

令和 2 年 4 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16457

研究課題名(和文)人工心肺使用開心術における血小板機能不全に関する遺伝子発現調節メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the regulation mechanism of gene expression related to platelet dysfunction in cardiac surgery with cardiopulmonary bypass

研究代表者

石井 祥代(Ishii, Sachiyo)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40457958

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):人工心肺を使用する心臓血管外科手術では、血小板の働きが人工心肺離脱後に一時的に低下し、術後出血の1つの原因となることが明らかとなっている。しかし、その分子生物学的なメカニズムは、未だ不明な部分が多い。本研究では、microRNAという小さなRNAが人工心肺離脱後の血小板機能不全に関連しているという仮説を元に研究を行った。その結果、人工心肺離脱後ではいくつかの血小板内microRNAの発現が上昇し、止血に関連する血小板膜タンパクの発現低下を引き起こしている可能性が高いことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工心肺離脱後の血小板機能低下の分子生物学的なメカニズムがmicroRNAレベルで引き起こされている可能性を示唆したことが本研究の学術的意義であると考えられる。また、本研究の社会的意義として、それらのmicroRNAをターゲットにした治療法に展開できる可能性を有していることが挙げられる。

研究成果の概要(英文): In cardiovascular surgeries undergoing with cardiopulmonary bypass (CPB), it has been shown that platelet activity is temporarily reduced after weaning from CPB, which is one cause of postoperative bleeding. However, the molecular biological mechanisms are still largely unknown. In this study, we conducted research based on the hypothesis that small RNA called microRNA is associated with platelet dysfunction after CPB.

As a result, it was suggested that the expression of some microRNAs in platelets after CPB up-regulated and this may cause the down-regulation of the expression of platelet membrane proteins related to hemostasis.

研究分野：血小板

キーワード：血小板 microRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

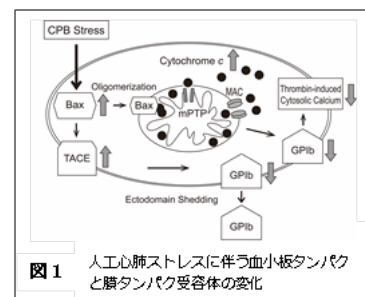
1. 研究開始当初の背景

人工心肺と血小板機能

人工心肺をはじめとする体外循環補助装置は心臓血管外科手術や一部の肺手術において必要不可欠なものであるが、様々な凝固障害を引き起すことが広く知られている。血小板に関しては、量的異常だけでなく、質的異常が生じることが報告されている。量的異常として、血液希釈や、回路への血小板吸着による血小板数減少が代表的なものとして挙げられる。^{1,2} 一方、質的異常として、血小板アゴニストへの反応性低下による血小板凝集抑制が良く知られ、^{3,4} point of care device によって計測された血小板凝集能低下（機能不全）が、心臓血管外科手術の術後出血に関連することも示されている。⁵ 人工心肺による血小板機能不全のメカニズムは分子生物学的レベルで研究されており、アポトーシスシグナルパスウェイに関わる血小板内タンパクの発現変化が、その機能低下の一因であることが我々の研究（図1）を含む、これまでの研究から明らかにされている。^{6,7} しかし、そのメカニズムは未だ解明されていない部分が多い。

血小板と MicroRNA

近年、遺伝子のノンコーディング領域から転写される 18-25 塩基程度の小分子 RNA (micro RNA, 以後 miRNA) が転写後の負の遺伝子発現調節を担い、20%程度の発現変化でも疾患に進展することが報告されている。⁸ 成熟血小板や赤血球などの無核細胞に関しては、これまで遺伝的情報を持たないと考えられてきたが、近年、細胞内に miRNA を含む様々な RNA が存在していることが明らかとなった。^{9,10} 特に血小板に関しては、脱核後も mRNA をタンパクへと翻訳する機能軸が存在することが判明し、それらの発現変化が clot reactivity や炎症に関連することが示唆されている。^{11,12} したがって、血小板内の miRNA 変化は、血小板 mRNA およびタンパク発現の変化を引き起し、それらの病態に影響を及ぼしていると考えられている。



2. 研究の目的

- 1) 心臓外科手術時に最も広く行われている軽度-中等度低体温人工心肺前後において、血小板中miRNAの発現変化を次世代シーケンサーによって解析し、有意差を認めるmiRNAの中から、血小板機能不全に関連することが既知である血小板中miRNAを同定する。
- 2) 1)において同定されたmiRNAおよびbindingするmRNAの発現変化を定量的RCR法で、また、翻訳された蛋白の発現変化をウェスタンブロッティング法にて確認する。
- 3) 2)と同時に血小板凝集能・放出能などの血小板機能検査を行い、mRNAおよび蛋白発現変化が実際にclot reactivityを引き起していることを確認する。

