

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09274

研究課題名(和文)小児心臓手術の人工心肺が活性化白血球を介して全身へ与える影響の分子メカニズム解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of activated white blood cells by cardiopulmonary bypass for human body in pediatric cardiac surgery.

研究代表者

井本 浩 (Imoto, Yutaka)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：60274461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：人工心肺を使用した小児心臓手術が患者に与える影響を分子生物学的に解析した。人体内に3,000種類以上の報告があるマイクロRNAをターゲットにした。心室中隔欠損症に対して心臓手術を受ける子供から定期的に採血をした。術前後で変化するマイクロRNAを検出するために、合併症が無かった症例の血液を用いてプロファイリングを行い、有意変化を示すマイクロRNAが検出された。他の血液検体に対しても検出されたマイクロRNAをPCR法で測定したところ、経時的に変化することがわかった。細胞実験が途中でありこの変化が何を意味するのか解明できていないが、小児心臓手術により血中マイクロRNAが変化することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工心肺を使用した小児心臓手術により、手術前後で血中マイクロRNAが変化することが分かった。マイクロRNAは複数の標的遺伝子に作用し、その蛋白質合成を阻害する。今回のプロファイリングで得られたマイクロRNAを解析することにより、心臓手術後に変化する複数の蛋白質を解明できる可能性がある。これまで注目されていなかった因子が導き出されれば、心臓手術後の経過をこれまでと違った視点で検討ができるようになり、術後管理の向上につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：The effect of cardiac surgery using cardiopulmonary bypass on pediatric patients was analyzed with molecular biological methods. We targeted microRNAs, which have been reported to be present in more than 3,000 species in the human body. Blood sample was collected over time from pediatric patients undergoing cardiac surgery for ventricular septal defect. To detect microRNAs that change after surgery, profiling was performed using blood sample from uncomplicated cases, and some microRNAs showing significant changes were detected. When the detected microRNAs were also analyzed by PCR in other blood samples, they changed over time after surgery. The cell culture experiment has not been completed yet, and it is not clear what change is occurring in the human body, however, it was found that pediatric cardiac surgery changes blood microRNAs.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：小児心臓手術 人工心肺 マイクロRNA エクソソーム 肺高血圧症 腎機能障害 血管増殖因子

## 1. 研究開始当初の背景

小児先天性心疾患に対する心臓手術は治療成績が向上してきているが、全身に与える影響は大きい。術後の全身血管抵抗の急激な増加による心臓への負荷や、未発達な人工心肺時間に応じて腎機能は低下する傾向にあり、肺血流は著明に変化するため厳重な管理を要する。

人工心肺のローラーポンプやラインと接した白血球は活性化されるが、活性化された白血球は炎症性サイトカインやマイクロ RNA、エクソソームを放出することが報告されている。これらの因子が全身の様々な細胞、特に血管内皮細胞に働きその機能を変化させ、術後状態へ影響している可能性が考えられる。小児の人工心肺回路は小型化してきたものの、成人より体表面積当たりの回路表面積が大きく、患者血液はラインと接する可能性が増えている。また、ラインの直径も小さく、成人と同じ心係数を駆出するとベルヌーイの法則に従い回路内圧は高くなる。さらに循環血液量の少ない小児では、回路の充填に大幅な血液希釈する必要がある。希釈された血液が高い回路内圧も受けてラインと接するため、血球へのストレスは高いことが予想される。従って、成人よりも血液中の分子が大きく変化し術後の循環動態変化と強く関連性すると考えられ、これら液性因子の解明は今後の術後管理の向上に貢献できると考えている。

測定項目について

本研究では、小児患者の血中因子(血管増殖因子を含むサイトカイン、マイクロ RNA など)の検討、血中のエクソソーム解析を行う予定である。

サイトカインは、活性化白血球から人工心肺などの機械的刺激によっても放出される。白血球の中でも、好中球は近年 LPS などの PAMPs(pathogen associated molecular patterns)や、ずり応力などの機械的刺激により、サイトカイン分泌と共に NETs(neutrophil extracellular traps)という現象を呈し、炎症や血栓形成において重要な役割をもつ。また、単球、マクロファージ系は、ずり応力の質と量に応じて、TNF- $\alpha$ をはじめとする炎症性サイトカインの分泌の形態が変化する。本研究では、炎症性サイトカインの変化、白血球分画の動態を観察することにより、人工心肺による低レベルの炎症を多角的に検討する。

エクソソーム(exosome)はサイズが 100nm 前後の分泌小胞であり、血球、血管内皮細胞、平滑筋など様々な細胞から能動的に放出されている。脂質二重膜の内部には様々な物質を内包しており、細胞から放出された後に血中を巡回し、離れた細胞や組織に取り込まれることで情報伝達を

