

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 4 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09516

研究課題名(和文) SAH後早期脳損傷マーカー及び治療標的としての内皮細胞由来マイクロRNAの同定

研究課題名(英文) Identification of endothelial cell origin microRNA as a clinical marker and therapeutic target of EBI after SAH

研究代表者

高橋 里史 (Takahashi, Satoshi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：20383870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：モデルマウスから脳毛細血管内皮細胞を単離し、EBIを生じた内皮細胞に特化したSAH後の遺伝子発現変化を明らかにするとともにその遺伝子発現変化に関与する末梢血液にて検出可能なマイクロRNAを同定する目的で研究を行った。くも膜下出血患者の末梢血中で発現が上昇しているhsa-miR-619-5pはくも膜下出血後の毛細血管内皮細胞で発現が低下していたGpx8、Soat1、およびRgs16を標的としていたため、EBIを生じた内皮細胞に特化したSAH後の遺伝子発現変化に関与する末梢血液において検出可能なEBIのバイオマーカーとして使用できるマイクロRNAである可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において同定したhsa-miR-619-5pはこれまで報告がないくも膜下出血後の早期脳障害(EBI)に関するバイオマーカーとして臨床上有用なマイクロRNAである可能性がある。EBIを早期の時点で客観的に捉える指標が確立されれば、EBIおよび続発するDCIに対して備えることが可能になり、壮年期にも発症し、重篤な後遺症を残し得る疾患であるがゆえにその予後改善が社会的にも大きな意義があると期待される疾患であるくも膜下出血の予後改善に寄与し得るものと期待する。

研究成果の概要(英文)：The brain capillary endothelial cell was isolated from the SAH model mouse, and the research was carried out in order to clarify the gene expression change after SAH specialized for the endothelial cell which suffered from EBI, and to identify the microRNA detectable in the peripheral blood which is concerned in the gene expression change in the brain capillary endothelial cell. Hsa-miR-619-5p whose expression was elevated in the peripheral blood of patients with subarachnoid hemorrhage had targeted Gpx8, Soat1, and Rgs16 whose expression was decreased in capillary endothelial cells after subarachnoid hemorrhage, suggesting that hsa-miR-619-5p may be a microRNA that can be used as biomarkers of EBI detectable in the peripheral blood involved in gene expression changes after SAH specialized for brain capillary endothelial cells that gave rise to EBI.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：くも膜下出血 マイクロRNA 早期脳障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

くも膜下出血 (subarachnoid hemorrhage: SAH) 後の遅発性脳虚血 (delayed cerebral ischemia: DCI) の中で、重症例における早期脳損傷 (early brain injury: EBI) に起因する DCI に対しては、未だ有効な診断法も治療法も確立されていない。我々は先行研究において SAH 後 DCI の病態解明の目的で、組織学的に Neurovascular Unit (NVU) の破綻を確認した EBI モデルマウスを確立し検討を重ねてきた。本モデルでは NVU 構成要素の中で毛細血管が最初に破綻するため、毛細血管内皮細胞が EBI のトリガーとなっている可能性を考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では、モデルマウスから脳毛細血管内皮細胞を単離し、EBI を生じた内皮細胞に特化した SAH 後の遺伝子発現変化を明らかにするとともにその遺伝子発現変化に關与する末梢血液にて検出可能なマイクロ RNA を同定する目的で研究を行った。

3. 研究の方法

(1) モデルマウスにおける遺伝子発現解析

Neurovascular unit の形態学的な崩壊を組織学的に確認している (図 1) 当研究室で確立した自家血注入前方循環モデルを用いた。簡潔に述べると、8 週齢のマウス (C57BL/6Ncr) を腹腔内麻酔ののち、頭部を固定、bregma の 4.5 mm 前方の傍正中部に小孔を穿ち、そこから定位的に 100 μ l の自家血を注入したものをを用いて SAH モデルマウスとした。モデルマウス作成時に頭蓋内圧を測定し、術 1 日目の神経症状と併せてモデルマウスを頭蓋内圧亢進高度の重症群と頭蓋内圧亢進軽度の軽症群に分けた。また、針のみを同様の手技で脳内へ進め、血液は注入しない sham 手術を施した個体をコントロール群とした。それぞれを SAH 作成後 72 時間に安楽死させ、脳を取り出し (図 2) 大脳皮質を分離、細断した大脳皮質に酵素処理を行い、セルストレーナーを用いて毛細血管片が含まれる層を分離、ピューロマイシン添加の培養液下で型コラーゲンとフィブロネクチンの混合液でコーティングした培養皿で培養することで SAH モデルマウスとコントロールのそれぞれから初代培養脳毛細血管内皮細胞を得た (図 3)。重症群および軽症群の SAH モデルマウスに加えてコントロール群のマウスから得た脳毛細血管内皮細胞からそれぞれ RNA を抽出し、Clariom™ D assay マイクロアレイ解析を行い SAH の影響を受けて発現が低下する遺伝子を探索した。

