

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861527

研究課題名(和文)敗血症病態におけるmicroRNAによる単球系細胞内小胞体ストレス制御機序の解明

研究課題名(英文)miRNAs controlling endoplasmic reticulum stress in monocytes in a sepsis model

## 研究代表者

石井 祥代(Ishii, Sachiyo)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：40457958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：単球系細胞、ヒトマクロファージ敗血症モデルにおいて、経時的な貪食能および小胞体ストレス関連分子であるCHOPの発現変化を確認した。また、次世代シーケンサーIon PGMシステムを用いてmiRNAの発現を観察し、miR-21など数種類のmiRNAの変化を認めた。変化のあったmiRNAの遺伝子導入による過剰発現により、貪食能の変化を確認し、miRNAによる貪食能の制御が示唆された。現在miRNAの小胞体ストレスへの影響を検討しており、今後敗血症ラットモデルにおいても同様に検討していく予定である。

研究成果の概要(英文)：In the sepsis model used, cultured monocytes and human macrophages were treated with LPS, leading to time-based changes in their phagocytic abilities and in the mRNA and protein levels of CHOP, which is an endoplasmic reticulum stress related molecule. Moreover, we observed altered expression of miR-21 using the Ion PGM system for next-generation sequencing, suggesting that the over-expression or downregulation of miRNAs by gene transfection might induce changes in phagocytic abilities. Currently, we are in the process of examining the effect of miRNA transfection on endoplasmic reticulum stress, and in future, plan to study the effect in a rat sepsis model.

研究分野：集中治療医学、麻酔科学

キーワード：micro RNA 敗血症 小胞体ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

敗血症患者における死亡率を規定する要因として近年、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)が、その機序はまだ不明な点が多い。

小胞体は、タンパク質の合成および折りたたみなどのプロセッシングを行っているが、感染や炎症といったストレスにより変性タンパク質(unfolded protein)が小胞体内に蓄積する。細胞は本来、この小胞体ストレスに対し小胞体ストレス応答(unfolded protein response: UPR)と呼ばれる恒常性を維持する仕組みが備わっているが、一部の病態、疾患において、UPRに異常を生じることが知られている。たとえば、敗血症病態においては、CHOPノックダウンマウスにおいてLPS投与による肺障害が抑制される報告(Endo M, et al. J Immunol. 2006;176:6245-53.)などがある。我々は、LPS投与下高糖濃度負荷実験により、敗血症の高糖病態において、単球系細胞の細胞死の促進、貪食能の低下を認め、その細胞内情報伝達機序として小胞体ストレスの関与が示唆されたことを2013年第60回日本麻酔科学会学術集会で報告し、小胞体ストレスが敗血症病態の免疫抑制状態に寄与していると考えている。

また近年microRNA(miRNA)が、細胞増殖・アポトーシス・代謝など多岐にわたり生命現象に深く関わっていることが報告されているが、単球系細胞における小胞体ストレスと貪食能などの機能に及ぼすmiRNAの関与に着目した報告は少ない。我々の実験グループではヒトマクロファージにおけるmiRNAの発現

とその作用について研究を行っており、2013年第60回日本麻酔科学会学術集会の救急・ICU部門において、LPS投与によるマクロファージにおけるmiR-21の発現とその貪食能への影響について報告し、優秀演題となった。今回我々は、敗血症病態の免疫抑制状態における細胞情報伝達系を解明するにあたり、予備実験においてLPS刺激によるマクロファージの細胞死増加、小胞体ストレス、貪食能の経時的变化においてmiR-211, -204, -106bの発現が影響を与える可能性が示唆されたため、敗血症患者においても同様の変化があるかを確認するとともに、これらのmiRNAを制御することで敗血症病態の改善が図れるとの仮説のもとに実験を施行する。

