

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102  
研究種目：若手研究  
研究期間：2019～2021  
課題番号：19K16954  
研究課題名(和文)血小板由来マイクロパーティクルの基礎的性状の解明と生体内の役割に関する研究

研究課題名(英文) The study on the fundamental characteristics of platelet-derived microparticles and their role in vivo

研究代表者  
塩津 弘倫 (Shiotsu, Hiromichi)  
九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：90625766  
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)：ヒト血中には多様な細胞外小胞体が存在し、絶えず血中を循環している。また、小胞体中には遺伝子発現を調節するマイクロRNAが豊富に存在し、疾患の存在や病態の変化を反映することが明らかとなった。小胞体の一つであるマイクロパーティクル(以下MP)は、炎症や凝固によって変化することから、その基礎的性状の解析は、新規バイオマーカーの創出に寄与する可能性がある。本研究では、培養細胞を用いてMPの回収法や評価法の検討を行い、さらに構築した手法を用いて、末梢血中のMPを解析した。その結果、血管内凝固を生じる疾患群ではMP内に独自のマイクロRNA発現が存在することを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
血中を循環する細胞外小胞体は微小な遺伝子を豊富に含んでおり、臨床検査として確立することができれば、従来の検査法では見いだせなかったわずかな変化を検出し、疾患の早期発見やモニタリングに有用である可能性があります。私たちの研究では、細胞外小胞体の一つであるマイクロパーティクルに着目し、MP回収法を構築し、MP内に含まれるマイクロRNAの解析を行いました。その結果、血管内で血液凝固を生じる疾患群ではマイクロRNAの発現パターンが変化していることを明らかとしました。この研究を発展させることで、細胞外小胞体を用いた新しい臨床検査法を構築できる可能性が考えられました。

研究成果の概要(英文)：Various extracellular vesicles are present in human blood and circulate constantly. In recent, microRNAs that regulate gene expression are encapsulated in these vesicles, reflecting the presence of diseases and changes in pathological conditions. Since microparticles (MPs), one of the extracellular vesicles, are altered by inflammation and coagulation, the analysis of their fundamental characteristics may contribute to the creation of new biomarkers. In this study, we investigated methods to collect and evaluate MPs using cultured cells and analyzed MPs in peripheral blood using the established method. As a result, we found that miRNA expression in patient's MP changed in intravascular coagulation.

研究分野：臨床検査

キーワード：マイクロパーティクル マイクロRNA

## 1. 研究開始当初の背景

MP は、直径 0.2-1.0  $\mu\text{m}$  程度の細胞外小胞体 ( Extracellular Vesicle : EV ) の一種である。MP は炎症、腫瘍形成、分化といった刺激によって細胞膜から放出され、放出された MP 内には miRNA や mRNA が豊富に存在している。MP は、細胞の上皮成長因子受容体 ( EGFR 受容体 ) からシグナルが伝達されることで生合成され、細胞から放出された MP は、種々のエンドサイトーシスや細胞膜への結合により他細胞へ取り込まれ、内包した miRNA によって遺伝子発現を調節している。

ヒト血中には多くの血小板由来マイクロパーティクル (Platelet-derived microparticle : PMP) が存在する。PMP は血小板の活性化にて放出され、凝固を促進する因子であると考えられている。また PMP 内にはマイクロ RNA (miRNA) が豊富に含まれるが、PMP および内部 miRNA の実際の役割はその多くがまだ不明である。

申請者はこれまでの研究により、血清 (血液凝固後の非細胞成分) 内に含まれる PMP は少なく、血漿 (血液凝固前の非細胞成分) 内に豊富に存在することを確認した。

