

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09386

研究課題名（和文）敗血症病態における血小板数減少と細胞死のmicroRNA網羅的解析による機序解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms behind thrombocytopenia and cell death in sepsis through comprehensive microRNA analysis

研究代表者

竹下 淳（TAKESHITA, Jun）

関西医科大学・医学部・研究医員

研究者番号：40433263

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：敗血症を持つ患者で血小板数が減少している場合、血小板内のピロプトシス関連インフラマソームと細胞接着分子の活性化により、血小板の消費が増加します。これは血小板の生成が増加しても追いつかないためです。さらに、変化したmiRNAが血小板数の減少を予測する有力な指標として機能する可能性があります。このような知見は敗血症の診断や治療の進展に寄与するかもしれません。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症における血小板の動態とその調節機構に関する理解を深めることに学術的な意義があります。敗血症治療における新たな介入点を提供するかもしれません。また、miRNAの変化が血小板数の減少を予測するバイオマーカーとして機能する可能性を示すことは、敗血症の早期診断や治療の改善に寄与する可能性があります。敗血症は世界中で重大な健康問題となっており、早期診断と効果的な治療が患者の生存率を大きく向上させることができます。これにより、敗血症による死亡率の低減や治療費の削減に貢献すると考えられます。

研究成果の概要（英文）：The activation of intraplatelet pyroptosis-related inflammasome and cell adhesion molecules increases platelet consumption despite the increase in the production of platelets in patients with sepsis who have decreased platelet counts. Furthermore, altered miRNAs may serve as indicators for predicting a decrease in platelet counts.

研究分野：集中治療、麻酔

キーワード：敗血症

## 1. 研究開始当初の背景

敗血症病態において、炎症性サイトカインは血管内皮障害や、血小板を活性化する。それと共に、凝固系も活性化するが、生じたトロンピンや活性型第 X 因子は、PAR 受容体 (Protease-activated receptors) 等を介して炎症病態を増幅する。またこの現象が過度に起これば、種々の細胞死に伴い産出される内因性 Damage-associated molecular patterns (DAMPs) により、病的血栓や臓器障害を来す。

以前より、敗血症の病態において血小板減少が患者予後不良因子として深く関与していることや、血小板の凝集能自体は低下するとも報告されているが、その病態は良く知られていない (Pigozzi L et al. Intensive Care Med. 2016;42:583-586.)。その中で、最近の我々の研究報告 (Murase M, et al. Br J Anaesth. 2017 Dec 1;119(6):1118-1126.) に基づく仮説として、過剰な活性化血小板と、血小板細胞死に伴いホスファチジルセリンが露出する血小板膜表面上でトロンピンが大量に生成されることや、引き続き起こる血小板機能低下、及び血小板数低下により抗菌能や炎症消退物質産生能が低下することが炎症増悪の要因になると考えている (Jackson SP, et al. Blood. 2010;116:2011-8.)。

敗血症時の血小板活性化とその後に起こる血小板減少の幾つかの機序の一つとして最近の研究の報告によると、血小板の膜表面にパターン認識受容体の Toll Like Receptor 4 (TLR4) が発現しており、LPS 投与により TLR4 受容体を介して血小板が活性化されることで、粘着性を増した血小板が肺に集積され、流血中の血小板が減少する (Blood 107:637-41, 2006. J Immunol 182: 7997-8004, 2009) 報告や、DAMPs が血小板に作用し、血液中の血小板減少を引き起こす事が、動物実験で報告されている (Fuchs TA, et al. Blood. 2011;118:3708-3714.)。

また、人間の 30 億個の塩基配列全部を解析するヒトゲノムプロジェクトは、多数の動物でも 1990 年代から 2000 年代初頭にかけて行われ、ゲノムのうち、タンパク質を作る部分 (コード領域) はわずか 2~3% である一方、大部分はタンパク質を作らない領域で (非コード領域)、その半分は同じ単位が繰り返される「反復配列」であった。近年、その「**がらくた**」とされた領域に 21 - 24 塩基程度の小分子 RNA の miRNA が、細胞増殖・アポトーシス・代謝等、多岐にわたり生命現象に関与することが報告され注目を浴びている。その機能は、従来の遺伝情報は、「DNA (転写) 伝達 RNA (mRNA) (翻訳) タンパク質」の順に伝達されるセントラルドグマの概念を覆す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。また、1つの遺伝子の制御に複数の miRNA が関与している一方で、1つの miRNA が複数の遺伝子の発現に関与している。

## 2. 研究の目的

患者予後と関連する敗血症時の血小板数減少の原因として、過度の血小板活性化と、引き続き起こる血小板細胞死の現象が関与すると考えている。その機序と新しい予防法・治療法を見出すために、次世代シーケンサーを用いた血小板内と、血漿中の網羅的な microRNA (miRNA) 発現解析等を通じて、その病態解析を展開したいと考えた。

## 3. 研究の方法

健康成人の被験者の末梢静脈から、1回 20 ml の採血を行う。

a. **miRNA の分離と濃縮** クエン酸採血後、遠心操作にて多血小板血漿作成後、洗浄血小板溶液の作成。血小板内 miRNA 変化を観察する目的で、敗血症病態の主因となるリポ多糖体、ヒストン、HMGB1 等の DAMPs 投与前後の洗浄血小板検体から、mirVana™ miRNA Isolation Kit 等を用いて miRNA を抽出する。

b. **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) を用いて絶対的な定量法を施行。

1. **Small RNA のライブラリ作成** Ion Total RNA-Seq Kit を用いてフラグメント化
2. **cDNA に変換** 逆転写酵素を用いる。
3. **ビース調整 (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、FASTQ 形式のデータが転送される。

