様　式　C－19、F－19－1、Z－19　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６年　６月１０日現在

機関番号：１４４０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2023
課題番号：２０Ｋ０９３０５

研究課題名（和文）microRNAプロファイリングによる敗血症の病態解明と次世代マーカー開発

研究課題名（英文）Profiling of circulating micro RNA expression in patients with sepsis

研究代表者
梅村　穣（Umemura, Yutaka）

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：２０７４３５６１

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）：まず敗血症患者30名、健常対照10名を対象として、末梢血白血球に含まれるmRNAおよびmiRNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いて発現パターンを解析した。結果、miRNAとmRNAの発現が有意な相関、逆相関するいくつかのパターンが明らかになった。続けて患者12名、健常対照4名を対象として、白血球のmRNA、miRNAに加えて、循環miRNAのシークエンシングを行い、敗血症と対照と比較して変化のある遺伝子を解析した。白血球mRNAの中では、GATA3などのTh2シグナル経路に関与する遺伝子が最も抑制されていた。循環miRNAでは、GATA3 mRNAと関連する12RNAの発現上昇を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究結果は敗血症患者における炎症・臓器障害を進行させる重要なメカニズムの一つとして、miRNAによるmRNA発現の制御が関与している可能性を示唆するものであった。また同じ経路を制御するためのmiRNAでも白血球と循環中のRNAで発現が大きく異なることが示され、炎症における細胞間の情報伝達の全容解明に大きく寄与する結果と考えられる。今後は信頼性の高い次世代マーカーとしての精度や簡易的な測定基盤を整えるための研究推進が必要であり、本研究はその基盤となるものである。

研究成果の概要（英文）：In the first phase of the study, mRNA and miRNA contained in peripheral blood leukocytes were extracted from 30 patients with sepsis and 10 healthy controls, and the expression patterns of mRNA and miRNA were analyzed using a next-generation sequencer, and compared between healthy subjects and sepsis. As a result, the expression of miRNA and mRNA in sepsis leukocytes was significantly correlated and several patterns were inversely correlated. In the second phase of the study, 12 patients and 4 healthy controls were subjected to RNA sequencing of plasma miRNA (circulating miRNA) in addition to leukocyte mRNA and miRNA, and differentially expressed genes were analyzed compared to sepsis patients and healthy controls. Among leukocyte mRNA, genes involved in the Th2 signaling pathway, such as GATA3, were the most repressed. In circulating miRNA, increased expression of 12 RNAs associated with GATA3 mRNA was observed.

研究分野：救急医学

キーワード：敗血症　全身炎症反応　臓器障害　自然免疫　マイクロRNA

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様 式 Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

近年の医療水準の向上にも関わらず、全世界では年間約 2700 万人が敗血症（Sepsis）を発症し、800 万人が死亡するといわれている。経済的喪失も大きく、2011 年の米国の敗血症治療に費やした医療費は 200 億ドルを超え、これは全ての疾患の中で最多であった。患者の社会生活の破綻、介護の必要性、長期間の療養など、敗血症に関連した総費用を考慮した場合の経済的喪失は巨額に及ぶと推定される。
これまでに敗血症におけるショックや臓器障害の原因となる炎症性メディエーターを制御し、根本的に病態を改善することを目的として、多くの抗炎症療法が研究されてきたが、現時点で有効性が証明された治療は皆無である。敗血症における炎症性メディエーターは互いに複雑なネットワークを形成し、協調や拮抗など相互に作用し合うことで免疫系全体を制御している。したがって炎症カスケード全体を制御し根本的に敗血症の病態を改善させるためには、急性炎症反応の根底にあるメカニズムを解明し、それを反映する評価系の確立が必要である。
Micro RNA（miRNA）は低分子 non-coding RNA の一種で、相補的な配列を持つ Messenger RNA (mRNA) に結合して翻訳抑制による遺伝子の発現抑制を行っている。近年、末梢血中の miRNA が細胞間の情報伝達に重要な役割を果たしていることが示され、遺伝子調節療法や薬剤標的の発見、 悪性腫瘍の早期診断など多くの分野での応用が期待されている。miRNA は疾患によって固有の発現パターンを示すことが明らかにされたが、敗血症を始めとした急性炎症病態における発現パターンは十分に解明されていない。申請者が行った予備的研究では mir-99、mir-215、mir-328 などいくつかの miRNA 発現がラット敗血症モデルにおける炎症の進行に影響している可能性が示唆された。こうした背景から末梢血中の miRNA を介した細胞間情報伝達が敗血症固有の炎症カスケードに重大な関連がある可能性が高いと考え本研究を計画した。

２．研究の目的

本研究は、敗血症患者における末梢血中 miRNA に着目し、その発現パターンを解明することで、敗血症における炎症と臓器障害の進行するメカニズムを解明し、次世代の高感度バイオマーカーとしての可能性を探索することを目的としている。

