

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19422

研究課題名(和文) 血小板のmicroRNAを介した循環系の恒常性維持ネットワークの解析

研究課題名(英文) Homeostatic maintenance system of circulation via platelet micro RNA.

研究代表者

坂田 飛鳥 (Sakata, Asuka)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：90528457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では血小板に含まれる小さなRNAの役割を確認した。研究によりヒト血小板内の小さなRNAが血小板老化や活性化で減少することがわかった。さらにRNA量で血小板の能力が推測できるようになった。マウスでも同様の観察が可能で、血管傷害を作ったマウス血液中にはRNAが減少した血小板が増加していた。データベース解析では血小板活性化で減少するRNAが血栓の形成や炎症などに関わっている可能性があった。このRNAの利用で血栓の出来やすさや炎症反応を調整する新しい治療法が開発できる可能性がある。さらに、血小板RNAの定量で輸血用血小板製剤の評価や血栓症の予知ができると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the role of micro RNA within platelets. Micro RNA within platelets decreased upon platelet aging and platelet activation. The quantity of RNA within platelets correlated with activation ability of the platelets. These results were observed both experiments using human platelets and experiments using mouse platelets. RNA poor platelets were increased inside the mouse having endothelial injury. From the database analysis, there is a possibility that the micro RNA decreasing by platelet activation affect the thrombus formation and inflammatory response.

Utilizing this micro RNA, we may able to establish a new therapeutic strategy that can control thrombotic reaction and inflammatory response. Quality check of transfusion platelets and risk assessment of thrombosis of individual patient becomes possible by quantifying RNA within platelets.

研究分野：血栓止血

キーワード：血小板 microRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 血管損傷後には、閉鎖循環系の恒常性を維持するため、血小板と白血球・血管内皮・巨核球は情報伝達を行い、血栓形成や炎症惹起、消費された血小板の補充を行っていると考えられる。しかしながらその情報伝達の実態は不明だった。

(2) 血小板内のメッセンジャーRNA, リボソームRNAは血小板産生後ほぼ1日で消失する^①。しかしながら、申請者が開発したアクリジンオレンジによる血小板RNA特異的染色法では産生後3日以上経過した血小板においてもRNAの存在が示唆された。

2. 研究の目的

血小板が行う情報伝達機構として血小板産生後長期に残るRNA, 特にマイクロRNAを介する情報伝達を仮定し、申請者が開発したアクリジンオレンジによるRNA特異的染色法でその存在を明らかにする。さらにマイクロRNAを用いた治療法の実現可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) アクリジンオレンジ染色で血小板内RNAを顕微鏡で可視化する。

