

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10314

研究課題名(和文) くも膜下出血後遅発性脳虚血のマーカー及び治療標的としてのmiRNAスクリーニング

研究課題名(英文) microRNA expression profiling in serum of patients with subarachnoid hemorrhage

研究代表者

高橋 里史 (Takahashi, Satoshi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：20383870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：くも膜下出血患者の血清中でコントロールと比較して発現が1/4以下に低下している49種の(hsa-miR-223等)、2倍以上に上昇している27種のマイクロRNA(hsa-miR-451a等)を同定した。モデルマウスでは、頭蓋内圧上昇を5秒とすると、海馬でモデル作成後1日で微小血管基底膜が脱落し、アストロサイトの足突起が基底膜から剥がれた。3日後には基底膜周辺のアストロサイトのGFAP染色性が低下し、神経細胞自体の形態学的、数的変化は認めずに神経機能が障害された。くも膜下出血後のNVU統合性の崩壊は微小血管周囲に始まり、周辺アストロサイトの機能障害を介して、神経機能障害に至る可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：49 microRNAs those express in SAH patients' sera lower than 1/4 and other 27 microRNAs those expressed more than twice compared to those in control sera were identified. Degeneration of basal membrane, and peeling of endfeet of astrocyte from basal membrane was identified in hippocampus of mouse SAH model 1 day after procedure (duration of ICP elevation in the model was as long as 5 s). Three days after procedure, GFAP positive cell was decreased at the same site but no quantitative nor morphological change in neuron was observed. From the current result, we speculate degeneration of NVU starts around microvasculature after SAH, and emerges to surrounding astrocyte that leads to neurological deterioration.

研究分野：脳血管障害

キーワード：くも膜下出血 虚血性脳障害 Neurovascular Unit くも膜下出血モデルマウス 脳循環代謝

1. 研究開始当初の背景

くも膜下出血は死亡率が高く、社会復帰率も低い脳卒中の一型である。壮年期に発症する事も稀ではなく、その予後を改善する事は社会的にも重要である。くも膜下出血の不良な予後は、主にくも膜下出血発症時の脳に対する一次損傷と、発症後からおよそ14日以内に生じる虚血性脳障害による二次的脳損傷の2点に起因するが、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。ゆえに、急性期の再出血予防を目的とした外科的治療が成功してもなお、不良な転帰を辿る症例が少なくない疾患である。以上の現状を背景として本研究を開始した。

2. 研究の目的

くも膜下出血に対して、患者の予後を悪化させる主因のひとつとなっている脳血管攣縮及び遅発性脳虚血といった虚血性脳障害を克服することで、その予後を改善することを目指し、マイクロRNAに注目して、くも膜下出血後の虚血性脳障害に関する病態の早期診断マーカーとして血液中から測定し得る、マイクロRNAを探索するとともに、そこで同定されたマイクロRNAのくも膜下出血後虚血性脳障害への機能的な関与を明らかにすることにより、新規治療法の可能性を模索する事を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

研究は当初の計画通り、(1)くも膜下出血患者と、コントロール群としての未破裂脳動脈瘤患者から提供を受けた血液中のマイクロRNA解析と(2)マウスくも膜下出血モデルの組織学的な検討、2通りの切り口から並行して進めた。

(1)くも膜下出血患者血清中マイクロRNAの探索

慶應義塾大学病院で治療したくも膜下出血患者、及びコントロール群としての未破裂脳動脈瘤患者から手術時に残余検体を研究目的の血液検体として提供を受けて研究を行う事に関して、本研究のプロトコルを当該医療機関(慶應義塾大学病院)の倫理委員会に提出し、許可を得た(倫理委員会承認番号20140326及び20170061)。研究計画に対して書面にて同意を得たくも膜下出血患者及び未破裂脳動脈瘤患者から、手術時に残余検体としての血液の提供を受け、遠心分離し、血清を単離し、 -80° にて保管した。

(1)- マイクロアレイ解析

初期に提供を受けた11検体(くも膜下出血群7例とコントロール群4例)から3D-Gene RNA extraction reagent(東レ、鎌倉)を用いてRNAを単離した。単離したRNAを3D-Gene miRNA labeling kit(東レ、鎌倉)でラベルし、3D-Gene Human miRNA Oligo chips(東レ、鎌倉)にハイブリダイズし、信号を3D-Gene Scanner(東レ、鎌倉)で読み取り、3D-Gene Extraction software(東レ、鎌倉)

を用いて解析し、くも膜下出血患者と未破裂脳動脈瘤患者の血清中において発現量の差を認めるマイクロRNAを同定した。

(1)- qPCRによるマイクロアレイ解析で同定したRNAの発現解析

発現量に関しての2次スクリーニングとして、くも膜下出血患者から提供を受けた11検体とコントロール群としての未破裂脳動脈瘤患者から提供を受けた7検体から血清を分離、更にmiRCURYTM LNATM Universal RT microRNA PCRキット(Exiqon, Denmark)を用いてRNAを単離、単離したRNAを元にRT-PCRを行いcDNAを合成した。合成したcDNAをtemplateとし、 -1 で絶対的な発現量が多く、更にくも膜下出血群においてコントロール群と比較して2倍以上の高発現を認めたhsa-miR-451aの発現をqPCRの手法を用いて定量した。コントロールとしては内在性コントロールとして比較的良く使用されているhsa-miR-103とhsa-miR-93、2種類のマイクロRNAのそれぞれの検体における発現量の平均値を用いてCT法にて定量を行った。両群におけるマイクロRNA発現量の差異はt検定を行い統計学的に有意差の有無を検討した。 $p < 0.05$ を有意とした。

