

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21413

研究課題名(和文) microRNAを用いた急性肝機能障害特異的診断マーカーの検討

研究課題名(英文) The investigation of specific maker for acute liver dysfunction by microRNA

研究代表者

石川 真士 (Ishikawa, Masashi)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：30714745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓虚血再灌流障害により発現変化するmicroRNAの探索、肝臓障害の経時的変化に相関するmicroRNAの同定、病理学的評価と相関する診断精度の高いmicroRNAの同定を目標としていた。平成28年度中はモデルの作成から、を目的に研究を進めた。虚血再灌流障害の重症度が安定せず、候補となるmicroRNAの同定に苦慮した。平成29年度では、肝臓虚血再灌流障害のマーカー候補となったmicroRNAに関して、経時的変化、病理学的障害との相関について検討を進めた。しかし、今回候補として挙げたmicroRNAはいずれも良好な相関を示さず、診断に有用なマーカーを定めるには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Throughout the research period, we aim to identify (1) specific microRNA expression changes of hepatic ischemia reperfusion injury, (2) microRNA expression changes correlated with time-dependent change, (3) microRNA expression changes correlated with pathological disorder. During the first year, we made the research model and proceeded (1). It was difficult to identify candidate microRNA because the severity of ischemic-reperfusion injury was not stabilized. In the following year, we researched the correlations with time-dependent changes and pathological disorders with regard to the candidate microRNAs. However, none of the candidate microRNAs showed a good correlation, and it was not possible to determine markers useful for diagnosis.

研究分野：麻酔科学

キーワード：麻酔 microRNA 虚血再灌流障害 肝臓

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで麻酔薬による肝臓・肺での microRNA 発現変化について明らかにしてきた (Ishikawa M et al. Anesthesiology. 2012) (Tanaka S, Ishikawa M et al. Biomedical Research. 2012)。microRNA はタンパク質をコードしない 22 塩基程度の一本鎖 RNA で、標的 mRNA に部分相補的に結合し、分解または翻訳を抑制することによりタンパク質の発現を抑制することが知られている。その作用は発生、分化、増殖、免疫、細胞死、恒常性と生命現象の多岐に關与している。

また、敗血症モデルにおけるセボフルランの肺保護作用 (Otsuki T, Ishikawa M et al. Biomed Rep. 2015)、肝臓虚血再灌流障害に対する一過性虚血刺激、セボフルランの肝臓保護作用 (Morita T, Ishikawa M et al. PLoS One) に microRNA が關与していること、その経路について報告した。

microRNA の研究テーマはその作用にとどまらない。多くの microRNA が様々な組織に分布しているが、いくつかの microRNA は組織・疾患特異性が高く、その臓器障害・疾患のマーカーとして期待されている。心筋虚血再灌流障害においては、microRNA-208a が障害 3 時間後より血漿中で増加し、診断のバイオマーカーとなることが報告されている。

麻酔科・集中治療領域では手術侵襲、出血性ショック、敗血症性ショック、心不全など炎症、虚血を契機とした急性肝機能障害を多くの症例で認める。現在、その血中マーカーとしてアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST)、乳酸脱水素酵素 (LDH) が用いられている。しかし、いずれも肝臓に特異的ではなく、その診断に苦慮することが多い。また、急性肝障害では心筋、腎臓など他の臓器障害も合併するため、既存のマーカーでは早期かつ特異的な肝細胞障害の診断、評価は困難である。適切な診断、加療のためには、急性肝障害の特異的な診断マーカーの開発は重要なテーマとなっている。

2. 研究の目的

麻酔科・集中治療領域では炎症、虚血を契機とした急性肝機能障害を多くの症例で認める。しかし、既存の血中マーカーは肝臓に特異的なものでないため、早期かつ特異的な肝細胞障害の診断、評価は困難である。microRNA は癌、心筋障害や腎臓障害における特異的な血中マーカーになることが報告されている。本研究ではラット肝臓虚血再灌流障害モデ

ルを用い、急性肝細胞障害の特異的な血中マーカーとなる microRNA を明らかにすることを目的とする。さらに、経時的変化を測定することで既存マーカーに比べ早期診断が可能となりうるかを検討する。

研究期間を通じて、

肝臓虚血再灌流障害により発現変化する microRNA を明らかにし、早期診断に有用なマーカーの候補を挙げる。

肝臓障害の経時的変化に關する microRNA を検討する。既存のマーカーとの相関性を用いて経時的変化の検討を行う。

病理学的評価と關する診断精度の高い microRNA を探索する。より肝臓虚血再灌流障害の診断マーカーとなる microRNA の候補を選定する。その候補 microRNA に関して、病理学的な障害度との相関性を検討し、より診断精度の高いマーカーを明らかにする。

以上の 3 点を検討し、肝臓虚血再灌流障害の診断マーカーとなる microRNA を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究ではラットで報告されている数百種の microRNA を対象としており、より効率的で定量性に優れた測定方法の採用が必須である。そのため、Applied Biosystems 社 7900HT Fast リアルタイム PCR システムを用いた TaqMan® Rodent MicroRNA Array Card A/B version.3 による網羅解析を施行する。TaqMan® Rodent MicroRNA Array Card A/B version.3 は 384-Well フォーマットのアレイ型アッセイでげっ歯類 750 種の microRNA を同時に測定することが可能であり、かつ、qRT-PCR 法を原理とするため定量性にも優れる。

肝臓虚血再灌流障害により発現変化する microRNA の探索

ラット肝臓虚血再灌流障害モデルを用いる。再灌流終了後に下大静脈より採血をし、血漿サンプルを得る。これより total RNA を抽出し、TaqMan® Rodent MicroRNA Array Card A/B version.3 にて網羅的に解析する。

経時的変化に關する変化を認める microRNA の同定

肝障害時に発現していた microRNA が細胞内から分泌されて血中に増加する (分泌型 microRNA)。そのため、肝障害と特異的なマーカーとなる microRNA の変化は關する。

にて候補となった microRNA の経時的変化

を障害後 72 時間まで 6 時間ごとに rt-PCR にて測定する。これと病理学的な障害度、既存のマーカー推移 (AST/ALT) を比較し、相関するもの明らかにする。

病理学的評価との相関性の検討
特異的 microRNA 発現変化の推移と、病理的障害度が最も相関している microRNA を同定する。

4. 研究成果

研究期間を通して、肝臓虚血再灌流障害により発現変化する microRNA の探索、肝臓障害の経時的変化に相関する microRNA の同定、病理学的評価と相関する診断精度の高い microRNA の同定を目標としていた。

肝臓虚血再灌流障害モデルを作成、従来のマーカーを用い障害度を評価。モデルの確立を得た。



虚血再灌流：虚血 1 時間+再灌流 3 時間

肝臓虚血再灌流障害の重症度マーカーとして肝臓特異的 microRNA である miR-122、miR-192 が候補となった。

肝臓虚血再灌流障害の重症度マーカー候補となった microRNA に関して、経時的変化、病理学的障害度との相関を検討した。しかし、いずれも経時的変化、病理学的障害と良好な相関を示さず、診断に有用なマーカーを定めるには至らなかった。

肝臓虚血再灌流障害の重症度マーカーを定めるのにいたらなかった原因として、他の早期障害合併の可能性が考えられる。臓虚血再灌流障害モデルにおいて、目的臓器障害以外にも心筋や腎臓などの他臓器の障害を合併することは多い。他臓器の障害が、肝臓障害の重症度や microRNA 発現変化に影響を与えた可能性がある。この点について再度検討し、研究を続ける必要がある。

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 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 真士 (ISHIKAWA, Masashi)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号：30714745

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()