3. 研究の方法

本研究に際し、本学倫理委員会を承認を得た。20歳以上の人工心肺使用下に心臓外科手術を受ける予定手術患者を対象とした。術前に染色体異常、凝固異常、または炎症性疾患を認めた患者は除外した。また、抗血小板薬を投与されている患者も除外した。

Sample preparation

人工心肺前（麻酔導入安定後）および人工離脱後（プロタミン投与直後）の全血を4.0%クエン酸含有15 mL Falcon チューブに無菌で採取した。その後、洗浄血小板懸濁液を作成した。

High-throughput sequencing

洗浄血小板懸濁液から、small RNA 分画を抽出した。抽出した分画から complementary DNA

(cDNA) ライブラリを作成した。cDNA ライブラリを High-throughput sequencer (Ion PGM system (Thermo Fisher Scientific)) を用いて網羅的に解析した。raw reads はアダプター配列を除去した後に、human genome 19 genome reference consortium human build 37 にアノテーションした。miRNA database は miRBase 21 (<http://www.mirbase.org/>)を参照した。

Quantitative Polymerase Chain Reaction

洗浄血小板懸濁液から、total RNA 分画を抽出した。抽出した分画から cDNA ライブラリを作成し、Step One Plus (Thermo Fisher Scientific) で計測した。mRNA の内在性コントロールには Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) , miRNA に関しては 5'-UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA-3'を spike-in control として使用した。

Western blotting

洗浄血小板懸濁液からタンパクを抽出後、濃度を調整後 4-12%プレキャストゲルを使用したポリアクリルアミド電気泳動を行った。その後、ニフツ化ポリビニリデン膜に転写し、各抗体にて処理後、化学発光を撮影した。

ATP secretion

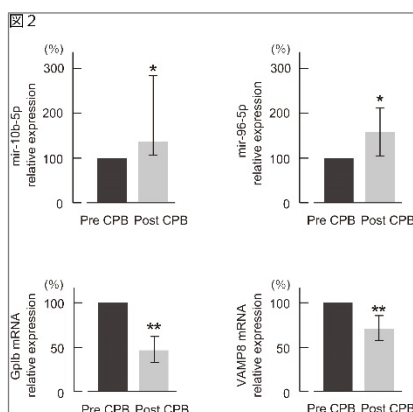
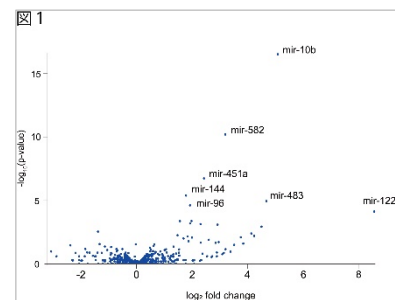
ATP 分泌は Kinsiro ATP Luminescence Kit (Toyo B-net)を用いて Lumat LB 9507 tube luminometer (Berthold Technologies GmbH & Co., KG)で計測した。血小板混濁液は $5.0 \times 10^4/\mu\text{L}$ に調整し、最終濃度 0.5 and 0.1 U/mL のトロンビン最終濃度 5 and $2 \mu\text{g/mL}$ コラーゲンを刺激物質とした。

Statistical analysis

miRNA の発現解析には、CLC Genomic Workbench Version 8.5.1 (Qiagen)を用い、FDR-*P*値 <0.05 を統計学的有意とした。その他の統計学的検定には *P*値 <0.05 を統計学的有意とした。

4. 研究成果

始めに、軽度-中等度低体温人工心肺使用下に心臓血管手術を受ける患者 10 名の麻酔導入直後および人工心肺離脱直後の miRNA の発現変化を同定した。次の 7 つの miRNA が統計学的有意差を認めた。(mir-10b: log2 fold change 5.09, FDR-*p* <0.001; mir-582: 3.20, <0.001; mir-451a: 2.43, <0.001; mir-144: 1.78, 0.0014; mir-483: 4.68, 0.003; mir-96: 1.93, 0.006; mir-122:8.56, 0.015.) Volcano plotting を図 1 に示す。