(2) アクリジンオレンジ染色で血小板から放出されるRNAを顕微鏡で可視化する。

(3) フローサイトメーター解析時の血小板アクリジンオレンジ染色条件を決定する。血小板活性化および血小板老化によるRNAシグナル変化を検出する。

(4) 血小板保存条件によるRNA減弱程度をフローサイトメーターで評価する。

(5) 血小板から放出されるRNAをフローサイトメーターで検出する。

(6) 血小板活性化上清に含まれるRNAを蛍光プレートリーダーで検出する。

(7) マウス血小板を顕微鏡観察およびフローサイトメーター観察の際のアクリジンオレンジ染色条件を最適化する。

(8) マウス血管内皮傷害モデルでの血小板活性化の顕微鏡下観察法を構築する。

(9) マウス血管内皮傷害モデルで流血中血小板からRNAが減少するかフローサイトメーターで確認する。

(10) マウス血管内皮傷害モデルで血小板からの放出されるRNAを可視化する。

(11) 放出されたRNAをマウス血小板上清から回収する。

(12) 活性化後の血小板からRNAを回収し、次世代シーケンスで配列を決定する。

(13) データベース解析でmicroRNAの標的を推測する。

4. 研究成果

(1) アクリジンオレンジによる血小板RNA染色法は図1.に示すよう、血小板をチアゾール

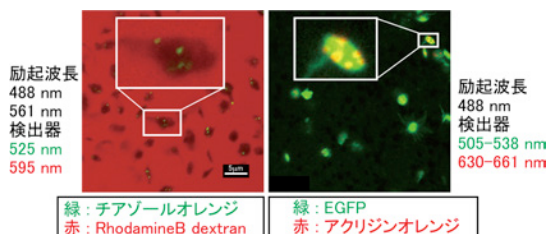


図1.アクリジンオレンジ染色血小板の顕微鏡観察所見

オレンジで染色した際と同部位の染色が出来た。また、RNAと結合時に蛍光波長が変わるという特性で、RNA特異的な染色が出来た(図1.のチアゾールオレンジ染色は細胞質の脱色を行っているが、通常は細胞質も緑色に染まってしまう)。血小板中のRNAは血小板毎に異なっており、RNAの量という観点では血小板が様々な集団からなるということが分かった。

(2) 血小板から放出されるRNAは顕微鏡(in vitro)では観察出来なかった。

(3) アクリジンオレンジ染色した血小板をフローサイトメーターで解析すると、顕微鏡観察と同様、RNA量が均一で無いことが確認できた(図2.右,赤)。

さらに血小板活性化後にRNA量が減少することが分かった。

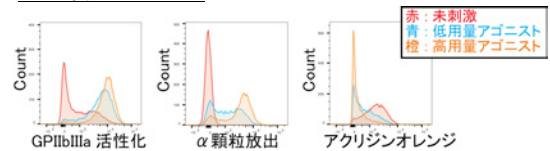


図2. 血小板活性化によるRNA量の変化

血小板活性化マーカーとともにRNA量を観察すると未刺激(赤)と比較して活性化の強さに応じて(青→橙)とRNA量が減少していることが分かった。

採血後時間を追ってRNA量を評価すると図3.で示すよう血小板老化とともに血小板内RNA量が減少することが分かった。

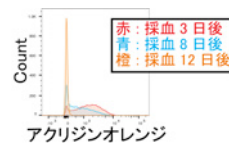


図3. 血小板老化によるRNA量の変化

採血後時間経過を追ってRNA量を評価すると、血小板老化(赤→橙)とともにRNAが減少することが分かった。

残存RNA量と血小板活性化能を評価すると、図4.のように、RNAを多く含む血小板ほど血小板活性化能が高いことが分かった。本検討は本来RNA量ごとにソーティングを行った血小板で行うべきであるが、血小板がソーティング圧により活性化してしまうことが分かったため、少量のアゴニストを加えた際の血小板を用いて解析した(多量のアゴニストを加えた場合は活性化後のRNA減少が著しいため検討に採用しなかった)。この結果は同じ日の検体のRNA多寡でも、日にちが経過して老化によってRNAが減少した血小板検体でも確認することが出来た。

本結果は当初想定していなかったものだが、抗体やアゴニストを用いない簡便な血小板活性化能評価手法として利用が期待できる。

例えば輸血用血小板製剤の均質化や使用期限の延長などに貢献できる可能性がある。

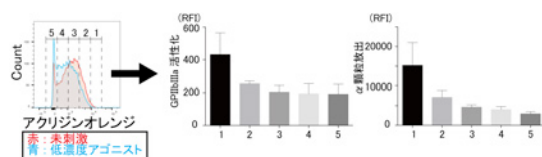


図 4. 残存 RNA 量と血小板活性化能
血小板内 RNA 量で 5 群に集団をわけ、それぞれ低用量アゴニスト刺激時の血小板活性化マーカーを確認すると RNA 量が多い血小板ほど強い活性化能を示すことが分かった。

RNA を失った老化血小板は図 5. のように強いアゴニスト刺激でも膜糖タンパク活性化を認めなかった。α 顆粒が放出されたかを確認すると、未刺激時から軽度の上昇を認めた。一方、アゴニスト刺激に対しての変化は認めなかった。α 顆粒放出は CD62P で確認している。この蛋白は血小板と白血球との接着を媒介する蛋白であるため、こういった老化血小板が体内での炎症に関わる可能性がある。

