

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791616

研究課題名(和文)敗血症病態が及ぼす単球系細胞内microRNAの発現変化と炎症消退機能への影響

研究課題名(英文)Changes in microRNA expression pattern and their effects on sepsis

研究代表者

澤田 麻衣子(Sawada, Maiko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90330860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：単球系の細胞死および貪食能低下は死細胞クリアランス機能の低下を導き、炎症が継続し予後悪化の原因となる。我々は過去、敗血症時のストレス性急性高血糖病態が単球系細胞の機能低下から炎症増悪因子になることを解明した。そして、近年、遺伝子発現の調節に大きな役割を演じているmicroRNAが、これら病態時に単球で如何なる発現変化をするのか探索した。その結果、敗血症時にmicroRNA-21の発現がマクロファージ貪食能制御に重要な役割を果たすことが判明した。また、それ以外にも新たなmicroRNAがこれらの現象に関与しているとの仮説から、今後は次世代シーケンサーにて網羅的解析を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：Increased cell death and decline in the phagocytic activity of the monocytic cell line markedly reduce the dead cell clearance rate, thereby prolonging the inflammatory response. We previously reported that stress-induced hyperglycemia during sepsis led to malfunctioning of the monocytic cell line and aggravated the inflammatory response. Recent advances have shown that microRNA expression plays important roles in the phagocytic activity of macrophages. Based on these findings, we analyzed the pattern of microRNA expression during sepsis. Our results revealed that microRNA-21 played an important role in the phagocytic activity of macrophages under the studied conditions. This finding led us to the conclusion that in addition to microRNA-21, other microRNAs could also be associated with the phagocytic activity of macrophages. Presently, we are conducting comprehensive analyses using next-generation sequencing to identify more microRNAs associated with macrophage phagocytic activity.

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

キーワード：micro RNA 敗血症 単球 貪食能

1. 研究開始当初の背景

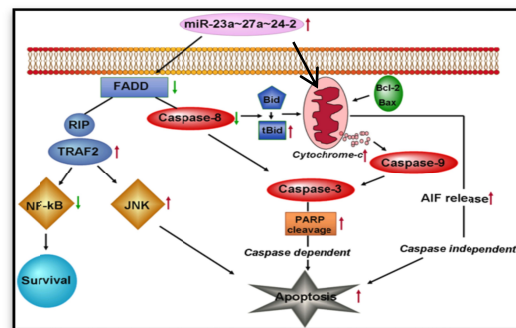
(1) 重症敗血症患者において、慢性的な高血糖状態（糖尿病の既往歴等）よりは、ストレスが原因の急性高血糖状態 (Stress Induced Hyperglycemia) が生命予後を決定する因子となることが知られている。(Critical Care Medicine, 2008;36:2407-13) また、ICU における患者を対象とした血糖値の解析調査は、血糖値の平均値のみならず、同一患者における血糖値の変動が小さいことが院内死亡率低下に重要であることを示されている。

(Anesthesiology, 2006 105:244-52) 我々の過去の研究で、血糖変動が大きいほど単球の貪食能が低下し、細胞死の誘因となったことを示した。

(2) 近年、タンパク質の設計図としては働かない 21 - 24 塩基程度の小さな RNA (micro RNA) が、遺伝子発現を調節するのに大きな役割を演じていることが分かっている。これまでに、動物、植物、ウイルス等において 10000 個近くの micro RNA が報告されているが、ヒトでも 2000 個程度は存在し、遺伝子全体の 1 / 3 以上の働きを調節していると予測されている。そして、miRNA がガンや生活習慣病、神経疾患、感染症など、ヒトの疾患の病因に関与することが報告されている。

また、単球系細胞から産出されるサイトカイン産生に関して miRNA の発現が関与していることが報告されている。(J Immunol 2011;186;1723-34, Blood 2011; 117; 6172-83) 我々は miRNA 定量的 PCR Array (Taqman Array MicroRNA Card, Applied Biosystems 社) を用いた予備実験により、高血糖または LPS 刺激による単球系細胞の経時的な変化において、miR-23a, miR-27a, miR-96, miR-145, miR-182, miR-216 の発現と、貪食能低下及び細胞死の増加に相関関係があったため、これらの miRNA の生体内の発

現を制御することで、敗血症における生存率改善が図れるとの仮説の元、実験を行う。(次図)



2. 研究の目的

(1) 糖濃度の異なる溶液を用いた細胞培養実験にて LPS 投与後の、THP-1 細胞、Monocyte/Macrophage における miRNA の発現変化を観察し、貪食能や細胞死に関連するタンパク質の mRNA と相補的な配列を持つ miRNA の候補をデータベースで探索すること。また、候補に上がった miRNA を遺伝子導入することや、特異的な阻害薬の anti-miR を投与することで、貪食能低下、細胞死の変化を観察すること。(In Vitro 系)