行う報告がある。例えば、癌細胞から放出されるエクソソームは、その癌進展に関与している。近年、心血管系疾患のエクソソームが病態にも関与している報告がみられる。

マイクロ RNA(miRNA)は 20~25 塩基長の非コード短鎖 RNA であり、標的遺伝子の発現を抑制する。miRNA の増減は、発生・成長と共に各種疾患での働きを制御していることが報告されている。近年、図のように、miRNA は細胞外へ受動的・能動的に分泌されることが明らかになり、細胞間情報伝達のツールとして注目されている。分泌される miRNA の一部は、エクソソームに内包された形で検出される。本研究では、特にエクソソームを抽出してその中に含まれる miRNA について検討する。

私たちは小児心臓手術周術期の血液検体と白血球由来の分子との関連を解析することで、小児心臓手術後循環動態へ影響するマイクロ RNA やその関連分子を解明でき、今後の新たな治療の開発、周術期の病態を予測する新たなバイオマーカーの解明に結び付くと考えている。

## 2. 研究の目的

血液検体中のエクソソームに内在するマイクロ RNA や関連分子を解析することで、周術期循環動態、腎障害へ影響する因子を解明し、開心術後管理方法さらに発展させることを目的とする。小児開心術のダイナミックな血行動態の変化が、エクソソームに内在する分子へどのような変化をもたらすのかを解明することである。現在までに、小児心臓手術とエクソソームを関連づけた報告はない。人工心肺で活性化された白血球は、エクソソームを放出して循環に影響すると考えている。

本研究は、臨床検体のデータ解析のみならず、得られた結果を基にした基礎実験を行う。培養細胞にエクソソームを添加することで変化する細胞の機能を多方面から検討する。臨床研究と基礎研究を連続的に行うことで、今後の小児心臓手術後管理方法の向上のための具体的な治療法の開発につながると考える。

## 3. 研究の方法

本研究では、鹿児島大学医歯学総合研究科循環器・呼吸器講座、心臓血管消化器外科学分野および血管代謝病態解析学分野との共同で行う。患者検体は心室中隔欠損症手術を受ける患者対象より、術前、術後を通して血液検体を収集し、マイクロ RNA、蛋白質を解析する。さらに血管内皮関連培養細胞に関連が予想されるマイクロ RNA を導入して、蛋白質発現の変化や細胞への影響を確認する。同様に白血球系培養細胞から回収したエクソソームを血管内皮関連細胞に添加して、マイクロ RNA、蛋白質の変化を確認する。さらに血管内皮細胞が放出するエクソソームと患者検体とを比較して、活性化された白血球が周術期に血管内皮を介して全身に与える影響を検討する。

### (1) 検体収集

本研究は鹿児島大学病院倫理委員会に承認を受けた『小児先天性心疾患に対する工心肺使用下での開心術前後での血中およびエクソソーム内の蛋白質、核酸の解析』に基づいて、目標 50 症例の患者検体収集を行う。術前、術後、1 日目、3 日目、7 日目、14 日目、1 か月目の 7 ポイントで採血を施行し、血漿、血清を分離する。分離した血漿、血清をさらに超遠心機を用いてエクソソームを分離する。採取した検体は -80 度で保存する。

### (2) エクソソームおよび血漿、血清中の血管増殖因子関連蛋白質解析

血漿、血清、エクソソームを用いて、右図に示す炎症性サイトカイン、血管増殖因子関連蛋白質 (VEGF)、プロスタグランジン、トロンボキサン、血管拡張因子を ELISA 法で測定する。

### (3) マイクロ RNA の解析

血清、血漿、エクソソームよりマイクロ RNA を抽出する。典型的な術後経過をたどった検体を選択して miRNA の網羅的解析を行い、有意変化を示すマイクロ RNA を抽出する。抽出されたマイクロ RNA に対して、全ての検体で qPCR 法を行い半定量評価して術前後の経時的な変化を解析する。

(4) 術後臨床経過、検査値とサイトカイン、マイクロ RNA の比較相関検討

2, 3 で得られたデータと術後の経過を比較検討する。心エコーから得られる各種測定値の変化、腎機能を反映する BUN、Cr、eGFR の変化、末梢血データ、hsCRP などとの相関について調べる。

(5) 血管内皮培養細胞を用いた検討

培養血管内皮細胞を用いる。(2)(3)で抽出したマイクロ RNA を培養細胞に導入して、細胞の形態変化、増殖能、遊走能を検討する。マイクロ RNA が制御する標的蛋白質は、既報の解析ソフトを使用して選択する。マイクロ RNA は標的遺伝子発現を負に制御するので、ELISA 法で導き出した蛋白質量と比較して負の相関のあるものを抽出する。

(6) 白血球系培養細胞を用いた検討

術後検体で増殖しているマイクロ RNA や蛋白質は、活性化された白血球が放出したものである可能性が考えられる。白血球系培養細胞 THP-1 細胞に炎症性サイトカインを加えて、臨床検体で増加を示したマイクロ RNA、蛋白質について解析を行う。また THP-1 細胞が放出するエクソソームを分離、血管内皮系の培養細胞に導入して標的遺伝子蛋白質の発現量の変化をみる。

