamic needle tip positioning.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Vasc Access.	6. 最初と最後の頁 Ahead of print
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1129729820983158.	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 該当する
1. 著者名 Takeshita J, Nakajima Y, Kawamura A, Taniguchi M, Shimizu Y, Takeuchi M, Shime N.	4. 巻 47(10)
2. 論文標題 Ultrasonographic Detection of Micro-Bubbles in the Right Atrium to Confirm Peripheral Venous Catheter Position in Children.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Crit Care Med.	6. 最初と最後の頁 e836-e840.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/CCM.0000000000003916.	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 Takeshita J, Yoshida T, Nakajima Y, Nakayama Y, Nishiyama K, Ito Y, Shimizu Y, Takeuchi M, Shime N.	4. 巻 20 (9)
2. 論文標題 Superiority of Dynamic Needle Tip Positioning for Ultrasound-Guided Peripheral Venous Catheterization in Patients Younger Than 2 Years Old: A Randomized Controlled Trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatr Crit Care Med.	6. 最初と最後の頁 e410-e414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PCC.0000000000002034.	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 Takeshita J, Yoshida T, Nakajima Y, Nakayama Y, Nishiyama K, Ito Y, Shimizu Y, Takeuchi M, Shime N.	4. 巻 33(7)
2. 論文標題 Dynamic Needle Tip Positioning for Ultrasound-Guided Arterial Catheterization in Infants and Small Children With Deep Arteries: A Randomized Controlled Trial.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Cardiothorac Vasc Anesth.	6. 最初と最後の頁 1919-1925.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.jvca.2018.12.002. Epub 2018 Dec 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 Takeshita J, Yoshida T, Nakajima Y, Nakayama Y, Nishiyama K, Ito Y, Shimizu Y, Takeuchi M, Shime N.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Dynamic Needle Tip Positioning for Ultrasound-Guided Arterial Catheterization in Infants and Small Children With Deep Arteries: A Randomized Controlled Trial.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Cardiothorac Vasc Anesth.	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.jvca.2018.12.002.	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 Takeshita S, Ogawa S, Nakayama Y, Mukai N, Nakajima Y, Mizobe T, Sawa T, Tanaka KA.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Prohemostatic Activity of Factor X in Combination With Activated Factor VII in Dilutional Coagulopathy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anesth Analg.	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1213/ANE.0000000000003858.	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 該当する

1. 著者名 Mukai N, Nakayama Y, Ishi S, Ogawa S, Maeda S, Anada N, Murakami S, Mizobe T, Sawa T, Nakajima Y.	4. 巻 46
2. 論文標題 Changes in MicroRNA Expression Level of Circulating Platelets Contribute to Platelet Defect After Cardiopulmonary Bypass.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Crit Care Med.	6. 最初と最後の頁 e761-e767
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/CCM.00000000000003197.	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 Okabayashi S, Ogawa S, Tanaka KA, Nishiyama T, Takeshita S, Nakayama Y, Nakajima Y, Sawa T, Mizobe T.	4. 巻 32
2. 論文標題 A Comparative Study of Point-of-Care Prothrombin Time in Cardiopulmonary Bypass Surgery.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Cardiothorac Vasc Anesth.	6. 最初と最後の頁 1609-1614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.jvca.2017.12.044.	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 該当する

1. 著者名 Mukai N, Nakayama Y, Murakami S, Tanahashi T, Sessler DI, Ishii S, Ogawa S, Tokuhira N, Mizobe T, Sawa T, Nakajima Y.	4. 巻 83
2. 論文標題 Potential contribution of erythrocyte microRNA to secondary erythrocytosis and thrombocytopenia in congenital heart disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatr Res.	6. 最初と最後の頁 866-873
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/pr.2017.327.	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 該当する

