

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16525

研究課題名(和文) microRNAによる骨髄由来抑制細胞の制御が及ぼす敗血症時免疫抑制病態の解明

研究課題名(英文) MicroRNA derived from myeloid-derived suppressor cell might contribute to the pathogenesis concerning immunosuppression in sepsis

研究代表者

西本 浩太 (NISHIMOTO, Kota)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：30758850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：2018年度は、ラットを用いた敗血症病態の動物モデルにおいて、比較的細胞回収が容易な血液中、及び腹腔内マクロファージのmiRNAの遺伝子発現の変化を観察した。LPS投与により敗血症モデルを作成し、経時的なmiRNAの定量評価を施行した。(敗血症ラットモデルから回収しmiRNAの発現を、次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析した。)2019年度は、引き続きLPS投与により敗血症ラットモデルを作成し、ラットの血液中及び腹腔内から、骨髄性免疫抑制細胞を標識抗体で細胞分離回収し、small RNAを抽出し経時的な変化をコントロール群と比較観察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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。報告者らは、敗血症病態時の骨髄由来抑制細胞が産生するmiRNAが重要な役割を担うと考える。

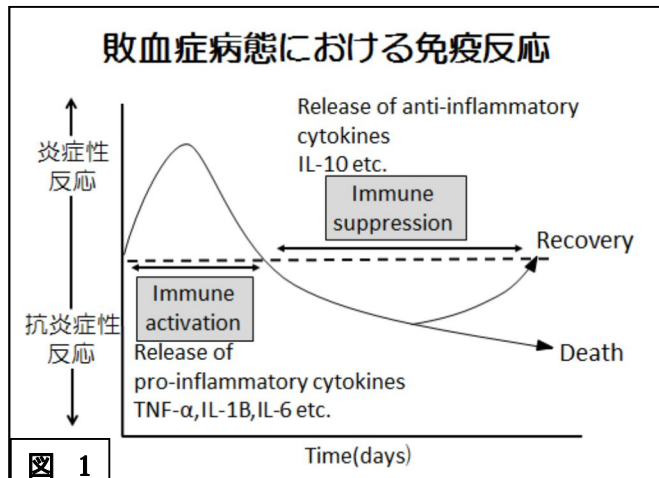
研究成果の概要(英文)：In the first year, we evaluated the time course changes of comprehensive microRNA expression by the next-generation sequencing after extraction of blood and peritoneal macrophage of rat sepsis model using lipopolysaccharide injection. Subsequent next year, we have extracted rat myeloid-derived suppressor cell from blood and peritoneal cavity by positive selection of the cell surface marker. Thereafter, we evaluated the time course changes of comprehensive microRNA expression by the next-generation sequencing. Changes in microRNA expression were observed in rat macrophages and myeloid-derived suppressor cells in rats under sepsis compared with rats by saline infusion(control group)

研究分野：集中治療医学

キーワード：MicroRNA 骨髄由来抑制細胞 sepsis immunosuppression

1. 研究開始当初の背景

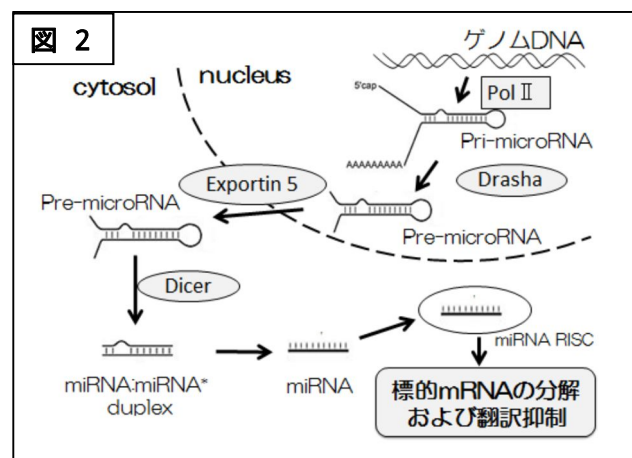
敗血症病態では、初期に TNF や IL-6 といった炎症性サイトカインが多量に産出され、強い炎症反応が生じる。このため、敗血症患者における死亡率を規定する要因として急性期の高サイトカイン血症が注目されてきた。しかし近年、敗血症の持続する免疫機能異常は予後を悪くし、院内感染をもたらすことが知られてきた。これは、免疫担当細胞の細胞死や機能低下に伴う免疫抑制による炎症