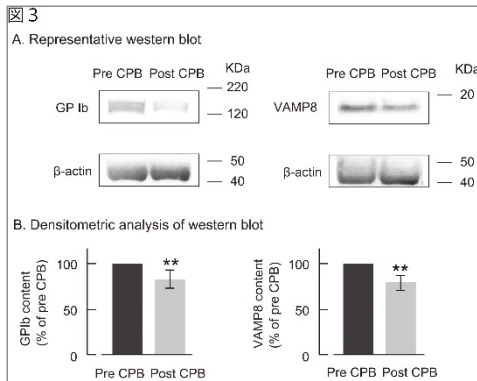


変化を認めた 7 つの miRNA のうち、mir-10b は glycoprotein 1b (GP1b) の発現¹³を、mir-96 vesicle-associated membrane protein (VAMP) 8 を制御^{14,15}し、血小板の reactivity に関連することが示されたため、我々は、この 2 つの miRNA およびその miRNA-mRNA-protein axis に focus することとした。

患者 15 名の麻酔導入直後および人工心肺離脱直後から検体を採取し、mir-10b および mir-96, GP1b mRNA および VAMP8 mRNA, GP1b および VAMP8, ATP 分泌について調査した。その結果、人工心肺後において、mir-10b-5p および mir-96-5p の上昇、GP1b mRNA および VAMP mRNA の減少を認めた。(図 2 ; mir-10b-5p: relative expression (95% CI) 1.35

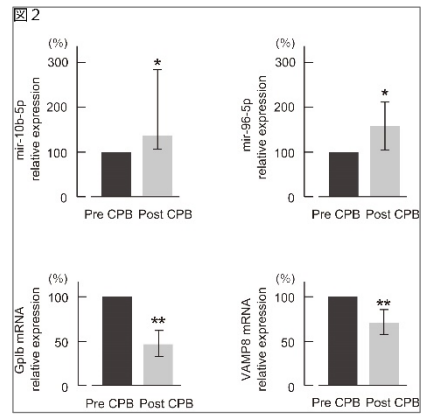
(1.05–2.85), $p = 0.01$; mir-96-5p: 1.59 (1.06–2.13), 0.03; GP1b mRNA: 0.46 (0.32–0.60), <0.001 ; VAMP8 mRNA: 0.70 (0.56–0.84), <0.001 .) mir-10b-3p および mir-96-3p は検出できなかった。

ウェスタンブロットの結果を図3に示す。GP1b および VAMP8 は人工心肺後に低下した: GP1b: relative expression (95% CI) 82.6% (71.3–93.8%), $p = 0.005$; VAMP8: 79.0% (70.7–82.3%), <0.001 。



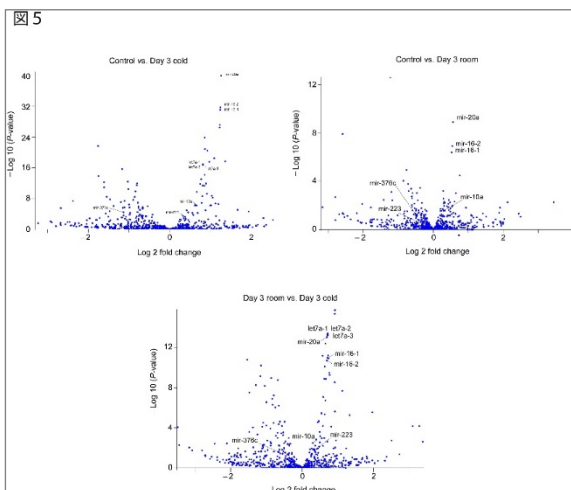
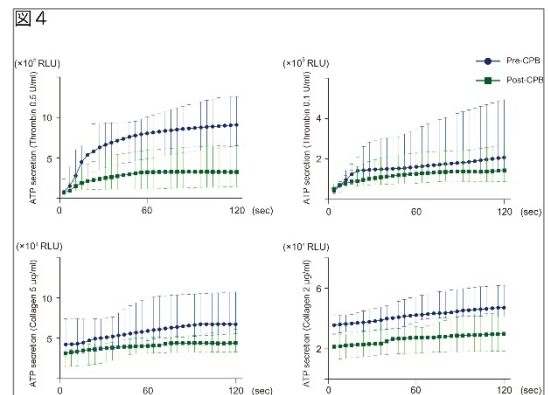
ATP 分泌も人

工心肺後に低下した。(図4; relative light unit (95% CI): thrombin 0.5 U/mL: $2.17 (1.39-2.93) \times 10^7$ vs. $0.84 (0.33-1.56) \times 10^7$, $p=0.002$; thrombin 0.1 U/mL: $0.46 (0.38-0.98) \times 10^7$ vs. $0.30 (0.19-0.52) \times 10^7$, $=0.002$; collagen 5 μ g/mL: $1.77 (1.33-2.66) \times 10^6$ vs. $1.25 (0.97-1.51) \times 10^6$, <0.001 ; collagen 2 μ g/mL: $1.26 (1.01-1.57) \times 10^6$ vs. $0.81 (0.50-0.99) \times 10^6$, <0.001)



