

平成 30 年 6 月 10 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10542

研究課題名(和文) microRNAによる急性腎障害発症機序の解明と、早期診断バイオマーカーへの応用

研究課題名(英文) Elucidation about mechanisms of acute kidney injury by microRNA, and its application to biomarkers for early diagnosis

研究代表者

影山 京子 (Kageyama, Kyoko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号：80347468

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)：心臓血管手術患者を対象に、周術期の急性腎障害(AKI: Acute Kidney Injury)発症の早期診断バイオマーカーの探索を目的に、血液中、尿中エクソソーム中のmicroRNA(miRNA)を網羅的に解析し、AKI発症の早期検出に特異度、感度何れも優れているmiRNAを検討した。また、統計解析で有意に変化があると判明したmiRNAのターゲットとなるタンパク質を同定する事で、AKI発症の新しい機序、及びmiRNAのAKI発症における役割を探求することを主眼において研究を行った。

研究成果の概要(英文)：To elucidate about mechanisms of acute kidney injury by microRNA and its application to biomarkers for early diagnosis, we investigated the comprehensive microRNA analysis in the exosomes of plasma and urine specimen, and selected ones having more specificity and sensitivity.

Further, we investigated studies to identify the new mechanisms of acute kidney injury and the role of microRNA for its pathology by identifying proteins encoded by microRNA' target genes,

研究分野：集中治療医学、麻酔科学

キーワード：遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

従来、急性腎不全に対して Acute Renal Failure の定義が過去に多数報告され、統一した基準がなかったために、より早期段階の腎障害を含めた Acute Kidney Injury (AKI) の概念と、重症度のステージ分類である RIFLE 分類や AKIN 分類が、2004 年以降提唱され、広く認知されるようになった。非心臓手術周術期における周術期 AKI 発生率は 0.8-1.2% であるが、心臓手術後には 5-20% にも上る。また過去の文献をまとめると、集中治療を要する患者の 18.0~36.6% に AKI が発症する。周術期や、敗血症時に AKI が併発すると、他の疾患の罹患率、死亡率が上昇することは、広く知られている。従って、AKI に対し早期に予防や介入する事は、患者の予後改善につながる可能性がある。周術期には輸血、低体温、虚血再灌流障害等、種々の手術侵襲が患者の腎機能に影響を及ぼすが、体外循環を用いた心臓手術や敗血症時はその影響が顕著であることから、炎症性サイトカインによる Biotrauma も AKI の危険因子の 1 つであることは明らかである。(Nephrol Dial Transplant. 2015 ;30(2):169-77.)

AKI の診断は、通常、RIFLE や AKIN criteria の項目にある血清クレアチニン値、尿量で行われる。AKI バイオマーカーに求められるものとして以下があげられる。1. 血清クレアチニン値より早期に診断できる。2. 原因や障害部位を診断できる。3. 重症度、罹患期間を診断できる。4. 治療介入の必要性や、予後を診断できる。5. 治療効果が診断できる。近年、AKI の病態を迅速に診断出来るマーカーとして、好中球から分泌される NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin)、近位尿細管からの排泄が増加する L-FABP (liver-type fatty acid binding protein)、IL18、KIM-1 等のバイオマーカーが報告されている。しかし、複数の要因から AKI が発症するため、単一の指標よりも、感

度、特異度の高い時相時に採取し、いくつかの組み合わせの使用(パネル化)で有用性が高まる事が示唆されている。

ヒトの 30 億個の塩基配列全てを解析するヒトゲノムプロジェクトは、多数の動物でも行われ、その結果遺伝子は、マウスとほぼ同じ 3 万種類程度しかないことが分かった。ゲノムのうち、遺伝子としてタンパク質をつくるコード領域はわずか 2~3% で、大部分はタンパク質をつくらない非コード領域であった。近年、細胞内 RNA の網羅的解析が行われ、ジャンク DNA とされていた領域からも大量の RNA が生成されていることが明らかになった。このタンパク質をコードしない RNA はノンコーディング RNA (non-coding RNA: ncRNA) と呼ばれ、高等生物の複雑性の秘密を握る鍵とされている。その中でも、21 - 24 塩基程度の miRNA が、細胞増殖・アポトーシス・代謝等、深く関与することが報告されている。その機能は、従来の遺伝情報の伝達に関す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ことが知られている。

当初、miRNA は細胞内に局在し、母細胞の遺伝子発現の調節に関与していると考えられたが、最近の研究からそれは、細胞外に放出される直径約 30~100 nm 程度の超小型の膜小胞で、リソソームと同様の脂質二重層からなり、また血液・尿・羊水などの体液中に分泌され、細胞への分子輸送に関与する事が知られているエクソソームに豊富に含まれることが分かってきた(分泌型 miRNA)。(Semin Nephrol. 2014 (4):404-17. Review)

