

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17824

研究課題名(和文)敗血症時の免疫抑制病態と骨髄由来抑制細胞由来microRNAによる制御機構の役割

研究課題名(英文)Elucidation of the pathology concerning immunosuppression in severe sepsis, and control by microRNA derived from myeloid-derived suppressor cell.

研究代表者

大平 早也佳(OHIRA, Sayaka)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：90786724

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)：骨髄由来抑制細胞の細胞培養実験において、免疫磁気分離したCD11b+CD14-CD33+細胞を糖濃度の異なる培養液に静置し、LPS投与の有無で、どのようにmRNAおよび、miRNAの発現が変化するか観察する研究を施行した。

miRNA, 及びmRNA発現の次世代シーケンサーによる網羅的解析は、外部委託業者に依頼した。また、同じ被験者の検体を用いて、mRNAおよびmiRNAのリアルタイムPCRを施行した。RNAseqにより取得したデータのmRNA発現の網羅的解析に関しては、キアゲン社のIPAソフトウェアを用いて、パスウェイ解析を施行した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄由来抑制細胞(MDSCs)は多くの免疫抑制をもたらす細胞群の中で、癌患者における免疫抑制の主要な部分を担うとして重要視されてきた。MDSCは癌や炎症によって、本来骨髄中に存在する細胞が癌局所や全身の血液循環に出現する未熟な細胞群です。もともと均一でない細胞群とされますが、この中にはgranulocytic MDSCと monocytic MDSCが存在する。

免疫抑制が近年、敗血症病態における骨髄由来抑制細胞(MDSCs)の免疫抑制作用に注目されているが、次世代シーケンサーを用いて、トランスクリプトーム解析(mRNA, miRNA)を、網羅的に解析した研究は無い。

研究成果の概要(英文)：After isolation of human myeloid-derived suppressor cells (CD11b+CD14-CD33+ cells) with magnetic beads, we have conducted the experiment evaluating the changes in mRNA and miRNA expression in cell culture study with LPS application and different glucose concentration. We have conducted the comprehensive analysis of mRNA and miRNA by next generation sequencing with outsourcing. Further, we have conducted the pathway analysis using RNAseq data.

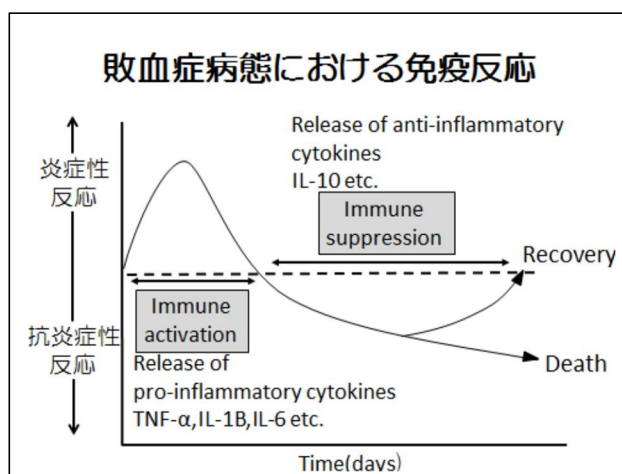
研究分野：集中治療、麻酔

キーワード：敗血症 microRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

敗血症病態では、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、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)。



耐糖能障害を伴う（重症）敗血症では、過剰な免疫抑制状態が生じ、予後不良を来す。敗血症患者において、生体内で免疫担当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、培養実験系において、LPS によるマクロファージの死細胞貪食低下の機序を検討する報告 (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。(右上図)

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。我々は血球や血管内皮細胞が産生する miRNA が、炎症病態を修飾する重要な要因になると考えている。

骨髄由来抑制細胞 (MDSCs) は多くの免疫抑制をもたらす細胞群の中で、癌患者における免疫抑制の主要な部分を担うとして重要視されてきた。MDSC は癌や炎症によって、本来骨髄中に存在する細胞が癌局所や全身の血液循環に出現する未熟な細胞群です。もともと均一でない細胞群とされますが、この中には granulocytic MDSC と monocytic MDSC が存在する。免疫抑制が近年、敗血症病態における骨髄由来抑制細胞 (MDSCs) の免疫抑制作用に注目されているが、次世代シーケンサーを用いて、トランスクリプトーム解析(mRNA, miRNA)を、臨床研究との関連を含めて網羅的に解析した研究は無い。