(2)マウスくも膜下出血モデルの作成と脳組織の検討

(2)- くも膜下出血モデルマウス

全てのモデルマウスを用いた研究は慶應義塾大学動物実験センターの許可を得て行った(承認番号14055-(0))。モデルマウス作成には8週齢のC57BL/6Ncrマウスを用いた。モデル作成時にマウスにmedetomidine(0.75 mg/kg)、midazolam(4 mg/kg)、そしてbutorphanol(5 mg/kg)を混合した麻酔薬を腹腔内投与した。くも膜下出血モデルマウスはまず、上記腹腔内麻酔下に頭皮を正中で切開、正中から4.5mm右方、プレグマの直前にNE22E K-042 ElecterGX NSK電気式ドリル(ナカニシ、鹿沼)を用いて小孔を穿ち、この小孔から26G針を用いて矢状面から 80° 、冠状面から 85° の角度をつけて定位的に刺入、頭蓋底に針が触れた所で0.5mm程針を戻し、固定し、この位置で同じ動物の顔面静脈から採取した100 μ lの自家血を5秒間かけて注入した。コントロール群では上記と同様に26G針の刺入まで行ったが、血液の注入は行わなかった。また何も処置をしていないマウスもコントロール群(WP群: without procedure群)として検討した。

(2)- 頭蓋内圧測定

10匹のマウスを用いて上記モデル作成時の頭蓋内圧変化を測定した。血液を注入するために穿った小孔と左右反対の部位に同様の小孔を穿ち、ここから、23Gの針を前述の方法で刺入、この中に細径の光学式圧センサー(FOP-LS-2FR-10; FISO Technologies Inc, Québec, Canada)を挿入し、頭蓋内圧を測定した。頭蓋内圧は血液注入開始の10秒前から60秒後まで2.5秒間隔で測定した。

(2)- モデル動物の CT 撮像

本モデルでの注入した血液の分布を確かめるため、腹腔内麻酔下のモデル動物の脳底槽に上記と同様の方法で 26G 針を進め、自家血の代わりに造影剤 Omnipaque 180 contrast agent (180 mg/ml)を注入し、動物用 CT 装置 (RmCT2 scanner (Rigaku, 東京))にて頭部 CT スキャンを行った。

(2)- Rotarod test

モデル動物の神経機能を評価するために Rotarod test を行った。くも膜下出血モデルマウス 6 匹とコントロール群のマウス 5 匹を 3 rpm の速度で動いている Model 7650 accelerating rotarod (Ugo Basile, Varese, Italy)の装置に乗せ、30 秒後から 5 分かけて等加速度的に装置の速度を 30 rpm にまで加速し、1200s までマウスの落下時間を計測した。テストはモデル作成前及び作成の 1, 3, 5, 7 日目に行った。各々 3 回の平均をスコアとして記録、計測の間少なくとも 15 分の間隔を取った。マウスの個体差が結果に影響すると考え、スコアはモデル作成前のスコアに対する比で評価した。

(2)- Neurovascular Unit(NVU)の評価

モデルマウスにおける NVU を評価する目的でモデル作成の 1,3,7 日目に腹腔内麻酔下にモデルマウスを sacrifice し、パラフィン切片と凍結切片を作成した。

パラフィン切片にて 4 型コラーゲンを染色し、微小血管基底膜を、更に NeuN を染色し、神経細胞の形態及び数を評価した。

凍結切片にて同様に 4 型コラーゲンを染色し微小血管基底膜を、更に GFAP を染色しアストロサイトの形態及び数を評価した。また凍結切片においては二重染色を行うことで基底膜とアストロサイトの統合性を評価した。

(2)- 統計学的処理

マウスモデルに関する統計学的処理は統計ソフト R と R Studio (<https://www.r-project.org/>)を用いて行なった。統計学的検討には Mann-Whitney U test を用い、 $P < 0.05$ 以下を有意と評価した。

4. 研究成果

(1)- マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析の結果 49 種のくも膜下出血群で未破裂脳動脈瘤群と比較してその発現が 1/4 以下に低下しているマイクロ RNA を、反対に 27 種のくも膜下出血群で未破裂脳動脈瘤と比較してその発現が 2 倍以上に上昇しているマイクロ RNA を同定した。前者には hsa-miR-223 が含まれ、後者には hsa-miR-451a が含まれていた。