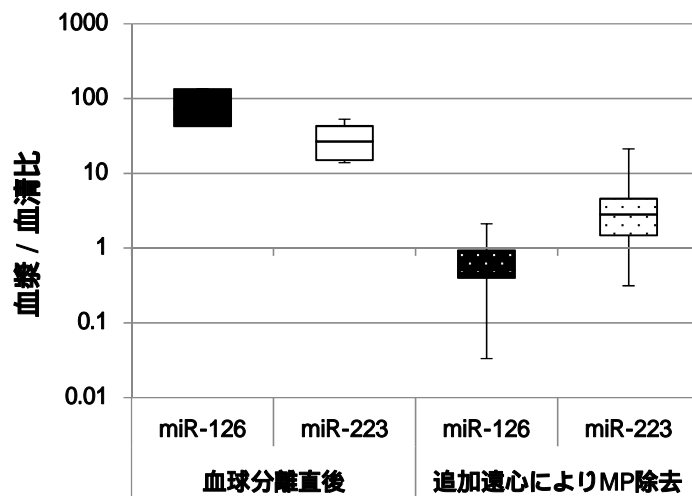


図1. MP混入によるmiRNA発現の変化

このことは、PMP が単に放出されるだけでなく、血液凝固に伴い消費される何らかのメカニズムの存在を示唆した。また PMP が血液凝固に伴って放出され、それが血清中で機能する物質であるならば、そこに miRNA が含まれる必然性についても疑問が生じる。こうしたことから、静脈内での血栓形成において、血液凝固時に MP が周辺細胞へと受け渡され、内部 miRNA を介した遺伝子発現制御により凝固を促進するといった、細胞間の情報伝達システムのひとつとして機能しているのではないかと推測された。

以上のことより、本研究では MP 解析手法の確立、および新規バイオマーカーを探索するために末梢血中の MP 内 miRNA を解析した。

## 2. 研究の目的

本研究では、in vitro で細胞株等から放出させた MP や末梢血中の MP に対し、分子生物学的なアプローチを用い、基礎的性状など解析前検討を行った。

また、静脈内の血栓形成に MP 内 miRNA 発現が関与している可能性を鑑み、深部静

脈血栓症患者 (Deep vein thrombosis : DVT) から血液を採取し、血中 MP 内 miRNA の網羅的解析ならびに定量解析を実施した。

### 3 . 研究の方法

#### MP 回収ならびに解析法の確立

In vitro での解析前検討には、HEL 細胞 (JCRB 細胞バンク) を用いた。HEL 細胞は、10% FBS (ニチレイバイオ)、RPMI 1640 (富士フィルム和光純薬)を用い、5% CO<sub>2</sub>、湿潤状態で培養した。3 日間の培養の後、培養液を 1900g × 10 分遠心し細胞成分を分離した。回収した培養液は 1,000nm の膜フィルタにてデブリを除去し、さらに 17,000g × 20 分の遠心を行って MP を回収した。回収した MP の計数にはフローサイトメトリー (FCM) を用いた。

MP 内 miRNA 解析には、Nucleospin miRNA kit (タカラバイオ)を用い、total RNA を抽出した。得られた total RNA は、TaqMan miRNA Reverse Transcription Kit および、TaqMan MicroRNA Assay (サーモフィッシャーサイエンティフィック)を用いた。miRNA の定量解析には total RNA の抽出時に 1 fmol の cel-miR-39 をスパイクインし、対照とした。

#### DVT 患者検体を用いた網羅的解析ならびに定量解析

本研究では初発の DVT 患者を対象とし、すでに内服治療を開始した患者、妊娠した患者、手術直後の患者を除外した。研究の対照には年齢、性別をマッチした健常ボランティアから、採血を行った。得られた血液は、前述のプロトコルによって血漿を分離し、解析まで-80 にて保管を行った。血漿からは前述のプロトコルにて MP を回収し、miRNeasy Serum/Plasma Kit (キアゲン)を用いて、total RNA を抽出した。

網羅的解析は 3D-Gene miRNA Oligo chip (東レ株式会社)、定量解析には TaqMan MicroRNA Assay を用いた。

本研究は熊本大学熊本大学大学院生命科学研究部ならびに九州大学医系地区倫理審査委員会の許諾を得て実施した。

### 4 . 研究成果

#### MP 回収ならびに解析法の確立

構築した FCM を用いて、得られた MP 分画を計測した。測定された粒子の直径は 0.25 - 1.34μm に位置し、MP を主とする細胞外小胞体が回収できたと考えられる。さらに同様のプロトコルを用いて、対照群および DVT 群の血漿内 MP を解析したが、2 群の間で粒子の大きさや数に有意な差は認めなかった(図 2)。また、回収した MP 分画より得られた total RNA を用いて、miR-22, 126, 223 を解析したところ、いずれも検出可能であった。