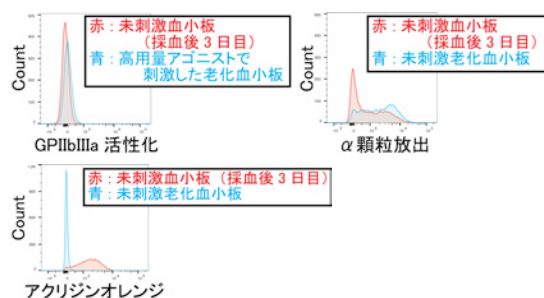


図 5. 老化血小板の活性化能
老化し RNA を失った血小板 (青) は活性化能を失っていることが分かった。一方白血球との接着に利用される蛋白の発現は亢進していた。

(4) 血小板保存中の血漿濃度を変更すると血漿濃度が低下するにつれ、血小板の RNA 減少が進行することが分かった (図 6.)。血漿濃度 100% と 50% に関しては採血後 5 日目までは差違を認めなかった。このことから血小板は血漿中の何らかの物質を機能維持に使用していることが推測された。

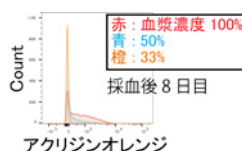


図 6. 血漿濃度変化による RNA 減少加速
血小板保存液中の血漿濃度を減少させると血小板中の RNA 減少が亢進した。

(5) 血小板から放出される RNA のフローサイトメーターでの検出を試みた。RNA や micro particle のような小さな物質・構造はフロー

サイトメーターの検出限界以下であるため、通常的手法では検出できない。このため RNA をあらかじめアクリジンオレンジで染色し、蛍光シグナルを検出することで確認することとした。しかしながら、そのシグナルの強さの問題か、再現性のあるデータを取得することは出来なかった。一方、条件検討のデータは血小板染色の臨床応用に重要と考えられた。血漿の RNA 染色ではシグナルが確認できており、ある一定以上の RNA を血液中から検出するには有用と考えられた。

(6) 続いて血小板から放出される RNA を蛍光プレートリーダーで検出出来ないか検討を行ったが、残念ながら検出には至らなかった。

(7) 病態モデルでの確認にはマウス血小板での評価が不可欠であったため、マウス血小板のアクリジンオレンジ染色条件の検討を行った。血小板サイズ変化によるものか至適染色条件はヒト血小板と異なっていたが、血小板内 RNA の可視化・フローサイトメーターでの血小板検討に成功した。マウス血小板においても活性化後に RNA が減少していた。

(8) マウス体内で血小板が活性化しているか否か確認する手法を構築した。従来の顕微鏡観察は形態観察の手法が中心であり、血小板の活性化状態は血小板の偽足形成などで判断するしか無かった。この検討では血小板表面マーカーを顕微鏡で観察することで血小板活性化を in vivo で観察することに成功した。トロンビン静脈注射で血小板を活性化させると血中に顆粒放出後の血小板が循環する様子が確認された。一方レーザーによる血管内皮傷害部位では必ずしも全ての血小板が強い活性化状態とはならないことが明らかとなった。強い活性化状態とならなかった血小板は再度血流によって循環する様子が確認され、こういった血小板を流血中から検出できれば、血栓症が起るような病態の診断に有用と考えられた。

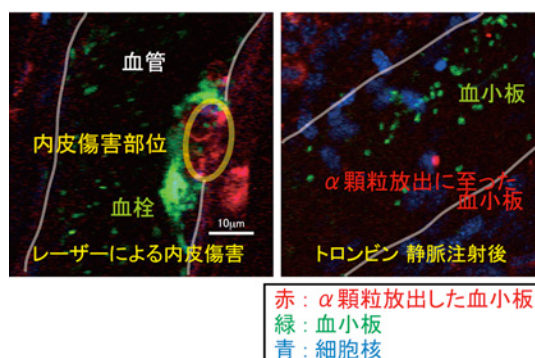


図 7. 成体マウス体内での活性化血小板の検出
活性化血小板のマーカーを使用してマウス体内で血小板が活性化しているかどうかを形態だけでなく、蛋白発現でも確認出来るようにした。血管内皮傷害部位では多くの血小板が強い活性化に至らず、流血中に戻った。