(7) 血管内皮細胞が放出するエクソソームの検討

先に使用した血管内皮系培養細胞の上清よりエクソソームを分離し、臨床検体で確認したマイクロ RNA、標的蛋白質、RNA を検討する。具体的には、マイクロ RNA および白血球のエクソソームで刺激された血管内皮細胞がどのような蛋白質を産生し、またどのような放出経路で細胞外に分泌しているのかを検討する。また炎症刺激を加えた白血球が産生したマイクロ RNA、増殖因子と患者検体での結果を比較することにより、術後早期に白血球の活性化によってもたらされる炎症物質の変化、血管内皮細胞への影響を検討する。

## 4. 研究成果

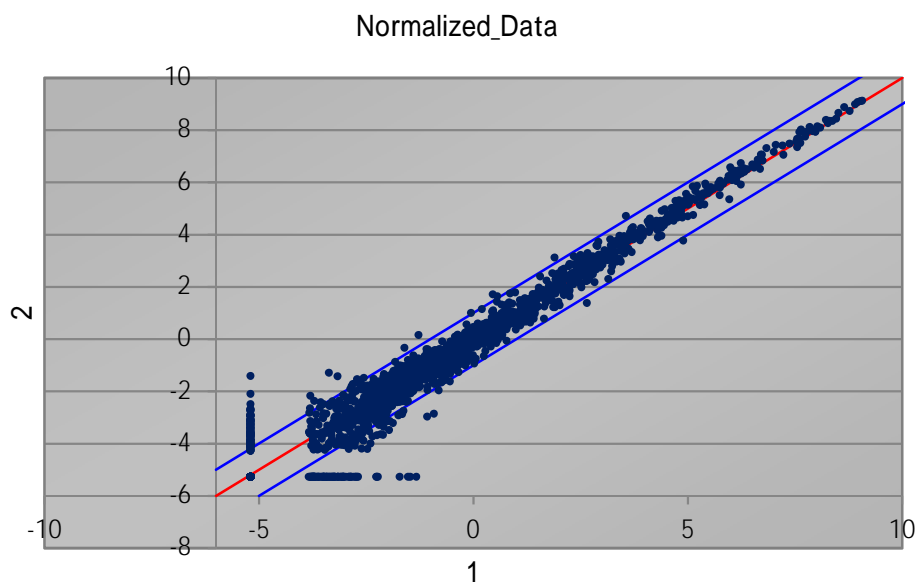
(1) 検体収集

鹿児島大学病院および鹿児島市立病院において、小児期に心室中隔欠損症に対するパッチ閉鎖術を行った患者の血液を、20名で術前から1か月目まで全ポイントで採血することができた。

(2) マイクロアレイの実施

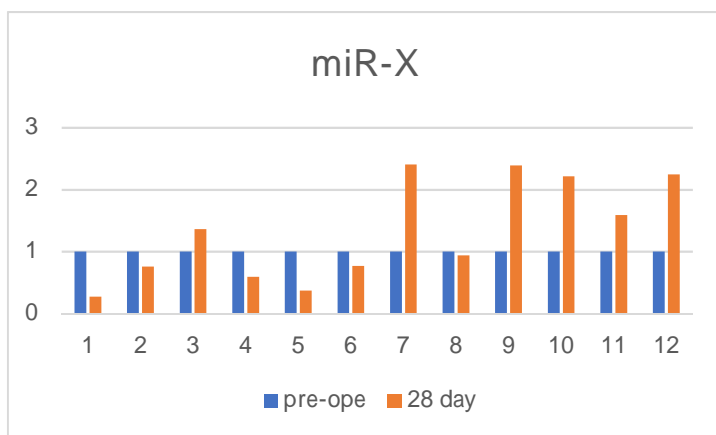
採取した血液検体の中で合併症なく経過した3名の検体をピックアップした。さらに、術前および1か月目で有意変化を示すマイクロ RNA を同定するために、マイクロ RNA のマイクロアレイを実施した。術前、術後で3名の対象で同様の増減傾向を示し、有意差が得られた3つのマイクロ RNA を同定した。

## マイクロアレイの実施



## PCR の実施

その他の患者検体を使用して、対象となるマイクロ RNA の PCR を施行した。術前後で変化していることはわかったのだが、必ずしもマイクロアレイと同様の傾向にはなっていなかった。



## 今後の課題

マイクロ RNA の抽出段階等での問題も考えられ、現在 PCR の再検を行っている。また、患者背景により傾向が変わっている可能性も考えられ、患者データの収集を進めている。また、今回のレポートでは報告することができなかったが、得られたマイクロ RNA について細胞実験を行い、循環器系細胞へ与える影響の解析を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	山口 宗一  (Yamakuchi Munekazu)  (20325814)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授   (17701)	
研究分担者	上野 健太郎  (Ueno Kentaro)  (20644892)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師   (17701)	
研究分担者	上田 英昭  (Kanda Hideaki)  (50598274)	鹿児島大学・医歯学域医学系・助教   (17701)	
研究分担者	橋口 照人  (Hashiguchi Teruto)  (70250917)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授   (17701)	
研究分担者	松葉 智之  (Matsuba Tomoyuki)  (80835281)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・研究委員   (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------