## 2. 研究の目的

重症敗血症では、過剰な免疫抑制状態が生じると予後不良を来す。我々は敗血症病態において単球系細胞が貪食能低下や細胞死を起し、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学会等で報告してきた。様々な病態制御に関与しているmiRNAの発現が、敗血症病態におけるマクロファージの機能に、どのような影響を及ぼしているかを、小胞体ストレスの変化に注目して細胞培養実験及び臨床研究の両面から検討し、敗血症病態に対する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

(1) 敗血症病態におけるマクロファージ機能(貪食能)の経時的变化、小胞体ストレスに関与する細胞内情報伝達系変化、miRNA発現変化の検討

In Vitro系: 単球系培養細胞(THP-1細胞)

およびヒトマクロファージを培養し、LPS 負荷を行った敗血症モデルを用いて miRNA 発現、小胞体ストレスに關与する細胞内情報伝達系変化、細胞死、マクロファージ機能の経時的变化を觀察する。

In Vivo 系：重症敗血症患者より採血したヒト単球・マクロファージにおける miRNA、小胞体ストレスに關与する細胞内情報伝達系変化、単球・マクロファージ機能の経時的变化を觀察し、患者重症度、予後との關連を解析する。敗血症ラットモデルの血中/腹腔内マクロファージにおける miRNA、小胞体ストレスに關与する細胞内情報伝達系変化、マクロファージ機能の経時的变化を觀察し、LPS の容量、盲腸穿孔の大きさに伴う生存率の変化と、上記変化との關連を解析する。

#### (2) 敗血症病態における miRNA による制御の検討

(1)において変化を認めた miRNA の遺伝子導入によって、単球系培養細胞、ヒトマクロファージの小胞体ストレスに關与する細胞内情報伝達系変化、細胞死、マクロファージ機能の変化を觀察することで、miRNA の発現による影響を検討する。

#### 4. 研究成果

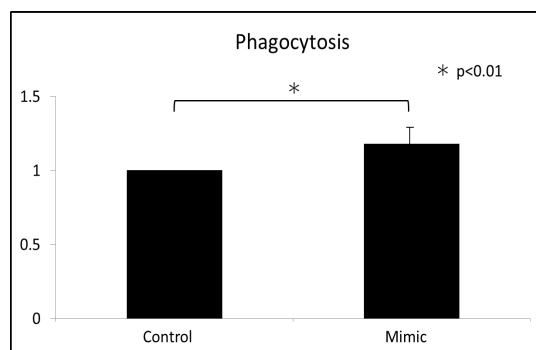
(1) 敗血症病態におけるマクロファージ機能(貪食能)の経時的变化、小胞体ストレスに關与する細胞内情報伝達系変化、miRNA 発現变化の検討

マクロファージの貪食能は LPS 投与後、早期相では増加するが、長期相では減少するという経時的变化を認めた。また、これに伴い、小胞体ストレス關連分子である CHOP の発現变化を mRNA(Real Time PCR 法)、タンパク質(Western blot 法)レベルで増減を認めた。このため、敗血症状態においてマクロファージの貪食能の制御に小胞体ストレスが關係していることが示唆された。

また、Ion PGM を用いた経時的な miRNA の発現变化では miR-21 を始めとする数種類の miRNA の变化を認め、現在变化を認めた miRNA において、それぞれ Real Time PCR 法を用いて発現量を確認している。

#### (2) 敗血症病態における miRNA による制御の検討

上記の結果より、miR-21 等をヒトマクロファージに対し Nucleofector™ 法を用いた遺伝子導入を行った。miR-21 の過剰発現、抑制による小胞体ストレスに關与する細胞内情報伝達系変化、マクロファージ機能の変化を觀察した。現在のところ、miR-21 の過剰発現によってマクロファージの貪食能増加を認めた。その他の miRNA に関しても、貪食能への影響が認められており、これにより貪食能において、miRNA による制御が示唆された。



Mimic: miRNA(miR-21)過剰発現

小胞体ストレスへの miRNA の影響に関しては現在確認しているところである。

#### 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〕

出願状況(計0件)

該当なし

取得状況(計0件)

該当なし

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 祥代 (ISHII, Sachiyo)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻  
医

研究者番号：40457058