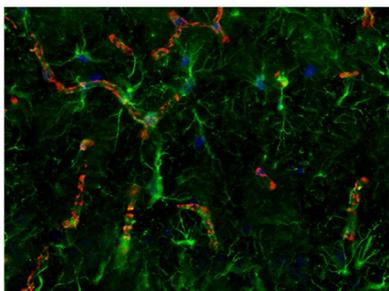


図 1 Neurovascular Unit
(赤: 毛細血管内皮、緑: アストロサイト)



図 2 SAH モデル

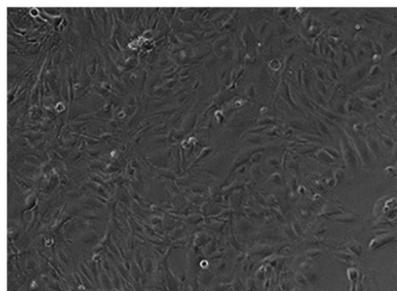


図 3 培養脳毛細血管内皮細胞
(モデル作成 3 日目に単離、5 日目の所見)

(2) 標的遺伝子の検索

先行研究において、SAH 患者血液中において、コントロール群である未破裂脳動脈瘤患者血清中と比べて発現が上昇していることが明らかになった 27 個のマイクロ RNA のうち、発現量の絶対値が多いマイクロ RNA を選び、ネット上のデータベースである Target scan (http://www.targetscan.org/vert_72/) で *in silico* の標的遺伝子を検索し、前述のモデルマウスにおける遺伝子発現解析における研究結果において血管内皮細胞で発現が低下しているものを標的としているか否かを検討した。

4. 研究成果

遺伝子の発現量が(頭蓋内圧亢進高度の重症群(ICPH)) < (頭蓋内圧亢進軽度の軽症群(ICPL)) < (コントロール群(non SAH))となっている遺伝子をくも膜下出血の影響を受けて発現が低下している遺伝子と考えた。マイクロアレイ解析の結果、10個のこのような発現量を呈する遺伝子を同定した(表1)。最も各群で発現量の差異が顕著であった遺伝子は組織プラスミノゲン活性化因子とウロキナーゼを不活化する凝固因子である Serpinb2 でその発現量(log2)は4.71(ICPH) < 7.49(ICPL) < 10.43(nonSAH)となっていた。

表1に自験データであるくも膜下出血患者の末梢血中においてコントロール群としての未破裂脳動脈瘤患者の末梢血中と比べて高発現しているマイクロRNAのうち絶対的発現量の多い10個のマイクロRNAをまとめた。これらのマイクロRNAが標的とする遺伝子を公開されたWeb上のデータベースであるTarget scanを用いてin silicoで解析し、くも膜下出血後の遺伝子発現変化に關与する末梢血液にて検出可能なマイクロRNAの同定を行った結果を表2にまとめる。

表1 マイクロアレイ解析の結果

| 内皮細胞に発現する遺伝子 | ICPH | ICPL | nonSAH | 末梢血中のマイクロRNA | SAH | コントロール |
|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------------|------|--------|
| Serpinb2 | 26.172866 | 179.76894 | 1379.5672 | hsa-miR-451a | 7666 | 3737 |
| Spp1 | 232.3249 | 879.17101 | 19893.369 | hsa-miR-619-5p | 304 | 137 |
| Timp1 | 64 | 139.10206 | 491.14323 | hsa-miR-3619-3p | 195 | 76 |
| Pdpn | 53.076451 | 97.680589 | 398.93226 | hsa-miR-5585-3p | 91 | 42 |
| Soat1 | 145.00914 | 324.03369 | 1052.7886 | hsa-miR-1273f | 49 | 22 |
| Dcn | 23.26356 | 52.345732 | 147.03339 | hsa-miR-5096 | 45 | 19 |
| Gpx8 | 58.89201 | 107.63474 | 349.70631 | hsa-miR-6735-5p | 36 | 16 |
| Rgs16 | 312.99591 | 744.43393 | 1698.4464 | hsa-miR-1285-3p | 34 | 14 |
| Mmp3 | 19.973289 | 20.39297 | 79.893155 | hsa-miR-550a-5p | 33 | 16 |
| Mgp | 188.70646 | 145.00914 | 719.07578 | hsa-miR-6759-3p | 30 | 14 |