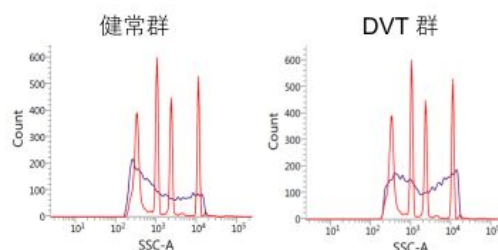


図2. 対照群およびDVT群由来血中MPの大きさの分布

### DVT 患者検体を用いた網羅的解析ならびに定量解析

DVT 患者群 5 名、健常群ボランティア群 5 名から得られた血漿から MP を回収し、miRNA の網羅的解析を実施した。3D-Gene miRNA Oligo chip にて計測した 2,632 種のうち、952 種の miRNA から有意なシグナルを検出した。R (バージョン 4.01) を用いて 2 群をクラスタリングし、ヒートマップを作製したところ、2 群を分離することが可能であった (図 3)。

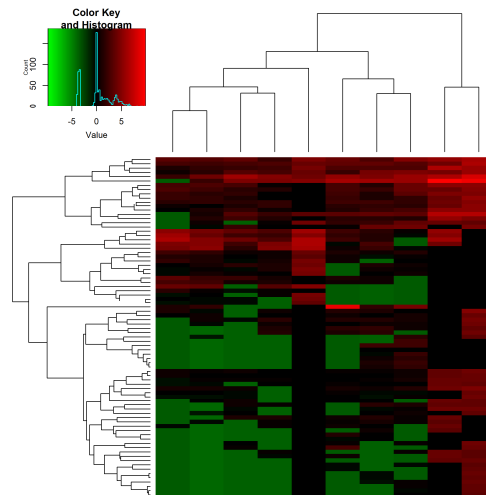


図 3. マイクロアレイを用いた DVT 群および対照群由来 MP 内 miRNA 網羅的解析

さらに DVT に特異的な miRNA を探索するために、ボルケーノプロットを作成した (図 4)。発現倍率が  $\pm 2$  倍以上変動し、かつウェルチの t 検定による統計量が 0.05 以下となる miRNA を抽出した。

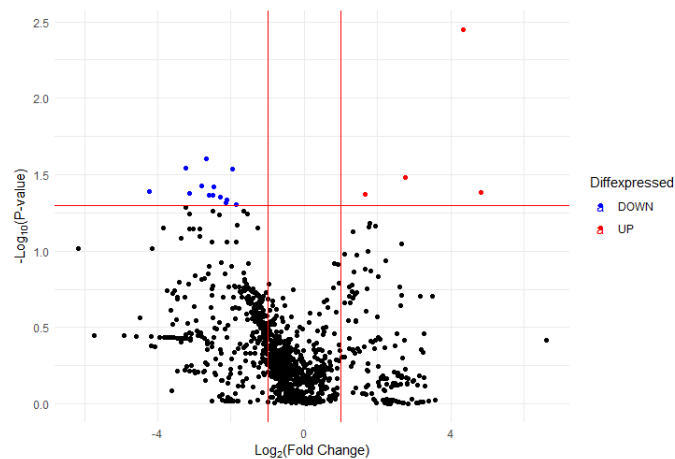


図 4. DVT 群および対照群血中 MP の miRNA プロファイル

抽出した miRNA の中でも、特に変動が大きかった 10 種の miRNA のうち、DVT 群で低値を示した miRNA は 8 種、高値を示した miRNA は 2 種であった。うち数種の miRNA を対象とした、RT-qPCR による定量解析では網羅的解析を裏付ける結果が得られた。以上の結果より、血管内凝固を伴う DVT 患者血中 MP 内には独自の miRNA プロファイルが存在することを確認した。今後抽出した特異的 miRNA の機能解析を行ったうえで、学術雑誌への投稿を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 塩津 弘倫
2. 発表標題 マイクロパーティクルを介した血管内皮障害の機序解明と動脈硬化性疾患リスクマーカーの探索
3. 学会等名 第68回日本臨床検査医学会学術集会
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
研究協力者	末田 大輔 (Sueta Daisuke)	熊本大学・大学院生命科学研究部 循環器内科学・助教  (17401)	
研究協力者	神力 悟 (Shinriki Satoru)	熊本大学・大学院生命科学研究部 病態情報解析学講座・准教授  (17401)	
研究協力者	辻田 賢一 (Tsujiita Kenichi)	熊本大学・大学院生命科学研究部 循環器内科学・教授  (17401)	
研究協力者	松井 啓隆 (Matsui Hirotaka)	熊本大学・大学院生命科学研究部 病態情報解析学講座・教授  (17401)	

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
---------	---------