これらの結果から、人工心肺中の miRNA の変化によって、血小板内タンパクの発現変化が引き起こされ、血小板機能不全を引き起こす可能性が示唆された。

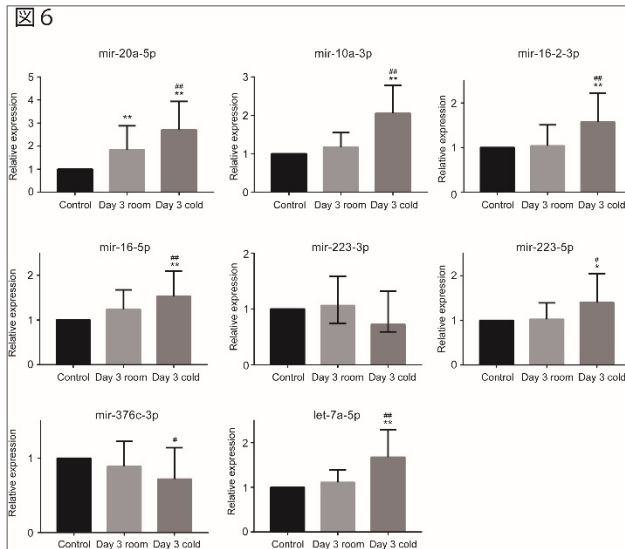
さらに、これらの結果から、温度が血小板内 miRNA の発現変化に影響を与える可能性が考えられたため、近年、その意義が見直され始めている血小板製剤の cold storage (4°C 保存) に着目し、その保存中の miRNA の発現変化を調査することとした。



本学倫理委員会承認後に、健康成人 10 名から採血を行い、多血小板血漿を精製し保存用バックにおいて次の条件で 72 時間保存した: 1) 22°C 振盪 2) 4°C 振盪なし。72 時間後に 10 分間 37°C で復温後、洗浄血小板懸濁液を作成し、解析を行った。その結果、4°C 保存ではベースラインに比して、125 つの miRNA、22°C 保存では 9 つの miRNA に変化が認められた。(図 5)

その結果、最も発現量が多かった 3 つの miRNA (mir-20a, mir-16-1, and mir-16-2)、glycoprotein 1b (GP1b) を制御することが知られている mir-10a, putative G protein coupled receptor (P2Y12) を制御することが知られている, protease activated-receptor 4 (PAR4) に関連することが知られている mir-223 に関して、validation PCR を行った。その結果、4°C 保存では 22°C

保存に対して、mir-20a-5p (fold change: 1.87, $p < 0.0001$), mir-10a-3p (1.88, $p < 0.0001$), mir-16-2-3p (1.54, $p < 0.01$), mir-223-5p (1.38, $p < 0.05$)であった。(図6)



[参考文献]

1. Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 22, 351–356.
2. British Journal of Haematology, 104, 208–219.
3. Anesthesiology 1991; 75: 388-93
4. Ann Thorac Surg 1999; 67: 79-8
5. Anesth Analg. 2014 Feb;118(2):257-63.
6. Thromb Haemost 2008; 99: 609-15.
7. Br J Anaesth. 2017 Dec 1;119(6):1118-1126.
8. Nat Genet 2010;42:454-458
9. BMC Genomics 2013;14:1
10. Plos one 2014;9:e102259
11. Blood 2011 117:5189-5197.
12. J Thromb Haemost 2009;7:241-246.
13. Int J Mol Sci 2016; 17:1873
14. Mol Biol Cell 2007; 18:24–33
15. J Thromb Haemost 2010; 8:369–378

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mukai Nobuhiro, Nakayama Yoshinobu, Ishi Sachiyo, Ogawa Satoru, Maeda Sachiko, Anada Natuki, Murakami Satoshi, Mizobe Toshiki, Sawa Teiji, Nakajima Yasufumi	4. 巻 46
2. 論文標題 Changes in MicroRNA Expression Level of Circulating Platelets Contribute to Platelet Defect After Cardiopulmonary Bypass	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Critical Care Medicine	6. 最初と最後の頁 e761 ~ e767
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI: 10.1097/CCM.0000000000003197	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mukai Nobuhiro, Nakayama Yoshinobu, Ishi Sachiyo, Murakami Takayuki, Ogawa Satoru, Kageyama Kyoko, Murakami Satoshi, Sasada Yuji, Yoshioka Jun, Nakajima Yasufumi	4. 巻 14
2. 論文標題 Cold storage conditions modify microRNA expressions for platelet transfusion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0218797
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1371/journal.pone.0218797	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----