の持続が大きな要因とされている(Vincent JL, et al. Sepsis definitions: time for change. Lancet. 2013;381:774-5). 敗血症患者において、生体内で単球、樹状細胞、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、B 細胞等の免疫細胞の細胞死による細胞数減少を認める報告(Skrupky LP, et al. Anesthesiology. 2011;115:1349-62)や、マクロファージの貪食機能低下の報告(Michlewska S, et al. FASEB J. 2009;23:844-54, Feng X, et al. Immunology. 2011;132:287-95.)等があるが、免疫抑制の機序はまだ不明な点が多い。(図1)

骨髄由来抑制細胞 (MDSCs: myeloid-derived suppressor cells)は、顆粒球マーカーと単球/マクロファージマーカーとを同時に発現している未熟な骨髄由来細胞で、炎症や担癌状態等の病的な条件で腫瘍組織、リンパ節、末梢血に増加し、強力な免疫抑制活性を示す。その中で、感染病態等の場合は、炎症によって産生された VEGF, IL-1, IL-6, COX2 が、MDSCs の誘導と活性化をする。マウスでは CD11b+Gr1+の細胞で認識され詳細な検討が進んでいるが、ヒトでは Heterogeneous な細胞群とされ、現在のところ CD11b+ CD14- CD33+の細胞を MDSCs とすることが多い。MDSCs は、IL-10, TGF- β , Arginase 活性酸素等の産生を通してさまざまな免疫担当細胞の不活性化や、Treg(制御性 T 細胞)の誘導により、免疫抑制状態をもたらす。MDSCs が敗血症による免疫抑制に関連している可能性があるが、その臨床的意義は不明である。仮説としては、初期の炎症過剰病態において MDSCs が有益である一方で、引き続き起きる免疫抑制病態において、有害になる可能性がある。最近の研究結果において、M-MDSCs(単球性)と G-MDSCs(好中球性)、何れも敗血症患者の T 細胞機能異常と強く関連しており、G-MDSCs が産生するアルギナーゼ1が、敗血症による免疫抑制の主な因子との報告もある。(Uhel F, et al. Am J Respir Crit Care Med. 2017 ;196:315-327)

また近年、タンパク質をコードしない21 - 24 塩基程度からなる小分子 RNA である microRNA(miRNA)が、細胞増殖・アポトーシス・代謝など多岐にわたり生命現象に深く関わっていることが報告されている。その機能は遺伝子発現の転写後抑制であり、複数のタンパク質と複合体を形成して標的となる mRNA に結合し、その翻訳を抑制する。このように miRNA が多くの mRNA を制御しており、最近の報告



では、miRNA が MDSCc の産生を調節しているとの報告がある。(El Gazzar M. Innate Immun. 2014 ;20 :227-38., McClure C, et al. Infect Immun. 2014 ;82 :3816-25.) (図2)

2. 研究の目的

重症敗血症では、過剰な免疫抑制状態が生じると予後不良を来す。報告者らは、敗血症に伴う病態の中で、特に高血糖時において、単球系細胞が貪食能低下や細胞死を起こし、その細胞内情報伝達系としての小胞体ストレスの関与を、siRNAによる遺伝子ノックダウン法により、(Iida J, Ishii S, Nakajima Y, et al. Br J Anaesth. 2019 Jul;123(1):51-59)、また miRNA による制御に関しても、麻酔科関連の学会で報告してきた。その後の予備実験による研究結果により、様々な病態制御に関与している miRNA の発現による、敗血症病態における骨髄由来抑制細胞 (MDSCs: myeloid-derived suppressor cells) の分化、機能への影響に注目して、動物実験及び臨床研究の両面から検討し、重症敗血症における MDSCs の役割を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