2. 研究の目的

(重症)敗血症病態の中で、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、また microRNA (miRNA) による制御に関して報告してきた。様々な病態制御に関与している miRNA が及ぼす敗血症病態における骨髄由来（免疫）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、敗血症における骨髄由来抑制細胞 (MDSCs) の役割と、今後の遺伝子治療の可能性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(培養細胞研究)

健常者から採血を行い、ヒト骨髄由来抑制細胞 (MDSCs) のセレクション後培養実験を行い、LPSの有無および糖濃度の違いにより、mRNA および miRNA の発現の違いを観察する。

過去の動物実験で敗血症マウスで有意に上昇変化のあった miRNA を、マウス骨髄由来抑制細胞 (MDSCs) 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 S100 A8/A9, S100 A12, Arginase 1 等の産生能の変化を解析する。

(臨床研究)

ICU 入室患者を対象に、1)非敗血症患者、2)敗血症患者から採血後、ヒト骨髄由来抑制細胞 (MDSCc) を単離し、動物実験系及び培養細胞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。

4. 研究成果

マウスでは骨髄由来抑制細胞 (MDSCs) 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+ の細胞を骨髄由来抑制細胞 (MDSCs) とすることが多い。したがって、健常人から採血を行い単核球 (mononuclear cells) からポジティブセレクションにより CD11b+CD14-CD33+ 細胞の免疫磁気分離し、その細胞から mRNA および、miRNA の単離を行い、恒常的に次世代シーケンサー測定に必要なための mRNA および、miRNA の収量が確保できるための、全血の採取量を調査した。

その結果、リアルタイム PCR 測定のための RNA の収量は確保できたが、シーケンサー測定のための実験キットが要求する RNA の収量が、臨床研究申請において軽微な侵襲に該当する全血 20ml 以内では確保できないために、シーケンサー実験の場合のみ複数人の血液から各々単離した RNA を混合して使用することとした。

敗血症患者を対象とした臨床研究を始める前に、細胞培養実験において、免疫磁気分離した CD11b+CD14-CD33+ 細胞を糖濃度の異なる培養液に静置し、LPS 投与の有無で、どのように mRNA および、miRNA の発現が変化するか観察する研究を施行した。

miRNA, 及び mRNA 発現の次世代シーケンサーによる網羅的解析は、外部委託業者に依頼した。また、同じ被験者の検体を用いて、mRNA および miRNA のリアルタイム PCR を施行した。RNAseq により取得したデータの mRNA 発現の網羅的解析に関しては、キアゲン社の IPA ソフトウェア (<https://tv.qiagenbioinformatics.com/video/64474187/qiagen-ipa-7-canonical-pathway>) を用いて、パスウェイ解析をおこなった。

また同時に施行したリアルタイム PCR の結果と比べると、mRNA に関しては、シーケンサーの結果とほぼ一致しているが、miRNA に関しては一致が認められないものが多数あったために、リアルタイム PCR の結果を採用することにした。したがって、有意に変化のあった遺伝子の mRNA をターゲットとする miRNA に関しては、miR TarBase

(https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase_2022/php/index.php) のサイトから ウェットラボでターゲットとすることが証明されている miRNA をリアルタイム PCR で評価した。

また、研究委託業者に依頼していた研究に関しては、コロナ禍で勤務時間が短縮されていたために、また、自施設で行った研究は試薬の海外からの配送が大幅に遅延することもあり、予定より実験が遅れたため、現在も同研究を遂行し、学会報告および、論文が未投稿なため、詳細な実験結果に関しては、報告を控える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Nishimoto K, Umegaki T, Ohira S, Soeda T, Anada N, Uba T, Shoji T, Kusunoki M, Nakajima Y, Kamibayashi T.	4. 巻 7332027
2. 論文標題 Impact of Permissive Hypoxia and Hyperoxia Avoidance on Clinical Outcomes in Septic Patients Receiving Mechanical Ventilation: A Retrospective Single-Center Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioMed research international	6. 最初と最後の頁 7332027
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2021/7332027	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 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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大平早也佳, 梅垣岳志, 西本浩太, 添田岳宏, 右馬猛生, 山木 壮, 中嶋康文, 上林卓彦
2. 発表標題 肝臓切除術後急性心筋梗塞から心停止に至った1症例
3. 学会等名 第48回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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