

令和 6 年 6 月 12 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：19K09427

研究課題名(和文) 血小板と白血球の相互作用による敗血症増悪病態におけるmicroRNAの役割の解明

研究課題名(英文) Elucidating the role of microRNA in the exacerbation of sepsis through the interaction between platelets and leukocytes

研究代表者

影山 京子 (KAGEYAMA, Kyoko)

関西医科大学・医学部・研究医員

研究者番号：80347468

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)：我々は、敗血症病態において、血小板から放出されるmicroRNA(miRNA)の白血球や樹状細胞への取り込み(Endocytosis and Membrane Fusion)が、炎症病態を修飾する重要な要因になると考えている。その機序と新しい治療法を見出すために、次世代シーケンサーによる網羅的なmiRNA発現解析、遺伝子導入手技等を用いて、その病態を解明し、今後の遺伝子治療を展開した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

社会的には、この研究成果が敗血症の管理と治療戦略の改善に寄与することが期待されます。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。新たなバイオマーカーの発見は、治療のタイミングを最適化し、よりパーソナライズされた医療を提供するための道を開くかもしれません。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可能性があります。

研究成果の概要(英文)：We tested the hypothesis that in the pathophysiology of sepsis, the uptake of microRNAs(miRNAs) released from platelets by leukocytes and dendritic cells (through endocytosis and membrane fusion) plays a crucial role in modifying the inflammatory state. To explore this mechanism and discover new treatment methods, we used next-generation sequencing for comprehensive miRNA expression analysis and gene introduction techniques to elucidate this pathology and develop future gene therapies.

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 (共通)

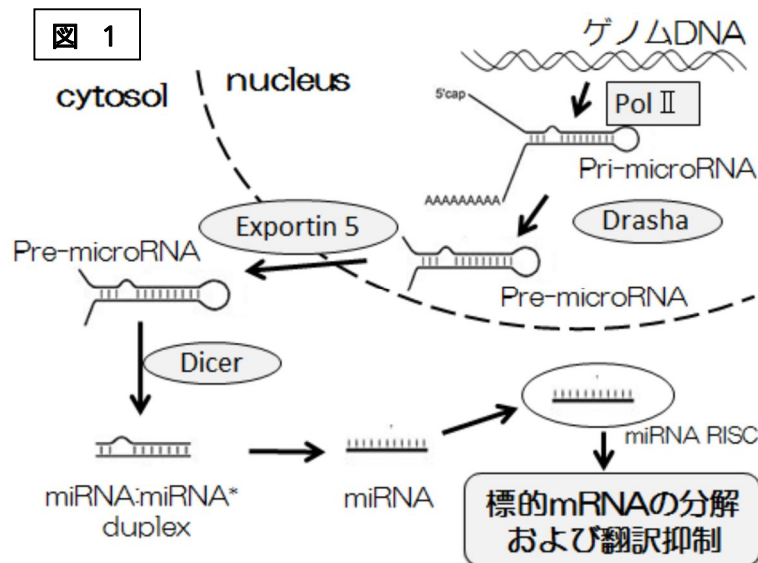
1. 研究開始当初の背景

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と共に、血小板を活性化する。近年、血小板は止血凝固系の本来の役割以外に、免疫系及び炎症系にも関与していることが報告されている (Ware J, et al. *Curr Opin Hematol.* 2013;20:451-6.)。例えば、血小板のバクテリアへの直接の抗菌作用や、好中球との相互作用で好中球より産出される Neutrophil extracellular traps (NETs) により細菌を補足したり、樹状細胞との相互作用で、適応免疫系を賦活することが知られている。しかしこの現象が過度に起これば、好中球より産出される NETs や内因性 Damage-associated molecular patterns (DAMPs) により、病的血栓や臓器障害を来す可能性がある。また以前より、敗血症の病態において血小板数の減少が、患者予後不良因子として知られているが、その病態は未だ検討の余地がある (Pigozzi L et al. *Intensive Care Med.* 2016 42:583-586.)。

血小板膜表面のパターン認識受容体である Toll Like Receptor 4 (TLR4) が、敗血症病態に関与する機序を調べると、LPS 投与により TLR4 受容体等を介して血小板が活性化されることで、血小板凝集能や、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現象 (Aslam R et al. *Blood* 2006; 107:637-41, Zhang G et al. *J Immunol* 2009; 182: 7997-8004.) や、好中球との相互作用で NETs を放出する現象に関与する事も知られている (Clark SR, et al. *Nat Med.* 2007;13:463-9.)。以上より、TLR4 受容体を介して血小板から miRNA を多く含むマイクロパーテイクルが放出される仮説が考えられる (Vallance TM et al. *Mediators Inflamm.* 2017; 9605894.)。