３．研究の方法

研究(1)

敗血症患者、健常者における末梢血中の白血球より mRNA および miRNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて発現パターンを解析する。両者の発現パターンを照らし合わせることで miRNA のターゲットとなる RNA を解析し、このパターンを健常者と敗血症で比較する。具体的な研究方法は以下の通りである。

mRNA 発現パターンの解析

被験者の全血検体を採取し、次世代シークエンサーを用いて末梢血白血球に含まれる総 RNA を抽出・処理したのち、mRNA のみを選択する。得られたデータを Ingenuity® Pathway Analysis（IPA）にインポートし照会することで、インプットデータと既知のパスウェイを比較、敗血症と健常者の間で有意な変化（fold change）のあった mRNA を抽出する。本研究では|min FC|＝2.0, False Discovery Rate <0.1 を有意とした。

miRNA 発現パターンの解析

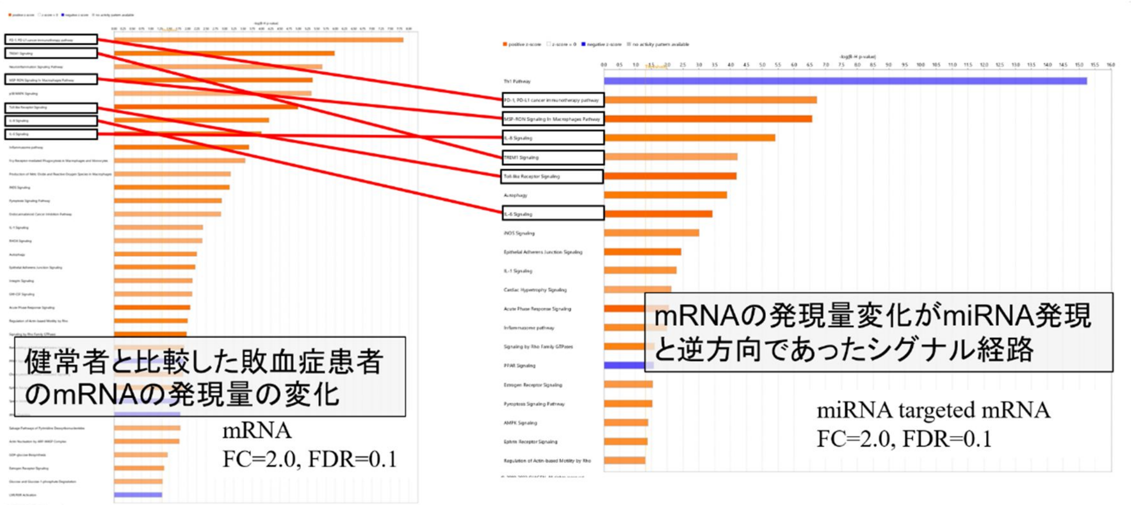
次世代シークエンサーを用いて末梢血白血球に含まれる総 RNA を抽出・処理したのち、MIMATID と照合することで miRNA のみを選択する。得られたデータを IPA にインポートし照会することで、インプットデータと既知のパスウェイを比較、敗血症と健常者の間で有意な変化（fold change）のあった mRNA を抽出する。本研究では|min FC|＝2.0, False Discovery Rate <0.1 を有意とした。
以上の工程において、mRNA と miRNA で fold change が逆方向のものを miRNA targeted mRNA として抽出し canonical pathway を描画した。

研究(2)

敗血症患者、健常者における白血球の mRNA、miRNA に加えて、血漿 miRNA（循環 miRNA）の RNA シークエンシングを行い、それぞれの発現パターンを比較評価した。具体的な研究方法は以下の通りである。研究①と同様の手順で被験者の全血検体より白血球 mRNA、白血球 miRNA、血漿 miRNA（循環 miRNA）を抽出し RNA シークエンシングを行った。
3 種類の RNA それぞれにおいて、健常者と敗血症患者で発現量が大きく上昇、または低下した RNA を発現変動遺伝子(DEGs, Differentially Expressed Genes)として抽出し（｜log2 Fold Change｜1.2、False Discovery Rate＜0.05)、canonical pathway を描画した。

