

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：35416

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19309

研究課題名（和文）脳卒中後の機能回復に寄与するマイクロRNAの大規模探索と革新的予後予測への応用

研究課題名（英文）Exploration of circulating microRNAs related to functional outcomes in patients with acute ischemic stroke

研究代表者

猪村 剛史（Imura, Takeshi）

広島都市学園大学・健康科学部・講師（移行）

研究者番号：80760016

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）：エピジェネティクス因子のひとつとして知られるマイクロRNA（以下、miRNA）による遺伝子発現制御は、脳梗塞の回復に関連する神経可塑性に重要であることが予測されるが、脳梗塞後の機能回復におけるmiRNAの役割は依然として不明である。本研究では、急性期脳梗塞患者において機能予後の違いによって特異的に変化するmiRNAを網羅的に探索することを目的とした。シーケンス解析により、機能予後良好群と機能予後不良群の間で発現が異なるmiRNAを探索した結果、35個のmiRNAが予後良好群で発現が低下したDEMとして同定された。さらに、15個のmiRNAが予後良好群で発現が上昇したDEMとして同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞治療は、主幹動脈閉塞に対する血栓回収術による治療成績の飛躍的向上を例に日進月歩であるが、依然として多くの脳梗塞患者は後遺障害の残存を余儀なくされ、社会保障費の観点からも治療成績向上は喫緊の課題である。本研究により、機能予後の違いによってmiRNAの発現が異なることが示されたことは、脳梗塞後の機能回復にエピジェネティクス制御の一つであるmiRNAによる遺伝子発現制御が関与する可能性を示すものである。本研究成果は、脳梗塞後の後遺障害に対する新たな治療戦略開発の一助となることや予後予測に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Although epigenetic modifications have expected to be important in neuroplasticity for stroke recovery, the role of dynamic microRNA (miRNA) regulation in functional recovery after ischemic stroke remains unclear. The present study performed a comprehensive miRNA expression analysis in serum to identify specifically altered circulating miRNAs by different grades of functional outcomes in patients with acute ischemic stroke. As a results, the favorable outcome group exhibited significantly downregulated 35 miRNAs. In addition, 15 miRNAs were significantly upregulated in the favorable outcome group compared to the unfavorable outcome group.

研究分野：エピジェネティクス、リハビリテーション

キーワード：エピジェネティクス 機能回復 脳梗塞 バイオインフォマティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞発症後の長期的な機能帰結に関連する分子が複数明らかになりつつあるが、他の疾患と比較して回復のバリエーションが大きく、ゲノム情報のみでの現象解明には至っていない。近年、DNA の塩基配列を変化させずに遺伝子発現調節を行うエピジェネティクス制御が注目され、脳梗塞を含む様々な疾患の発症や発症後の機能回復に多大な影響を与えることがわかってきた。エピジェネティクス因子のひとつとして知られるマイクロRNA (以下、miRNA) による遺伝子発現制御は、脳梗塞の回復に関連する神経可塑性に重要であることが予測されるが、脳梗塞後の機能回復における miRNA の役割は依然として不明である。

2. 研究の目的

先行研究では、急性期脳梗塞患者と健常対照者の間で miRNA 発現を比較することで、脳梗塞発症後の分子変化を調べ、診断マーカーとしての役割を検討している。しかし、初期の脳梗塞重症度が同程度の急性期脳梗塞患者において、機能予後の違いによる miRNA 発現を比較した研究はほとんどなく、脳梗塞後の機能回復における miRNA 制御の役割は明らかになっていない。また、これまでの研究では、限られた miRNA のみを調査対象とすることが多く、脳梗塞後の機能回復への関与を念頭に網羅的に miRNA の発現解析を行った研究はみられない。そこで本研究では、次世代シーケンサーを用いた miRNA 発現解析を行い、急性期脳梗塞患者において機能予後の違いによって特異的に変化する miRNA を網羅的に探索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 対象者の選定と末梢血採取

