

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21287

研究課題名(和文) microRNAの網羅的発現解析法を用いた血小板機能低下の機序解明と抑制法の開発

研究課題名(英文) Clarification of the mechanism of platelet hypofunction caused by extracorporeal circulation-assist devices using next-generation sequencing

研究代表者

前田 祥子 (Sachiko, Maeda)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90529512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：体外循環装置の長時間使用は血小板の活性化・機能低下を惹起し、血栓塞栓症や止血凝固障害などの合併症を引き起すことが知られている。本研究では、体外循環装置使用前後の血小板由来 microRNA(miRNA)の変化について次世代シーケンサーによる網羅的解析を行い、血小板の活性化・機能低下の機序に関わるmiRNAを同定することを目的とした。現段階で体外循環使用患者約20名からサンプルを採取し、その使用前後で低酸素誘導microRNAを中心としたいくつかのmicroRNAについて、有意な発言変化を認めている。今後はサンプルをさらに増加させながら、In Vitro系の研究に展開予定である。

研究成果の概要(英文)：Extracorporeal circulation-assist devices are known to induce platelet activation and hypofunction, and cause complications such as thromboembolism and coagulopathy. The present study was aimed to identify microRNAs in platelets associated with platelet activation and hypofunction caused by extracorporeal circulation-assist devices. We compared microRNA expression changes in platelets between pre- and post-cardiopulmonary bypass (CPB) using next-generation sequencing technology. Up to the present, we have analyzed 20 patients receiving cardiac surgeries under CPB, and identified several significant microRNA alterations (including hypoxia-inducible microRNAs) between pre- and post-CPB. Focusing on these microRNAs, we will perform in vitro studies as the next step.

研究分野：麻酔科学

キーワード：血小板 microRNA

1. 研究開始当初の背景

我々は、これまで心臓手術患者における人工心肺が患者に与える影響について、血小板にフォーカスをおいた研究を数多く行ってきた。直近の研究結果では、血小板活性化(Hyper-reactivity)に伴う血小板細胞内 p38MAPK リン酸化、Bax・Bak の発現亢進と血小板膜表面 GPIIb・PAR-1 の発現低下などの機序が人工心肺による周術期血小板機能低下と血小板減少に関連していることを報告した。

近年、microRNA (miRNA) と呼ばれる 18-25 塩基長の小さな RNA が人体の様々な組織における生命活動に関して非常に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。生命を構成するタンパク質は DNA の遺伝情報をもとに作成される。DNA は転写され RNA となり、タンパク質の設計図として機能するが、miRNA はこの過程を調整していることが知られている。

miRNA は対象となる mRNA に対して不完全な相同性をもって結合し、遺伝子の転写後発現調節に関与する。血小板に関しては、miRNA-mRNA ネットワークについて解析が進められ、性別・年齢・人種などによってそれらに差異があること、(Simon LM et al. Blood.2014 ;123(16):e37-45.) 疾患において重要な役割を担っている可能性があることが報告されている。(Leonard C Edelstein et al. Nature Medicine 19.2013 ;1609-1616) しかし、体内における詳細な作用機序や疾患との関連については依然として、不明な箇所が多い。

当時、確認されていた血小板細胞由来 miRNA

の中で、mir-326 など数種類に我々は注目した。これらの miRNA は、ガン抑制遺伝子産物である p53 と同様に、核内転写制御因子として機能しアポトーシスを誘導することが知られている p73 をはじめ、アポトーシスのプロセスに関わるタンパクの発現に参与していることが予想された。また、invitro であるが mir-96, -16, -155, -150, など複数の miRNA が血小板細胞のアポトーシスに関連している可能性が指摘されていた (Shifang Yu et al. Blood transfuse.2014 Jun 5:1-7.)。さらに、当時、我々が進めていた研究の 1 つである、若手 B「血小板内 microRNA 発現の違いが心肺補助循環時の血小板機能低下へ及ぼす影響」(前田祥子) で得られた研究データで、複数の血小板細胞由来 miRNA が人工心肺前後で有意な発現変化を認めており、周術期の血小板 microRNA 発現変化は臨床的有用性が高いことが示唆された。

2. 研究の目的

大動脈解離をはじめとする心臓血管疾患患者の救命において、人工心肺・PCPS などの体外循環装置の使用は必要不可欠である。しかし、これら装置の長時間使用は血小板の活性化・機能低下が惹起し、血栓塞栓症や止血凝固障害などの合併症を引き起こすことが知られている。本研究では、前述の研究背景に基づき、体外循環装置使用前後の血小板由来 microRNA(miRNA) の変化について網羅的解析を行い、血小板の活性化・機能低下に関わる miRNA の役割、特にアポトーシス誘発の機序を解明することを目的とした。この機序が判明すれば、体外循環装置による血小板の活性

