

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18440

研究課題名(和文) miR451を標的としたくも膜下出血後遅発性脳虚血に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapy targeting miR451 for DBI after SAH

研究代表者

安彦 友博 (Abiko, Tomohiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：90837684

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)：くも膜下出血後の遅発性脳虚血の病態マーカー及び病態解明の端緒とする目的でマイクロRNA、hsa-miR-451aを解析した。症例ごとの発現をqPCRで検討すると有意にSAH群において高発現が確認された($p=0.0402$)。モデルマウスを用いて同様に血清中のマイクロRNAをマイクロアレイ解析の手法を用いて検討したが、hsa-miR-451aはモデルマウスにおいては2倍以上の差を持って発現が増加ないし低下しているマイクロRNAに該当しなかった。またモデルマウスから脳血管内皮細胞を単離してhsa-miR-451aの既知の標的遺伝子の発現をコントロール群と比較したがいずれも有意な差異は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロRNAは病態を反映する遺伝情報が血流に乗って移動するため、末梢血を解析することで、直接の生検が困難な病変の病勢を評価する事が可能である。この点において、hsa-miR-451aがSAH患者群においてコントロール群と比べて高い発現を認めることが明らかになったことは、生検が極めて困難で、確立された病勢マーカーが確立されていない本病態において、マイクロRNAがバイオマーカーとして利用可能である可能性を示唆した結果であると考えられ、極めて有意義であると考えられる。一方その病態に対する影響を、マウスで検証するためには更なる検証が必要であり、今後の課題が明らかになったものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：microRNA hsa-miR-451a was analyzed in order to clarify biomarker and disease state of delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage. When the expression by case in serum was examined by qPCR, high expression was significantly confirmed in the SAH-group ($p=0.0402$). Similarly, microRNAs in sera were examined using microarray analysis in SAH model mice, but hsa-miR-451a did not correspond to microRNAs whose expression was increased or decreased with more than 2-fold differences in model mice. And, the expression of the known target gene of hsa-miR-451a was compared with the control group by isolating the cerebrovascular endothelial cell from the model mouse, and there was no significant difference either.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：くも膜下出血 マイクロRNA 遅発性虚血性脳障害 バイオマーカー 脳血管内皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血(以下 SAH)は初期の外科的再出血予防治療が成功しても遅発性虚血性脳障害(DBI)が生じることがあり、DBI は SAH の不良な予後の一因となっている。過去 50 年以上に渡り、脳主幹動脈の狭小化である脳血管攣縮が DBI のほぼ唯一の原因と考えられてきたが、欧米の多施設共同ランダム化試験である CONSCIOUS trial により、SAH 後の脳主幹動脈における形態学的な脳血管攣縮の低減が、DBI を必ずしも低減し得なかった事実は、脳血管攣縮と DBI が全くの同義ではないことを改めて明らかにした。近年 DBI に関しては多岐にわたる複雑な事象の関与が証明されつつあるが、根本的な病態解明及び新規治療法の開発には、それらをより包括的かつ一義的に理解する必要があると考え、所属研究グループでは、複数の遺伝子の発現を調節するマイクロ RNA に着目し研究を行っている。その流れの中で、本研究においては、SAH 患者におけるマイクロ RNA の発現及び機能を解析することで SAH 後 DBI の病態の解明と新規治療法の開発を志すに至った。本研究の核心をなす学術的「問い」は「所属研究グループの先行研究において同定した hsa-miR-451a は機能的に DBI に関与しているのか。また関与しているとすれば hsa-miR-451a を抑制することで DBI を軽減することは可能であるのか。」というものである。