すでに、当研究室で確立しているLPS投与により敗血症ラットモデルを作成した。2018年度は、比較的細胞回収が容易な血液中、及び腹腔内のマクロファージを準備実験として施行した。2019年度は、比較的難易度が高い血液中、及び腹腔内の骨髄性免疫抑制細胞(myeloid-derived suppressor cell, MDSC)を標識抗体で細胞分離、回収し、経時的な変化を観察した。いずれの細胞も、次世代シーケンサーで解析するためのmicroRNAの最低濃度を満たすために、複数のラットから細胞をまとめて抽出する必要があった。研究協力者の関西医科大学教授 中嶋康文、京都府立医科大学助教 中山力恒は、分子生物学的研究手技や、動物実験における敗血症ラットモデル作成等に直近の実験において習熟しており、適宜協力を仰いだ。また、研究協力者の徳島大学客員講師 棚橋俊仁は、miRNA研究に精通しており数多くの業績を持つためmiRNA研究の指導を仰いだ。また、研究協力者のライフテクノロジー ジャパン株式会社 村上聡は、自社製品の次世代シーケンサー Ion PGM装置 (関西医科大学現有設備)によるmiRNA実験の技術及び解析のアドバイスを仰いだ。大学院生等も研究協力者として実験に参加した。

a. miRNA の分離、濃縮

mirVana™ miRNA Isolation Kit 等を用いて miRNA を抽出する。

b. 次世代高速シーケンサーを用いた包括的 miRNA のプロファイリング

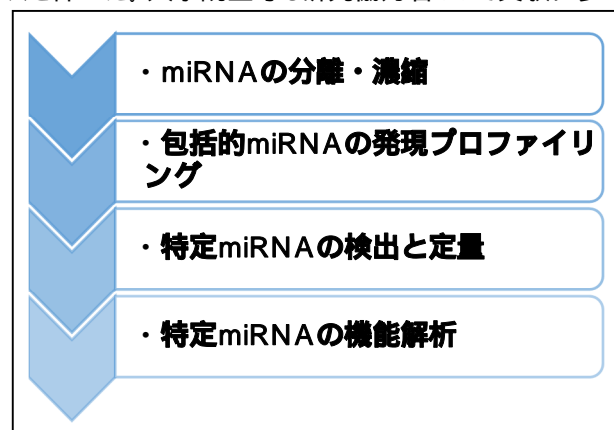
網羅的な miRNA 発現プロファイリング、未知の non-coding RNA (miRNA/lincRNA) 発現量の違いを定量評価でき、感度、正確性、再現性などにおいて従来のマイクロアレイより優れている次世代高速シーケンサー Ion PGM™ システムを使用する。

ライブラリ調整 (Ion Total RNA-seq キットを使用)

ビーズ調整 (エマルジョン PCR を行い、DNA 断片をビーズ上に増幅する。)

シーケンシング (エマルジョン PCR 後のサンプルをマイクロチップに注入し Ion PGM シーケンサーにて塩基配列を検出し、miRNA の発現定量を行う。)

データ解析 (Ion PGM シーケンサーで選出したデータは Torrent サーバーに転送され、解析ソフト: Genomic Work Bench, CLC バイオ社を用いて解析した。)