統計学的な有意差検定を伴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、特に血小板内で miRNA が変化した miRNA を選別する。

選別された miRNA のターゲットとなる mRNA を複数の miRNA Prediction Tool (Miranda, TargetScan Human5.0, PicTar, miRBase Targets Version 5.0) 等で探索する。特に細胞死・炎症病態に関連する mRNA に相補配列のある miRNA を選別。

#### **特定 miRNA の検出と定量**

上記にて発現変化のあった miRNA のターゲットになる細胞死・炎症惹起物質に関連のある miRNA の発現をリアルタイム PCR で、定量解析する。

また、上記の実験で変化のあった 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、血小板系の培養細胞である Meg-01 細胞に、効率の良い Nucleofection 法で遺伝子導入を行い、ターゲット遺伝子の変化を Real-Time PCR 法で、タンパク質の変化をウエスタンブロット法で確認する。

#### 4. 研究成果

LPS 投与の有無により、次世代シーケンサーを用いた方法でいくつかの血小板内 microRNA の発現に差異を見たので、リアルタイム PCR 法による定量発現においても同様の差異を確認した。

今後の展開として、敗血症患者を対象とした臨床研究においても同様の結果が得られるのか確認したい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 13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 Takeshita J, Tachibana K, Nakajima Y, Shime N.	4. 巻 22
2. 論文標題 Incidence of catheter-related bloodstream infections following ultrasound-guided central venous catheterization: a systematic review and meta-analysis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 772
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12879-022-07760-1.	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, Nakajima Y, Tachibana K, Hamaba H, Yamashita T, Shime N.	4. 巻 17
2. 論文標題 Combined short-axis out-of-plane and long-axis in-plane approach versus long-axis in-plane approach for ultrasound-guided central venous catheterization in infants and small children: A randomized controlled trial	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0275453.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0275453.	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 Tasaka S, Ohshimo S, Takeuchi M, et al.	4. 巻 32
2. 論文標題 ARDS Clinical Practice Guideline 2021.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Intensive Care.	6. 最初と最後の頁 32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40560-022-00615-6.	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 Nakano Y, Takeshita J, Tachibana K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Major monitoring and cardiac output during cesarean delivery.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Anesth.	6. 最初と最後の頁 574-576
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00540-022-03038-7.	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 Ohira S, Takeshita J, Tachibana K.	4. 巻 73:110365
2. 論文標題 Factors associated with the need for airway intervention immediately after extubation from general anesthesia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of clinical anesthesia	6. 最初と最後の頁 73:110365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jclinane.2021.110365	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, Nakayama Y, Nakajima Y, Hamaba H, Yamashita T, Shime N.	4. 巻 126(4):e140
2. 論文標題 Ultrasound-guided dynamic needle tip positioning versus conventional palpation approach for catheterisation of posterior tibial or dorsalis pedis artery in infants and small children	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British journal of anaesthesia	6. 最初と最後の頁 126(4):e140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bja.2020.11.033	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 Jun Takeshita, Kazuya Tachibana, Yasufumi Nakajima, Gaku Nagai, Ai Fujiwara 1, Hirofumi Hamaba, Hideki Matsuura, Tomonori Yamashita, Nobuaki Shime	4. 巻 21
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 Yoshinobu Nakayama, Jun Takeshita, Yasufumi Nakajima, Nobuaki Shime	4. 巻 30
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, Kazuya Tachibana, Yasufumi Nakajima, Nobuaki Shime	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 Dec 21
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 -

1. 著者名 Takeshita J, Akiyama K, Anada N, Nakajima Y.	4. 巻 35
2. 論文標題 Intraoperative Diagnosis of a Stuck Bioprosthetic Valve Leaflet Due to a Loop of Suture After Mitral Valve Replacemen	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Cardiothorac Vasc Anesth.	6. 最初と最後の頁 1830-1832.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.jvca.2020.07.007.	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, 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, Nishiyama K, Fukumoto A, Shime N.	4. 巻 33(11)
2. 論文標題 Combined Approach Versus 2 Conventional Approaches in Ultrasound-Guided Central Venous Catheterization: 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 2979-2984.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.jvca.2019.03.051.	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.	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 0件)

1. 発表者名 竹下 淳, 中嶋康文, 橘 一也, 濱場啓史, 山下智範, 志馬伸朗
2. 発表標題 小児患者の超音波ガイド下中心静脈穿刺における交差平行法と平行法の比較:ランダム化比較試験
3. 学会等名 日本集中治療医学会第5回関西支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹下 淳, 橘 一也, 中山力恒, 中嶋康文, 山下 智範, 志馬伸朗
2. 発表標題 乳幼児の後脛骨動脈・足背動脈カテーテル留置における DNTP を用いた超音波ガイド下穿刺と触知下穿刺の比較:ランダム化比較試験
3. 学会等名 日本麻酔科学会第68回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹下淳、中嶋康文
2. 発表標題 抗凝固療法中の緊急手術:抗凝固療法の再開
3. 学会等名 日本心臓血管麻酔学会
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
研究分担者	中嶋 康文  (NAKAJIMA Yasufumi)  (70326239)	関西医科大学・医学部・教授    (34417)	

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
---------	---------