(1)- qPCR によるマイクロアレイ解析による同定した hsa-miR-451a の発現の定量解析

hsa-miR-451a はくも膜下出血群において未破裂脳動脈瘤群と比較して高発現しており、更にその絶対的な発現量が高かったため、

qPCR を用いた発現の 2 次スクリーニングを行った。

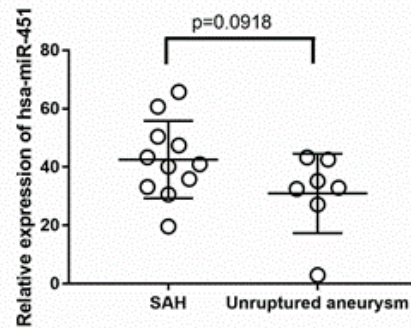


図 1

結果、くも膜下出血群において hsa-miR-451a の発現が比較的高い症例が散見されたものの統計学的な有意差を認めるには至らなかった ($p=0.0918$) (図 1)。

(2) マウスくも膜下出血モデルの作成と脳組織の検討

モデルマウスで頭蓋内圧が 100 mm Hg 迄上昇する血液注入時間を 5 秒とすることで、海馬においてモデル作成後 1 日でまず NVU の構成要素である微小血管基底膜が脱落し、アストロサイトの足突起も基底膜から剥がれることが確認された (図 2)。また、このモデル作成後 1 日目の段階ではモデルマウスの神経機能障害は認めなかった (図 3)。モデル作成後 3 日になると上述の基底膜は再生されてくるが、基底膜周辺のアストロサイトの GFAP 染色性が低下した。この段階で神経細胞自体の形態学的、数的変化は認めなかったがマウスは神経機能障害を呈した。つまり、モデル作成後 3 日目の段階で、神経細胞に有意な脱落は認めずに、神経機能障害を生じることが明らかになった (図 3)。上記から SAH 後の NVU 統合性の崩壊はまず基底膜脱落、足突起の脱落といった微小血管周囲の障害に始まり、それが周辺のアストロサイトの機能障害を介して、神経機能障害を起こしてくる可能性があると考えられた。その際にまだ神経細胞は修復可能な状態にあると考察しており、今後、更に研究を進展させ、くも膜下出血術後早期に導入可能な微小血管周囲の NVU 統合性を保持を介した新規脳保護療法を確立することで、続発する NVU 統合性崩壊のカスケードを止め、神経機能障害を抑制、更には神経機能を改善し得る可能性があると考えている。

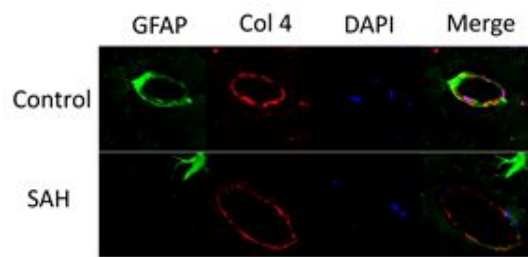


図 2. モデルマウス Day 1 の免疫染色 (海馬)

SAH群においてGFAP陽性の足突起が血管周囲の基底膜から脱落している様子が認められる。

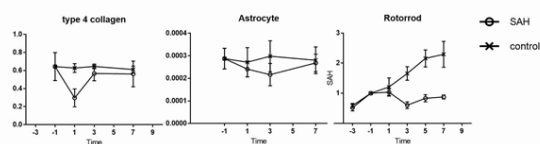


図 3. NVU 構成要素の変化とマウスの神経機能及び主幹動脈径の関係
 微小血管基底膜(type 4 collagen)は Day 1 で最も障害されるが Day 3 には回復してくる。一方アストロサイトは Day 3 で最も障害されマウスが神経機能障害を呈する時期と一致する。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 6 件)

1. Satoshi Takahashi et al., microRNA expression profiling in serum of patients with subarachnoid hemorrhage, 27th European Stroke Conference, 2018
2. 美原貫、高橋里史ら、動脈瘤破裂くも膜下出血後遅発性脳虚血に関わる体液中マイクロ RNA の同定、第 43 回日本脳卒中学会学術集会、2018
3. 高橋里史ら、くも膜下出血患者における miR-451a 発現の検討、一般社団法人日本脳神経外科学会 第 76 回学術総会、2017
4. Satoshi Takahashi et al., microRNA expression profiling of serum in patients with subarachnoid hemorrhage, 3rd European Stroke Organization Conference, 2017
5. 高橋里史ら、くも膜下出血患者における microRNA 発現プロファイルの検討、第 75 回日本脳神経外科学会総会、2016
6. 高橋里史ら、くも膜下出血患者の発症後早期における microRNA 発現プロファイルの検討、第 42 回日本脳卒中学会学術集会、2017

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 里史 (TAKAHASHI, Satoshi)
 慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・助教
 研究者番号 : 20383870

(2)研究分担者

堀口 崇 (HORIGUCHI, Takashi)
 慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・講師
 研究者番号 : 70245520

秋山 武紀 (AKIYAMA, Takenori)
 慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・講師

研究者番号 : 90327528

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

水谷 克洋 (MIZUTANI, Katsuhiro)
 柳澤 薫 (YANAGISAWA, Kaoru)
 美原 貫 (MIHARA, Kan)