研究協力施設にて脳梗塞と診断され入院した患者を対象とした。組み入れ基準は、初発の中大脳動脈領域の脳梗塞 (アテローム血栓性脳梗塞または心原性脳塞栓症)、DWI-ASPECTS が 5 ~ 10、同意取得時の年齢が 20 ~ 85 歳とした。除外基準は、脳梗塞発症前から歩行に介助を要す者とした。入院後 1 ~ 2 日目に末梢血サンプルを採取した。その後、室温で 30 分以上凝固させ、回転数 3500rpm、4°C で 15 分間遠心することで血清を分離した。

(2) 脳梗塞病変の評価と機能評価

脳梗塞病変の評価には DWI-ASPECTS を用いた。虚血病変を最小化するために急性血行再建療法を受けた患者は、治療終了後のスコアを評価した。急性期リハビリテーション開始時の脳卒中重症度の評価には NIHSS を用いた。機能予後の評価は、脳卒中発症から 3 ヶ月後の mRS を用いた。機能予後の違いにより、機能予後良好群 (mRS 0 または 1) と機能予後不良群 (mRS 2 ~ 5) に分けた。

(3) RNA 抽出とシーケンス解析

MicroRNA Isolation Kit (BioChain) を用いて、400µL の血清から small RNA を含む total RNA を抽出した。抽出した small RNA のクオリティと量は、QuantiFluor RNA System (Promega) と BioAnalyzer 2100 System (Agilent Technologies) の Agilent Small RNA Kit を用いて評価した。QIAseq miRNA Library Kit (Qiagen) を用いて miRNA-seq ライブラリー作成を行い、シーケンス解析を実施した。

(4) Differentially expressed miRNA (DEM) の同定

機能予後良好群と機能予後不良群の間の DEM の解析には DESeq2 を用いた。有意な DEM の閾値は $|\log_2FC| > 1.5$ および P 値 < 0.05 とし、 $\log_2FC > 1.5$ を発現上昇、 $\log_2FC < -1.5$ を発現低下と定義した。

(5) エンリッチメント解析

有意に発現が上昇または低下した DEM の生物学的役割を探索するために DAVID を用いてエンリッチメント解析を行った。エンリッチメント解析には、生物学的プロセス (biological process: BP)、細胞構成要素 (cellular component: CC)、分子機能 (molecular function: MF) の 3 つのドメインが含まれた。

4. 研究成果

(1) 研究対象者の基本属性

脳梗塞発症後 3 ヶ月後の mRS スコアに基づいて 2 群に分類された機能予後良好群と機能予後不良群の間で、患者の平均年齢や性別分布には統計学的な有意差を認めなかった。また、脳梗塞タイプや急性期血行再建治療の実施割合についても両群間に有意差を認めなかった。加えて、DWI-ASPECTS で評価した脳梗塞病変スコアや急性期リハビリテーション開始時の NIHSS にも両群間で有意差を認めなかった。

(2) 機能予後の違いによる DEM の同定

シーケンス解析の結果、データベースに登録されている全 1,879 個の miRNA のうち、997 個の miRNA の発現が確認された。全体的な miRNA の発現プロファイルは、機能予後良好群と機能予後不良群の間で大きく異なっていた。さらに、機能予後良好群と機能予後不良群の間での DEM を探索した結果、hsa-miR-218-1、hsa-miR-218-2、hsa-miR-320e、hsa-miR-320d-1、hsa-miR-320d-2、hsa-miR-326、hsa-miR-4429 等の 35 の miRNA が、機能予後不良群と比較して機能予後良好群で発現が低下した DEM として同定された (表 1)。さらに、hsa-miR-223、hsa-miR-18a、hsa-miR-411、hsa-miR-128-1 を含む 15 の miRNA が、機能予後不良群と比較して機能予後良好群で発現が上昇した DEM として同定された。