ヒトゲノムプロジェクトにより、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、大部分はタンパク質を作らない領域 (非コード領域) であった。近年、その領域に 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、複数のタンパク質と複合体を形成して、標的となる伝達 RNA に結合し翻訳を抑制する。また1つの遺伝子の制御に複数の miRNA が関与する一方で、1つの miRNA が複数の遺伝子発現に関与している (図 1)。

当初、miRNA は細胞内に局在し、母細胞の遺伝子発現の調節に関与するとされたが、最近の研究から、細胞への分子輸送に関与するマイクロパーテイクルや、エクソソームに豊富に含まれることが分かっ て き た (分 泌 型 miRNA) (Zhang J, et al. *Genomic*



s Proteomics Bioinformatics. 2015 ;13 :17-24.) 。

最近の我々の研究では、人工心肺下心臓手術周術期に惹起される血小板機能低下、及び炎症病態に及ぼす血小板内情報伝達系、及び血小板由来 miRNA の役割に関して、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析を含めて、*In Vivo*, *In Vitro* 両面から探索する事を主眼に研究を施行した。その結果、心臓血管周術期の血小板機能低下、炎症病態制御に特定の miRNA が関与していることを証明し、今後の遺伝子治療の研究展開をしたいと考えている (Mukai N, et al. Crit Care Med. 2018Aug;46(8):e761-e767.)。

2. 研究の目的

我々は、敗血症病態において、血小板から放出される microRNA (miRNA) の白血球や樹状細胞への取り込み (Endocytosis and Membrane Fusion) が、炎症病態を修飾する重要な要因になると考えている。その機序と新しい治療法を見出すために、次世代シーケンサーによる網羅的な miRNA 発現解析、遺伝子導入手技等を用いて、その病態を解明し、今後の遺伝子治療を展開したい。

3. 研究の方法

健康成人被験者から、1回 20ml の採血を行う。クエン酸採血後、遠心操作にて洗浄血小板溶液作成、及び Histopaque 等を用いて好中球の分離を行う。

好中球との共培養実験

蛍光倒立顕微鏡での観察下に、フローチャンバーシステムを用いた好中球と、血小板の共培養系において、LPS、ヒストン、HMGB-1 等を含む (コントロール群は含有しない) 培養液で負荷した血小

板を、好中球が生着した培養器に還流し、好中球の脱顆粒化、NETs、ヒストンを蛍光色素染色後、半定量化し検討する。

miRNA の分離と濃縮

血小板、好中球、及び還流液検体から、mirVana™ miRNA Isolation Kit 等を用いて miRNA を抽出する。

- 1) **包括的 miRNA の発現プロファイリング** 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も、優れた次世代高速シーケンサー Ion PGM システム (Life Technology 社)を用いる。
- 2) **Small RNA のライブラリ作成** Ion Total RNA-Seq Kit を用いる
- 3) **cDNA に変換、増幅** 逆転写後、エマルジョン PCR 法で、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 形式データの転送。

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。選別された miRNA のターゲットとなる伝達 RNA を複数の miRNA Prediction Tool (Miranda, TargetScan Human5.0, PicTar, miRBase Targets Version 5.0)より、特に細胞死・炎症惹起物質に関連する伝達 RNA に相補配列のある miRNA を選別する。

特定 miRNA の検出と定量

Real-Time PCR 法で、miRNA 発現の絶対定量を行う。また、上記の実験で特に還流液中で上昇した(血小板由来と考えられる)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、好中球へ遺伝子導入し、好中球の脱顆粒化、NETs、ヒストンを蛍光色素染色後、半定量化し比較検討する。

4 . 研究成果

敗血症時の血小板と好中球の相互作用において、血小板由来 miRNA の役割を、ヒト正常血小板、好中球を用いた共培養実験系 (In Vitro 系) で、施行した。健康成人被験者約 20 名から、各々 1 回 20ml の採血を行う。クエン酸採血後、遠心操作にて洗浄血小板溶液作成、及び Histopaque 等を用いて好中球の分離を行った。(miRNA の分離と濃縮) 血小板、好中球、及び還流液検体から、miRNeasy Mini Kit 等を用いて miRNA を含む Total

RNA を抽出した。次世代シーケンサーによる網羅的解析を行い、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0件

〔学会発表〕 計0件

〔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)	近畿大学・医学部・教授 (34419)	

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