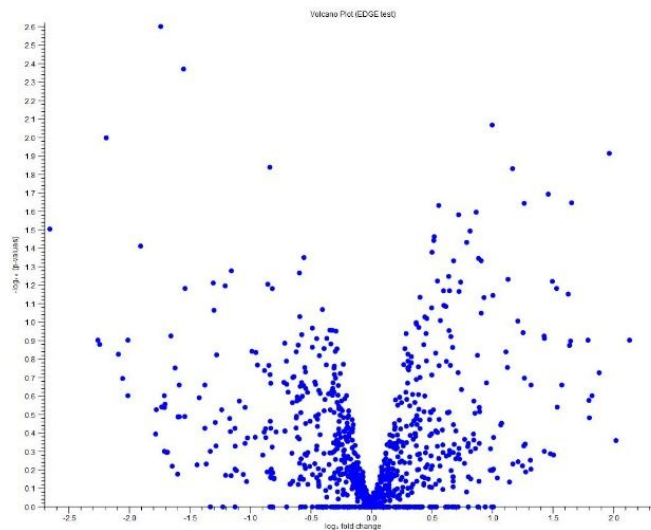
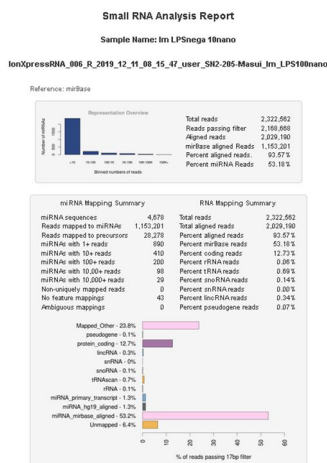
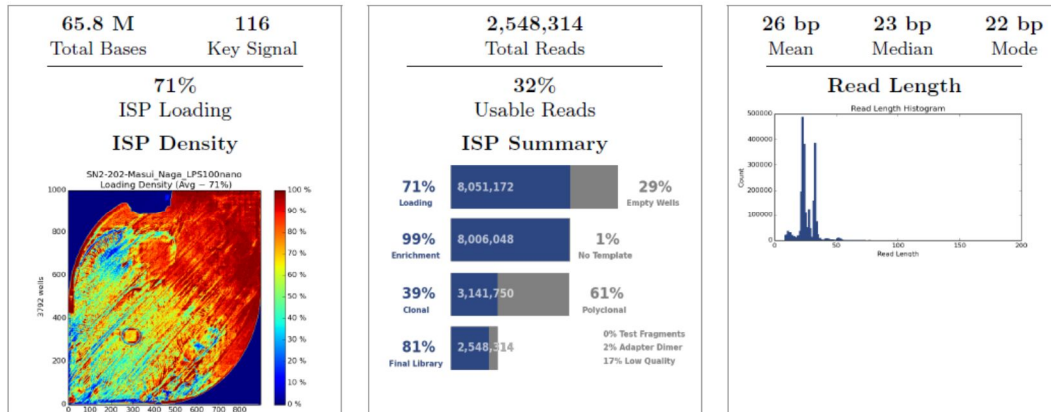


c. 特定 miRNA の検出と定量

b.にて発現変化していた miRNA から選別した特定の miRNA を Real-Time PCR 法を用いて定量し、発現の確認を行った。

4. 研究成果

研究結果として、敗血症ラットモデルにおいて、Sham ラット(コントロール群)と比べて、LPS 投与後 24 時間の骨髄性免疫抑制細胞内の let-7e, miR-223, miR-494, miRNA 21 の発現が上昇したことを、次世代シーケンサーと、リアルタイム PCR 法で確認した。予定していた検体数を得るために、引き続き実験を継続予定している。



予定していた以下の研究においては、動物実験の研究が予定以上に時間を費やしたため、予定年度内に終了することができなかったため、引き続き実験を施行予定している。

(培養細胞研究)

動物実験で、有意に変化のあった miRNA を、ラット MDSCc に Transfection し、その経時的な遺伝子発現の変化を次世代シーケンサーを用いて、mRNA を網羅的解析する。また、T 細胞の機能抑制に影響を及ぼすとされる S100A8/A9, S100A12, arginase 1 等の産生能の変化を解析する。

(臨床研究)

敗血症患者及び健康成人からヒト MDSCc を単離し、動物実験系で有意に変化のあった miRNA の発現を定量性のあるリアルタイム PCR 法で解析する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Umegaki T, Kunisawa S, Nishimoto K, Kamibayashi T, Imanaka Y	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Effectiveness of combined antithrombin and thrombomodulin therapy on in-hospital mortality in mechanically ventilated septic patients with disseminated intravascular coagulation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 4874
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-61809-2.	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 角 千里, 梅垣 岳志, 中島 友理奈, 添田 岳宏, 西本 浩太, 博多 紗綾, 右馬 猛生, 中嶋 康文, 萩平 哲, 上林 卓彦
2. 発表標題 敗血症症例の初期IgG値と退院時転帰の関連についての検討
3. 学会等名 第46回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅垣岳志, 中島友理奈, 添田岳宏, 西本浩太, 安藤亜希子, 穴田夏樹, 奥 佳菜子, 右馬猛生, 正司智洋, 楠 宗矩, 中嶋康文, 萩平 哲, 上林卓彦
2. 発表標題 敗血症症例におけるガンマグロブリン製剤投与後IgG値に関する検討
3. 学会等名 日本集中治療医学会第3回関西支部学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----