化を防ぐ手段や、血小板輸血製剤の劣化を防ぐ手段の開発につながる可能性がある。

3. 研究の方法

次のような手順で研究を行った。

1) 同意が得られた人工心肺使用下心臓血管外科手術予定患者(約 30 名)の手術中に、人工心肺の前後のタイミングで2回採血を行い、血液サンプルを得た。先天性血小板機能障害・抗血小板作用薬剤の内服などの患者は除外した。症例の選定に関して、人工心肺時間の比較的長い手術に限定することで、血小板由来の miRNA の変化を捉えやすくなると考え、弓部大動脈置換術などを中心とした人工心肺侵襲の大きな手術に限定し患者から採血を行う方針とした。

2) 得られた血液サンプルから CD45 陽性 negative selection、もしくは白血球除去フィルターを用いて、洗浄血小板を作成した。作成した洗浄血小板サンプルの small RNA 分画を市販の RNeasy MinElute kit、RNeasy Plus Mini (Qiagen 社)などを用いて分離・濃縮した。

3) 抽出した small RNA 分画を Ion Total RNA-seq kit v2 (Life Technology 社)のプロトコールに準じて、-80 で長期間安定保存が可能な cDNA へ変換・増幅し、ライブラリーを作成した。また、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technology 社)の small RNA assay、DNA high sensitivity assay を適宜使用し、検体の質、ライブラリー化に使用する量および、ライブラリー化成功の可

否について検定した。

4) 作成したライブラリー試料を Ion OneTouch2、Ion OneTouch ES (Life Technology 社)を用いて、テンプレート調整・エマルジョン PCR を行った。Ion 318 Chip (Life Technology 社)に適切にローディング後、Ion PGM system (Life Technology 社)を使用してシーケンシングを行った。(実験開始当初は Ion OneTouch2、Ion OneTouch ES を使用していたが、いずれも実験過程が煩雑であり、手技的难度も高いことから、途中より Ion Chef system (Life Technology 社)を導入した)

5) 得られたシーケンス結果を annotation などの情報を付加して、同一患者の人工心肺前後の検体を1セットとして empirical DGE 法を用いた統計処理を行った。その際、CLC Genomics Workbench を統計ソフトウェアとして使用した。続いて、人工心肺前後で有意差を認められた miRNA に対して、ターゲットと考えられる mRNA を target gene prediction で絞り込んだ。

4. 研究成果

以下のような理由で実験は当初予定したスピードを大幅に下回った。

弓部大動脈置換術の件数が本院において減少傾向にあり、予定数よりも大幅に少なくなった。

人工心肺後の血小板低下が激しい症例では、規定採血量では血小板数が不足するため、ドロップアウト症例が多かった。

人工心肺後血小板から作成したライブラ

リーには、microparticle などの微小な分子の影響と考えられる primer dimer が多数形成され、人工心肺後検体のシーケンス結果がふるわないケースが多かった。

しかし、昨年導入した Ion chef により、研究の遅れを挽回しつつあり、約 20 名についてシーケンス結果を得ることに成功している。現在、統計解析中を進めており、有意差がでた miRNA の具体的な種類については今後論文にて公表予定としているため明記は避けるが、低酸素誘導 miRNA などを中心とした miRNA に有意差は発現変化を認めている。

今後の展望としては、サンプル数を引き続き確保しながら、invitro 系の実験を展開する予定にしている。

具体的には、In Vivo 系で絞り込んだ血小板細胞アポトーシス・活性化に関連する可能性の高い miRNA について mimic (Pre-miRTM miRNA Precursor Molecules, Ambion 社) と、その miRNA に特異的な miRNA 阻害薬 (Anti-miRTM miRNA Inhibitor, Ambion 社) を用いて細胞内における発現量について遺伝子レベルで介入を行い、Target gene prediction で変化することが予想された mRNA とタンパク質の量の変化について確認を行う。遺伝子導入方法は、Nucleofection 法 (従来の Electroporation 法を改良した手法) を用いる。ターゲットとなる特定の関連タンパク質の発現量が、mimic を遺伝子導入することで発現抑制され、miRNA 阻害薬を遺伝子導入すると発現が増強することをウェスタンブロットで確認できれば、In Vivo 系で得た結果の Validation となると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕該当なし

〔学会発表〕該当なし

〔図書〕該当なし

〔産業財産権〕該当なし

〔その他〕該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 祥子 (Sachiko Maeda)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90529512