SAH 後の DBI に対しては未だ有効な診断法、治療法が確立されたとはいえず、DBI は SAH の予後規定因子となっている。所属グループの先行研究で、SAH 群においてコントロール群としての未破裂脳動脈瘤群と比較して末梢血液中での発現プロファイルが変化している複数のマイクロ RNA を同定した。本研究では同定したマイクロ RNA の DBI への関与を明らかにする目的で、hsa-miR-451a に注目して発現及び機能解析を行う。SAH 患者毎に、血清中 hsa-miR-451a の発現を解析し、また、所属研究グループにおいて確立されている SAH モデルマウス脳切片上で *in situ* hybridization を行い、当該マイクロ RNA が作用する脳内での局在を明らかにする。また、モデルマウスにおいて hsa-miR-451a のマウスオルソログの inhibitor を用いたマイクロ RNA の機能解析及び治療実験を行い、SAH 後 DBI に対する hsa-miR-451a の関与を明らかにするとともにマイクロ RNA もしくはその標的遺伝子産物を標的とした新規治療法確立の可能性を模索する。

2. 研究の目的

本研究の目的は所属研究グループの先行研究において同定した hsa-miR-451a のくも膜下出血の不良な予後を助長する主因のひとつである DBI への関与を明らかにすることにある。臨床検体を用いた発現解析を行い、さらに培養細胞やモデルマウスを用いた機能解析を行うことで、SAH 後 DBI の病態の解明と新規治療法の開発を目指す。これまで、SAH とマイクロ RNA に関して、ヒトの血液及び髄液中発現プロファイルの報告、及びモデル動物の血中発現プロファイルの研究はそれぞれ数例報告があるが、渉猟範囲内で SAH 後の DBI に対する治療を目的としたマイクロ RNA の機能解析及び治療実験に関しては既に報告された先行研究はなく、新たな知見が得られる可能性があるものと考えている。また、hsa-miR-451a のマウスにおけるオルソログである mmu-miR-451a の発現及び機能解析を SAH モデルマウスで行なう点に本研究の独創性があると考えており、*in vivo* での検討を行うことで実際の臨床応用への可能性が開けてくるものと考えている。予想される結果としては、SAH 後 DBI モデルマウスにおいて mmu-miR-451a の inhibitor を側脳室内投与することでモデルマウスの DBI を反映した神経症候を改善する可能性を考えており、miR-451a を抑制することで SAH 後 DBI の治療が可能になるとともにその標的遺伝子を解析することで、未だ明らかでない SAH 後 DBI のメカニズムを明らかにすることができると考えて研究を開始した。

3. 研究の方法

自験のくも膜下出血患者 7 例とコントロール群としての未破裂脳動脈瘤患者 4 例から提供を受けた血液から血清を分離し、それぞれの群で血清を混合したうえでマイクロアレイ解析を行いマイクロアレイの発現プロファイルを評価し、それぞれの群における hsa-miR-451a の発現を評価した。

くも膜下出血患者 10 例とコントロール群としての未破裂脳動脈瘤患者 7 例から同様に血液の提供を受け、血清中の hsa-miR-451a の発現を症例ごとの発現を qPCR を用いて定量的に検討した。

公開されたデータベースである miRTarBase を用いて hsa-miR-451a の標的遺伝子を検索した。

くも膜下出血モデルマウスを用いて同様に血清中のマイクロ RNA をマイクロアレイ解析の手法を用いて検討した。くも膜下出血モデルマウスとしては自家血注入前方循環モデルを用いた。簡潔に述べると、8 週齢の C57BL/6Ncr マウスを腹腔内麻酔ののち、頭部を固定、bregma の 4.5 mm 前方の傍正中部に小孔を穿ち、そこから定位的に 100 μ l の同一個体の顔面静脈から採取した自家血を注入するものである。頭蓋内圧亢進が結果に影響を及ぼすことを避けるため、モデルマウスと針のみを同様の手技で脳内へ進め、血液は注入しない sham 手術を施した個体をコントロールとして用いた。

前述と同じモデルマウスから大脳皮質を摘出し、酵素処理とセルストレーナーを用いた処理を行い脳血管内皮細胞を単離して hsa-miR-451a の既知の標的遺伝子の発現をコントロール群と比較した。

4. 研究成果

自験のくも膜下出血患者 7 例とコントロール群としての未破裂脳動脈瘤患者 4 例から提供を受けた血液から血清を分離し、それぞれの群で血清を混合したうえでマイクロアレイ解析を行