(9) マウス血管内皮傷害部位で血小板からの RNA 放出を顕微鏡で可視化できるか検討した (in vivo)。しかしながら、観察は出来な

かった。(8)で示したよう、強い活性化に至る血小板が少ないことが一因と思われた。

(10) レーザー照射で血管内皮傷害を形成したマウスの血液中からRNAが減少した血小板を検出できるか検討した。マウス精巣静脈血管内皮をレーザー照射で傷害後、採血した検体をフローサイトメーターで確認すると図8.に示すようRNA豊富な新生血小板とともにRNAの減少した血小板が増加していた。血小板が活性化している所見は無くアクリジンオレンジ染色でのみ検出が出来た。ヒト臨床への応用で体内に血管内皮傷害をもつような患者すなわち血栓症高リスク患者の検出が出来るようになると考えられた。

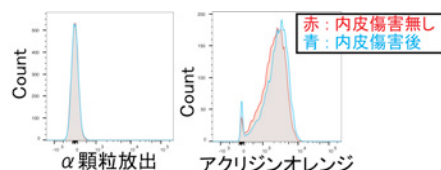


図8. 血管内皮傷害後血中からの乏RNA血小板増加検出レーザーで血管内皮を傷害したマウスの採血検体(青)ではRNA豊富な新生血小板比率の増加とともにRNAが減少した血小板比率が増加していた。血小板活性化の所見は認めず、本手法でのみ検出が可能と考えられた。

(11) マウス血小板の活性化上清からRNAの回収を試みたが、回収出来なかった。そこでヒト血小板活性化上清の回収を行った。

(12) 血小板に残存するRNAを活性化前後で比較することでRNAを同定出来ないか検討した。マウス血小板からRNAは回収できたもののごく微量であり、シーケンスなどの解析に用いるためには多数のマウス犠牲が必要であることが分かった。そこでヒト血小板から回収を行い、十分量のRNA抽出に成功した。血小板から回収出来たRNA量を考慮すると血小板上清からRNAを回収することは困難と考えられたため、血小板上清の検討は中止した。回収されたRNAを確認すると大きなRNAが殆ど消失しておりmicroRNAがその大半を占めていた(収量のばらつきが大きいがおおよそ5-10倍microRNAが多かった)。次世代シーケンスによる解析は採血後3日目の血小板、6日目の血小板、活性化後の血小板の3群に対し行った。興味深いことに血小板老化と活性化で失われるRNAは異なっていた。老化前後でRNAの発現比率が変化しなかった(全てのRNAが均等に減少した)のに対し、活性化後には特定のRNAが減少していることが分かった。

(13) microRNAのデータベース解析では活性化により減少するRNAが血小板活性化や内皮リモデリング、好中球遊走に影響を与える可能性が示唆された。このRNAの利用で血栓の出来やすさや炎症反応を可逆的に調整する新たな治療法が開発できる可能性がある。

本研究では当初同定したmicroRNAをマウスに導入して生体で治療の有効性を探る予定

であったが、マウス血小板からのRNA回収が困難であったこと、microRNA配列が影響を及ぼす可能性のある遺伝子がターゲットをヒトとした場合とマウスとした場合で異なっていたことから、現在ヒト培養細胞系およびiPS細胞由来巨核球を用いて検討を開始している。

<引用文献>

① Catherine Angenieux, Henri de la Salle, Time-Dependent Decay of mRNA and Ribosomal RNA during Platelet Aging and Its Correlation with Translation Activity, 11, 2016, epub

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 0件)

[学会発表] (計 3件)

- ① 坂田 飛鳥, 西村 智, 血小板活性化歴と活性化能を評価しうる検査法の開発, 第18回日本検査血液学会, 2017
- ② 坂田 飛鳥, 西村 智, 血小板染色による心血管疾患高リスク患者弁別法の開発, 第79回日本血液学会学術集会, 2017
- ③ 坂田 飛鳥, 西村 智, The thrombosis risk assessment by detecting aged platelets, 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 2017

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂田 飛鳥 (SAKATA, Asuka)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号: 90528457

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し

(4) 研究協力者

該当無し