1. 著者名 Mukai N, Nakayama Y, Nakajima Y, et al.	4. 巻 46
2. 論文標題 Changes in microRNA expression level of circulating platelets contribute to platelet dysfunction after cardiopulmonary bypass	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Critical Care Medicine	6. 最初と最後の頁 e761-e767
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/CCM.00000000000003197	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Mukai N, Nakayama Y, Murakami S, Tanahashi T, Sessler DI, Ishii S, Ogawa S, Tokuhira N, Mizobe T, Sawa T, Nakajima Y.	4. 巻 In Press
2. 論文標題 Potential contribution of erythrocyte microRNA to secondary erythrocytosis and thrombocytopenia in congenital heart disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatr Res.	6. 最初と最後の頁 In Press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/pr.2017.327.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Murase M, Nakayama Y, Sessler DI, Mukai N, Ogawa S, Nakajima Y.	4. 巻 119(6)
2. 論文標題 Changes in platelet Bax levels contribute to impaired platelet response to thrombin after cardiopulmonary bypass: prospective observational clinical and laboratory investigations.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Br J Anaesth.	6. 最初と最後の頁 1118-1126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bja/aex349.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Okabayashi S, Ogawa S, Tanaka KA, Nishiyama T, Takeshita S, Nakayama Y, Nakajima Y, Sawa T, Mizobe T.	4. 巻 In Press
2. 論文標題 A Comparative Study of Point-of-Care Prothrombin Time in Cardiopulmonary Bypass Surgery.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Cardiothorac Vasc Anesth.	6. 最初と最後の頁 In Press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.jvca.2017.12.044.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Umegaki T, Kunisawa S, Nakajima Y, Kamibayashi T, Fushimi K, Imanaka Y.	4. 巻 In Press
2. 論文標題 Comparison of In-hospital Outcomes Between Transcatheter and Surgical Aortic Valve Replacement in Patients with Aortic Valve Stenosis: A Retrospective Cohort Study Using Administrative Data.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Cardiothorac Vasc Anesth.	6. 最初と最後の頁 In Press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.jvca.2017.06.047.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Akiyama K, Nakamura N, Itatani K, Naito Y, Kinoshita M, Shimizu M, Hamaoka S, Kato H, Yasumoto H, Nakajima Y, Mizobe T, Numata S, Yaku H, Sawa T.	4. 巻 24
2. 論文標題 Flow-dynamics assessment of mitral-valve surgery by intraoperative vector flow mapping.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Interact Cardiovasc Thorac Surg.	6. 最初と最後の頁 869-875.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/icvts/ivx033.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Akiyama K, Maeda S, Matsuyama T, Kainuma A, Ishii M, Naito Y, Kinoshita M, Hamaoka S, Kato H, Nakajima Y, Nakamura N, Itatani K, Sawa T.	4. 巻 17
2. 論文標題 Vector flow mapping analysis of left ventricular energetic performance in healthy adult volunteers.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Cardiovasc Disord.	6. 最初と最後の頁 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12872-016-0444-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中嶋康文
2. 発表標題 ヒトの体温調節機構と、麻酔・集中治療領域における 体温管理のコントラバナー
3. 学会等名 日本臨床麻酔学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中嶋康文
2. 発表標題 3D-TEEの活用法
3. 学会等名 日本心臓血管麻酔学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中嶋康文
2. 発表標題 DES挿入患者の周術期の抗血栓療法抗凝固薬・抗血小板薬の周術期の使い方
3. 学会等名 日本麻酔科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中嶋康文
2. 発表標題 弁膜症ガイドライン Up To Date
3. 学会等名 日本心臓血管麻酔学会 JBPO 講習会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中嶋康文
2. 発表標題 僧帽弁形成術とTEE
3. 学会等名 日本臨床麻酔学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 中嶋康文 (香取信之 編)	4. 発行年 2017年
2. 出版社 克誠堂	5. 総ページ数 234
3. 書名 検査値から考える周術期血液凝固異常(血小板異常症の項)	

1. 著者名 秋山浩一, 柴崎雅至, 中嶋康文 (澄川耕二 編)	4. 発行年 2018年
2. 出版社 総合医学社	5. 総ページ数 496
3. 書名 FAQでわかりやすい! 心臓麻酔臨床実践ガイド (第2版)	

〔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	中畑 克俊 (NAKAHATA Katsutoshi) (70332971)	関西医科大学・医学部・講師 (34417)	
研究分担者	中山 力恒 (NAKAYAMA Yoshinobu) (90568198)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------