表2 Target Scanを用いたin silicoの標的遺伝子解析のまとめ

| | Serpinb2 | Spp1 | Timp1 | Pdpn | Soat1 | Dcn | Gpx8 | Rgs16 | Mmp3 | Mgp | 標的遺伝子の数 |
|-----------------|----------|------|-------|------|-------|-----|------|-------|------|-----|---------|
| hsa-miR-451a | | | | | | | | | | | 0 |
| hsa-miR-619-5p | | | | | ○ | | ○ | ○ | | | 3 |
| hsa-miR-3619-3p | | | | ○ | ○ | | | | | | 2 |
| hsa-miR-5585-3p | ○ | | | | | | ○ | | | | 2 |
| hsa-miR-1273f | | | | | | | ○ | | | ○ | 2 |
| hsa-miR-5096 | | | | ○ | | | ○ | | | | 2 |
| hsa-miR-6735-5p | | | | | | | | | | | 0 |
| hsa-miR-1285-3p | | | | | ○ | | | ○ | | | 2 |
| hsa-miR-550a-5p | | | | | | | | | ○ | ○ | 2 |
| hsa-miR-6759-3p | | | | | ○ | | | | | | 1 |
| 關与するマイクロRNAの数 | 1 | 0 | 0 | 2 | 4 | 0 | 4 | 2 | 1 | 2 | |

患者血清の解析から同定されたマイクロRNA(hsa-miR-619-5p)は内皮細胞の遺伝子発現解析で同定された10個の遺伝子のうちの3つの遺伝子(Soat1, Gpx8, Rgs16)を標的としていた。また6つのマイクロRNA(hsa-miR-3619-3p, hsa-miR-1273f, hsa-miR-5585-3p, hsa-miR-5096, hsa-miR-1285-3p, hsa-miR-550a-5p)がそれぞれ2つの内皮細胞で発現変化のある遺伝子を標的としていた。

一方くも膜下出血を生じた内皮細胞において発現が低下していることが明らかになったGpx8とSoat1はSAH患者血清の解析から同定された4つのそれぞれ異なるマイクロRNAから標的とされていた。同様にPdpn, Rgs16, Mgpの3つの遺伝子は2つのそれぞれ異なるマイクロRNAから標的とされていた。

hsa-miR-619-5pはGpx8とSoat1の両方を標的としていたため、hsa-miR-619-5pは本研究で目的としていたEBIを生じた内皮細胞に特化したSAH後の遺伝子発現変化に關与する末梢血液にて検出可能なマイクロRNAとして臨床上有用である可能性が示唆された。

今後の展望としては本研究において同定したhsa-miR-619-5pのくも膜下出血患者の末梢血中における発現を症例数を増やして検討することで、くも膜下出血後のEBIの血中マーカーとして使用し得る可能性を検証するとともに、hsa-miR-619-5pが標的としているGpx8やSoat1の機能解析に繋がることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Satoshi Takahashi, Takenori Akiyama, Takashi Horiguchi, Tomoru Miwa, Ryo Takemura, Kazunari Yoshida | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Loss of consciousness at ictus and/or poor World Federation of Neurosurgical Societies grade on admission reflects the impact of EBI and predicts poor outcome in patients with SAH | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Surg Neurol Int . | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.25259/SNI_551_2019 | 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 - |
| 1. 著者名 Tokunori Kanazawa, Satoshi Takahashi, Yasuhiro Minami, Masahiro Jinzaki, Masahiro Toda, Kazunari Yoshida | 4. 巻 71 |
| 2. 論文標題 Early prediction of clinical outcomes in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage using computed tomography texture analysis | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 J Clin Neurosci . | 6. 最初と最後の頁 144-149 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jocn.2019.08.098 | 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 高橋 里史 | 4. 巻 33 |
| 2. 論文標題 くも膜下出血後脳血管攣縮 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 救急・集中治療 | 6. 最初と最後の頁 216-222 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| 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 Takahashi S, Akiyama T, Horiguchi T, Miwa T, Takemura R, Yoshida K. | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Loss of consciousness at ictus and/or poor World Federation of Neurosurgical Societies grade on admission reflects the impact of EBI and predicts poor outcome in patients with SAH. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Surg Neurol Int. | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 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 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Kanazawa T, Takahashi S, Minami Y, Jinzaki M, Toda M, Yoshida K. | 4. 巻 71 |
| 2. 論文標題 Early prediction of clinical outcomes in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage using computed tomography texture analysis. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 J Clin Neurosci. | 6. 最初と最後の頁 144-149 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 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 - |

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 小池和成, 高橋里史, 山田浩貴, 水谷克洋, 秋山武紀, 堀口崇 |
| 2. 発表標題 くも膜下出血早期脳損傷の内皮細胞にターゲットを置いた検討 |
| 3. 学会等名 第37回スバズムシンポジウム |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 高橋里史 戸田正博 |
| 2. 発表標題 くも膜下出血患者におけるmicroRNA発現プロファイルの検討 |
| 3. 学会等名 第21回日本分子脳神経外科学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔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 | 荒井 信彦 | 慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教 | 削除: 2020年3月18日 |
| | (Arai Nobuhiko) | | |
| | (80793801) | (32612) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|