本研究では、AKI を発症しやすい心臓血管手術患者周術期や、集中治療を要する重症症例の尿中、血液中からエクソソームを抽出し、次世代シーケンサーを用いて miRNA 発現の網

羅的解析を行う。RIFLE 及び AKIN criteria を用いて、周術期の AKI の重症度をステージ分類し、急性腎障害時に変化する miRNA の発現を多変量解析により選出する。また、細胞内パスウェイ解析等を用いて細胞内情報伝達系への関与と新しい AKI の機序を探索することを主眼において、実験を行った。

2. 研究の目的

心臓血管手術患者を対象に、周術期の急性腎障害 (AKI: Acute Kidney Injury) 発症の早期診断バイオマーカーの探索を目的に、血液中、尿中エクソソーム中の microRNA(miRNA)を網羅的に解析し、AKI 発症の早期検出に特異度、感度何れも優れている miRNA を検討した。また、統計解析で有意に変化があると判明した miRNA のターゲットとなるタンパク質を同定する事で、AKI 発症の新しい機序、及び miRNA の AKI 発症における役割を探求することを主眼において研究を行った。

3. 研究の方法

- ・対象 人工心肺下心臓予定手術患者
- ・採血及び採尿
手術前、人工心肺中、離脱直後、離脱後 4 時間、8 時間、24 時間、48 時間 (最大)

a. エキソソームの分離

超遠心法、またはエキソソーム単離キット (ライフテクノロジー社)

b. miRNA の抽出 mirVana™ miRNA Isolation Kit 等を用いて抽出する。

c. 包括的 miRNA の発現プロファイリング 次に、定量性のある網羅的 miRNA プロファイリングを、従来のマイクロアレイより優れた次世代高速シーケンサー Ion PGM システム (Life Technology 社、既存) を用いて絶対的な定量法を施行。

1. Small RNA のライブラリ作成 Ion Total RNA-Seq Kit を用いてフラグメント化
2. cDNA に変換 逆転写酵素を用いる。
3. ピース調整 (4 時間) エマルジョン PCR 法を用いて、cDNA を増幅

4. シーケンシング (3 時間) シーケンサーによる miRNA 発現定量

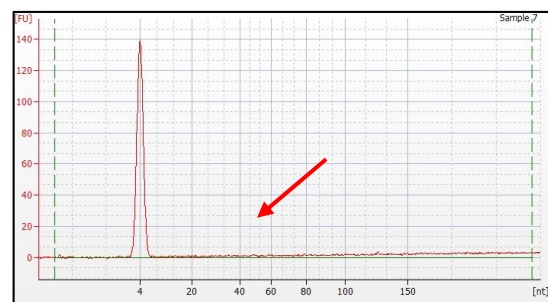
5. データ解析 (1 時間) サーバーに SFF または FASTQ 形式のデータが転送される。

発現定量解析には、CLC バイオ社の解析ソフト (Genomic Work Bench) を使用する。上記の発現定量結果から、周術期において急性腎障害時に変化した miRNA を判断分析、主成分分析により選別する。解析ソフトは、CLC バイオ社の解析ソフト (Genomic Work Bench、既存) 等を使用する。

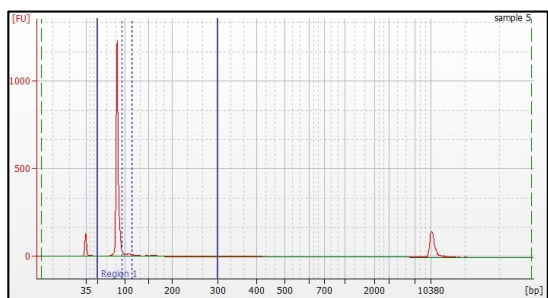
d. 特定 miRNA の検出と定量 リアルタイム PCR 法を用いた miRNA の発現定量により、シーケンサーにより得られた網羅的解析結果の、確認を行った。(TaqMan® MicroRNA Assays)

4. 研究成果

初年度はエクソソーム中から、質の高い cDNA (complementary DNA) ライブラリーを作成するのに必要な収量の miRNA 抽出にテクニカルに難渋し (図 1) それに伴う形で cDNA ライブラリー作成も不成功に終わる症例が少なくなかった。(図 2)