い、くも膜下出血群において2倍以上の高発現をしている27種類のマイクロRNAを同定(表1)。その一つとして hsa-miR-451a を同定した(くも膜下出血における発現/コントロール群における発現 = 2.05 倍)。続いてくも膜下出血患者 10 例とコントロール群としての未破裂脳動脈瘤患者 7 例から同様に血液の提供を受け、血清中の hsa-miR-451a の発現を症例ごとの発現を qPCR を用いて定量的に検討した(図2)所、その発現は統計学的有意にくも膜下出血患者で上昇していることを確認した($p=0.0402$)。公開されたデータベースである miRTarBase を用いて hsa-miR-451a の標的遺伝子を検索した所、くも膜下出血後の遅発性脳虚血に関与する可能性がある MIF、MMP2、MMP9 が同定された。これらの結果から hsa-miR-451a とその標的遺伝子の発現をモデルマウスを用いて検討した。くも膜下出血モデルマウス(図1)を用いて同様に血清中のマイクロRNA をマイクロアレイ解析の手法を用いて検討したが、hsa-miR-451a はモデルマウスにおいては2倍以上の差を持って発現が増加ないし低下しているマイクロRNA に該当しなかった。またモデルマウスから脳血管内皮細胞を単離して hsa-miR-451a の既知の標的遺伝子の発現をコントロール群と比較したがいずれも有意な差異は認めなかった。結果を総合的に考えると、当初の仮説の通りに hsa-miR-451a がくも膜下出血後の DBI に関与していることを客観的に示し得る所見は本研究の範囲では明らかにはならなかった。

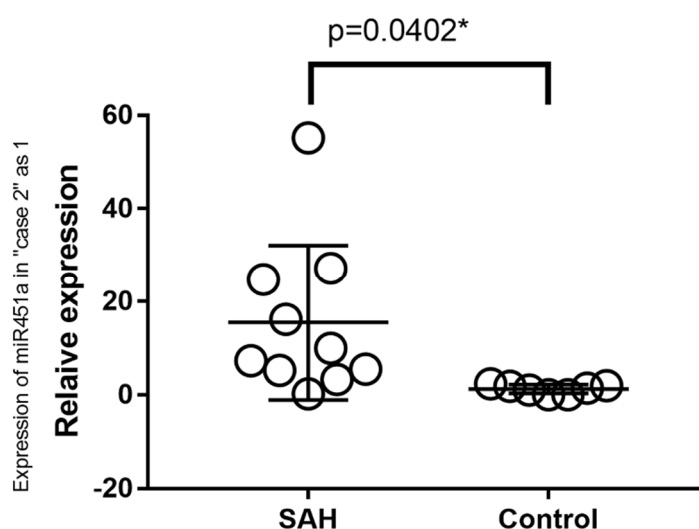
表1 マイクロアレイ解析の結果くも膜下出血群において高発現を認めたマイクロRNA

Name	SAH	Control	Name	SAH	Control
hsa-miR-4428	22	7	hsa-miR-6759-3p	30	14
hsa-miR-4419a	21	7	hsa-miR-1273f	49	22
hsa-miR-5006-5p	25	9	hsa-miR-4743-5p	16	7
hsa-miR-6772-5p	18	6	hsa-miR-5585-3p	91	42
hsa-miR-4698	24	9	hsa-miR-6761-3p	17	8
hsa-miR-3619-3p	195	76	hsa-miR-5189-3p	20	9
hsa-miR-1285-3p	34	14	hsa-miR-6823-3p	18	9
hsa-miR-5096	45	19	hsa-miR-1303	16	7
hsa-miR-4769-5p	21	9	hsa-miR-4800-5p	13	6
hsa-miR-1273a	20	8	hsa-miR-451a	7666	3737
hsa-miR-6086	21	9	hsa-miR-6834-5p	17	8
hsa-miR-6735-3p	17	7	hsa-miR-550a-5p	33	16
hsa-miR-6735-5p	36	16	hsa-miR-363-3p	18	9
hsa-miR-619-5p	304	137			

図1 SAH モデルマウス



図2 症例ごとの hsa-miR-451a の発現



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〕

特記事項はありません。

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

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