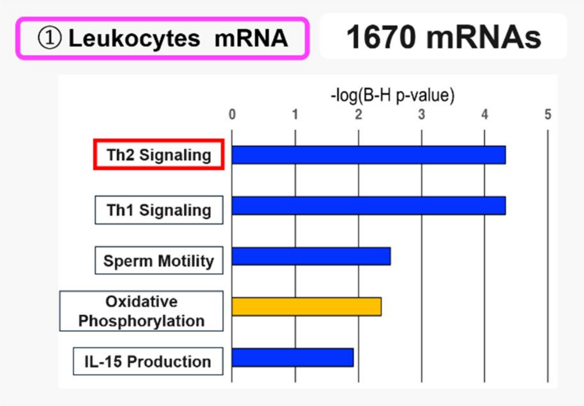
４．研究成果

研究(1)
敗血症患者 30 名、健常対照 10 名を対象として末梢血中白血球に含まれる mRNA、miRNA のシークエンシングを行った。mRNA は 14497RNA、miRNA は 1093RNA を抽出した。白血球の miRNA を介した mRNA 制御は PD-1・PDL1 経路、MSP-RON 経路、IL-8 経路、TREM1 経路、TLR 経路、IL-6 経路など複数の炎症制御経路において健常者と敗血症患者で大きく異なっていた。(↓図)

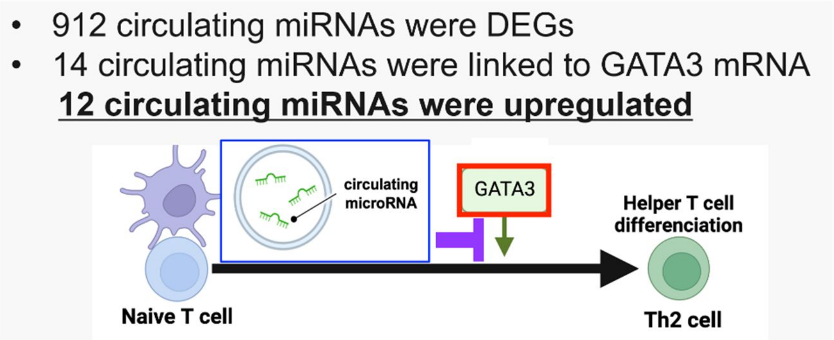


以上の結果より敗血症における炎症・臓器障害の進行に miRNA による mRNA の制御が大きく関与している可能性が示された。

研究(2)
敗血症患者 12 名、健常対照 4 名を対象として末梢血を採取、白血球および血漿を分離し、それぞれに含まれる mRNA、miRNA のシークエンシングを行った。
抽出された白血球 mRNA は 19153RNA であり、うち DEG は 1663（down-regulation:1072, up-regulation:591）であった。Canonical pathway analysis を行ったところ、Th2 シグナル伝達が最も抑制されたことが明らかとなった（右図）。
Th2 シグナル伝達経路は病原体やアレルゲンに反応する 2 型ヘルパーT 細胞の分化プロセスであり、通常は感染時に活性化される。本研究の結果は敗血症において通常の生理的宿主反応が惹起されないことを示唆している。また mRNA の DEG の中には Th2 シグナル伝達に関与する重要な遺伝子である GATA3 も含まれていた。



同様に抽出された白血球 miRNA は 1777RNA であり、うち DEG は 14（down-regulation:7, up-regulation:7)、循環 miRNA は 2633RNA であり、うち DEG は 912（down-regulation:435, up-regulation:477）であった。白血球 miRNA の DEG の中には GATA3 の mRNA に結合した miRNA は認めなかったが、循環 miRNA の DEG のうち、14RNA が GATA3 mRNA に結合した遺伝子であり、さらにそのうち 12RNA は up-regulation されていた。(↓図)。



以上の結果より敗血症における炎症・臓器障害の進行には Th2 シグナル伝達経路の異常が関与しており、さらにその制御には白血球ではなく循環中の miRNA が強く関与している可能性が示された。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計3件（うち招待講演　2件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 梅村　穣
２．発表標題 敗血症における細胞間情報伝達と凝固線溶障害の関連
３．学会等名 第50回日本救急医学会総会・学術集会（招待講演）
４．発表年 2022年

１．発表者名 小田　紗矢香
２．発表標題 Evaluation of circulating miRNAs that regulate sepsis based on mRNA-microRNA integration analysis
３．学会等名 第51回日本集中治療医学会学術集会
４．発表年 2023年

１．発表者名 梅村　穣
２．発表標題 A Machine Learning Model for Early and Accurate Prediction of overt-DIC before its progression to an overt stage
３．学会等名 International Society on Thrombosis and Haemostasis 2023 Congress（招待講演）
４．発表年 2023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	嶋津　岳士 (Shimazu Takeshi) (50196474)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	

６．研究組織（つづき）

	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	山川　一馬 (Yamakawa Kazuma) (50597507)	大阪医科薬科大学・医学部・准教授 (34401)	
研究分担者	小倉　裕司 (Ogura Hiroshi) (70301265)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	藤見　聡 (Fujimi Satoshi) (70362720)	地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪急性期・総合医療センター（臨床研究支援センター）・救急診療科・主任部長 (84432)	
研究分担者	松本　寿健 (Matsumoto Hisatake) (70644003)	大阪大学・医学部附属病院・特任助教（常勤） (14401)	

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