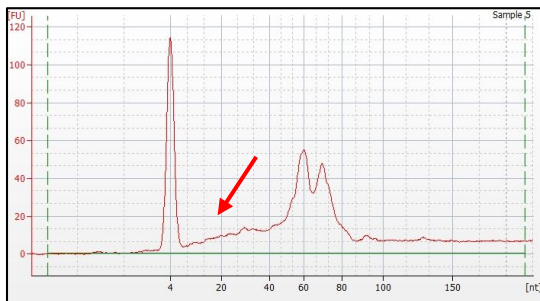


(図 1) バイオアナライザーによる miRNA 量の測定。(不十分例)
miRNA に該当する箇所にピークが認められない。

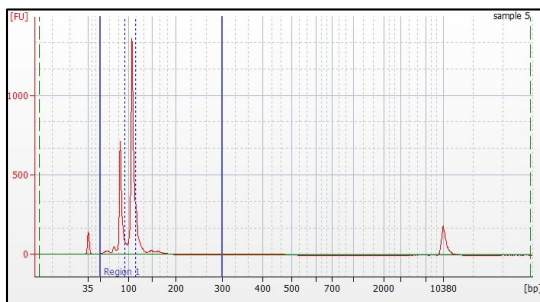


(図2)
 バイオアナライザーによる cDNA ライブラリー
 の測定。(不成功例)
 cDNA ライブラリー該当する bp(ベースペア)
 の範囲(点線内)にピークが認められない。

これらの原因をエクソソームの単離にある
 と考え、次年度では、超遠心法から単離キッ
 トに変更した。また、症例数の多いステント
 グラフト挿入術患者の含めることに加え、手
 術前および手術終了時にサンプルポイント
 を絞ることでサンプル数を増加させること
 とした。その結果、十分な miRNA 収量が得ら
 れるケースが増加し(図3)、シーケンス解
 析に十分な cDNA ライブラリーが得られるよ
 うになった。(図4)



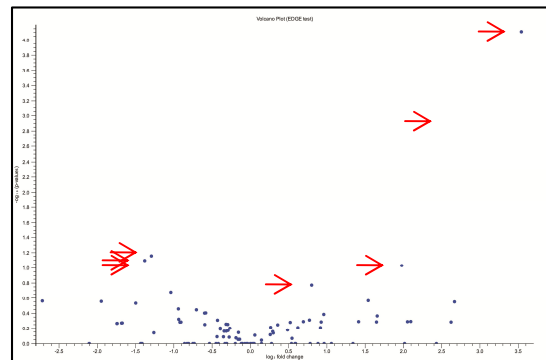
(図3)
 バイオアナライザーによる miRNA 量の測定。
 (充分例)
 miRNA に該当する箇所にピークが認められる。



(図4)
 バイオアナライザーによる cDNA ライブラリー
 の測定。(成功例)
 cDNA ライブラリー該当する bp(ベースペア)
 の範囲(点線内)にピークが認められる。

最終年度の中頃には、患者約10名の手術前
 後の cDNA ライブラリーのシーケンスが終了

し、途中経過ではあるが、いくつかの miRNA
 に有意な発現変化を認めるに至った。(図5)



(図5)手術前後における miRNA 発現変化の
 Volcano plotting
 有意な発現変化のある miRNA (赤矢印、FDR P
 値<0.05)

現在、これらの結果を確定すべく、患者15
 名に達するまで、サンプル数を増加させなが
 ら、real time PCR 法で、validation を行っ
 ているところである。

また、今後の展望として、有意差が認められ
 た miRNA について、動物ラットモデルにおい
 ても確認する予定としている。したがって、
 最終年度の後期には、ラットモデルの構築に
 も尽力した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
 は下線)

〔雑誌論文〕(計 件)
 該当なし

〔学会発表〕(計 2 件)

1, 向井 信弘、中山 力恒、影山 京子、徳
 平 夏子、佐和 貞治、中嶋 康文

次世代シーケンサーを用いた、チアノーゼ先
 天性心疾患における血球異常症の発症メカ
 ニズムに關与する赤血球中 microRNA の網羅
 的解析

第64回日本麻酔学会(2017)最優秀演題

2. 向井 信弘、中山 力恒、影山 京子、徳
 平 夏子、佐和 貞治、中嶋 康文

保存赤血球製剤中における赤血球内
 microRNA 経時変化の網羅的解析

第65回日本麻酔学会(2018)

〔図書〕(計 件)
該当なし

〔産業財産権〕
該当なし

出願状況(計 件)
該当なし

取得状況(計 件)
該当なし

〔その他〕該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

影山京子(KAGEYAMA KYOKO)
京都府立医科大学
医学(系)研究科(研究院)・客員講師
研究者番号:80347468

(2) 研究分担者

棚橋俊仁(TANAHASHI TOSHIHITO)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学
系)・学術研究員
研究者番号:30380067

徳平 夏子(TOKUHIRA NATUKO)
京都府立医科大学
医学(系)研究科(研究院)・客員講師
研究者番号:60597227

中嶋 康文(NAKAJIMA YASUFUMI)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号:70326239

中山 力恒(NAKAYAMA YOSHINOBU)
京都府立医科大学
医学(系)研究科(研究院)・助教
研究者番号:90568198

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()