表 1 機能予後良好群で有意に発現が低下した DEMs

MicroRNA	Log2FC	P value
hsa-miR-4516	-10.86	<0.0001
ENSG00000283704	-8.98	<0.0001
hsa-miR-4426	-12.03	<0.0001
hsa-miR-100	-8.37	<0.0001
hsa-miR-6734	-7.84	0.0001
hsa-miR-7704	-9.05	0.0002
ENSG00000275110	-6.55	0.0003
hsa-miR-218-1	-7.27	0.0003
hsa-miR-218-2	-7.27	0.0003
hsa-miR-483	-5.09	0.0023
hsa-miR-320e	-4.37	0.0032
hsa-miR-320d-1	-3.79	0.0050
hsa-miR-320d-2	-3.72	0.0056
hsa-miR-5187	-5.69	0.0059
hsa-miR-505	-5.26	0.0068
hsa-miR-3909	-7.82	0.0110
hsa-miR-887	-7.65	0.0128
hsa-miR-4787	-7.54	0.0142
hsa-miR-326	-5.11	0.0156
hsa-miR-4429	-4.01	0.0160
hsa-miR-2116	-7.07	0.0210
hsa-miR-455	-6.63	0.0257
hsa-miR-4639	-6.68	0.0296
hsa-miR-6749	-6.51	0.0341
hsa-miR-139	-3.67	0.0366
hsa-miR-378a	-2.57	0.0391
hsa-miR-3180-2	-6.29	0.0414
hsa-miR-3180-1	-6.29	0.0414
hsa-miR-3180-3	-6.29	0.0414
hsa-miR-676	-6.24	0.0416
hsa-miR-514a-2	-6.21	0.0434
hsa-miR-514a-3	-6.21	0.0434
hsa-miR-514a-1	-6.21	0.0434
hsa-miR-3180-4	-6.21	0.0441
hsa-miR-3180-5	-6.21	0.0441

(3) エンリッチメント解析

機能予後良好群で発現低下もしくは発現上昇した DEM はいずれも、GOTERM カテゴリーでは「gene silencing by miRNA」、「miRNA mediated inhibition of translation」、「RISC complex」、「mRNA binding involved in posttranscriptional gene silencing」、「mRNA 3'-UTR binding」、KEGG_PATHWAY カテゴリーでは「MicroRNAs in cancer」にエンリッチされた。機能予後良好群で発現低下した DEM は、GOTERM カテゴリーでは、「positive regulation of stem cell proliferation」、「long-term synaptic potentiation」、「cellular response to glucose stimulus」、「extracellular vesicle」に特異的にエンリッチされた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 0件）

1. 著者名 Imura T., Toda H., Iwamoto Y., Inagawa T., Imada N., Tanaka R., Inoue Y., Araki H., Araki O.	4. 巻 30
2. 論文標題 Comparison of Supervised Machine Learning Algorithms for Classifying of Home Discharge Possibility in Convalescent Stroke Patients: A Secondary Analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Stroke Cerebrovasc Dis	6. 最初と最後の頁 106011
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2021.106011.	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 Imura T., Mitsutake T., Iwamoto Y., Tanaka R.	4. 巻 11
2. 論文標題 A systematic review of the usefulness of magnetic resonance imaging in predicting the gait ability of stroke patients.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 14338
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-93717-4.	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 Imura T., Iwamoto Y., Inagawa T., Imada N., Tanaka R., Toda H., Inoue Y., Araki H., Araki O.	4. 巻 30
2. 論文標題 Decision tree algorithm identifies stroke patients likely discharge home after rehabilitation using functional and environmental predictors.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Stroke Cerebrovasc Dis	6. 最初と最後の頁 105636
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2021.105636.	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 Imura T., Mitsutake T., Hori T., Tanaka R	4. 巻 1789
2. 論文標題 Predicting the prognosis of unilateral spatial neglect using magnetic resonance imaging in patients with stroke: A systematic review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain Res	6. 最初と最後の頁 147954
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2022.147954.	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
研究協力者	田中 亮 (Tanaka Ryo)		

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