(2) 次世代シーケンサーを用い、(1) 以外の microRNA を網羅的に解析し、マクロファージの貪食能の変化と関連性のあるものを抽出すること。

3. 研究の方法

(1) THP-1 細胞 (PMA による分化後使用) 及びヒト Macrophage、ラット Macrophage を異なる糖濃度 (5mM, 15mM, 25mM Glucose, 及び浸透圧コントロールとしての 15mM, 25mM Mannitol) の培養液で 72 時間培養した時の miRNA の経時的変化を LPS 注入の有無を含めて観察する。特に、大腸菌片に対する貪食能

の変化、Akt のリン酸化及び IL-10 の細胞内発現量の変化を観察した。また、Nucleofection 法を用いて単球系細胞に micro RNA-21 の mimic 及び silencer を導入することで、そのときの上記の変化を観察した。

実験の流れ

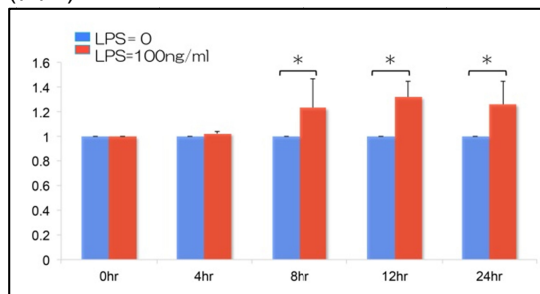
- miRNAの分離と濃縮
- 包括的miRNAの発現プロファイリング
- 特定miRNAの検出と定量
- 特定miRNAの機能解析

(2) (1) と同様に THP-1 細胞 (PMA による分化後使用)、及びヒト Macrophage、ラット Macrophage を異なる糖濃度 (5mM, 15mM, 25mM Glucose, 及び浸透圧コントロールとしての 15mM, 25mM Mannitol) の培養液で 72 時間培養したもの、また、腹腔内あるいは静脈内に LPS 投与をすることで炎症を惹起させた敗血症モデルラットから miVana™ miRNA Isolation Kit 等を使用して micro RNA を抽出後、次世代シーケンサー Ion PGM システムにて網羅的解析を施行した。

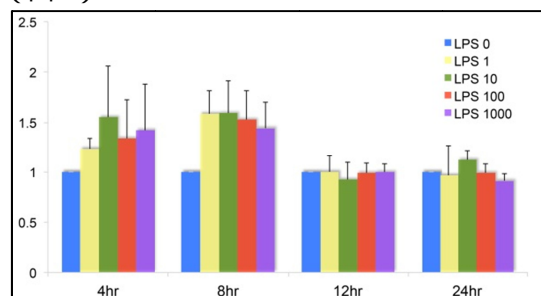
4 , 研究成果

(1) LPS 投与により経時的に micro RNA-21 の発現が上昇し、貪食能が上昇した。(図 A, B) micro RNA-21 の過剰発現条件では PTEN 及び PDCD4 の発現は低下、Akt のリン酸化、IL-10 の上昇を認め、貪食能が上昇した。過小発現下では PTEN 及び PDCD4 の発現は上昇、Akt のリン酸化、IL-10 の低下を認め、貪食能が著明に低下した。(図 C, 1-3)

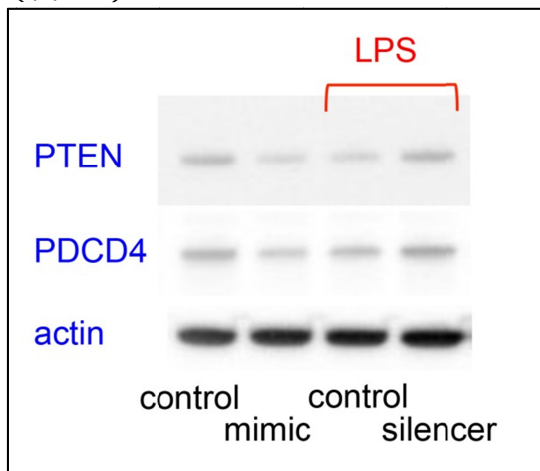
(図 A)



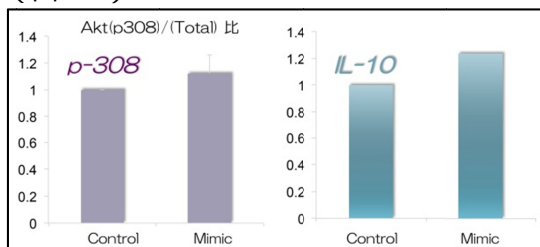
(図 B)



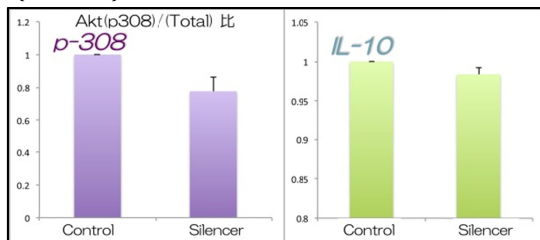
(図 C-1)



(図 C-2)



(図 C-3)



(2) 予備実験段階ではあるが、炎症反応と関連が知られている micro RNA-155 等を含むいくつかの micro RNA の発現とマクロファージの貪食能の変化との新たな関連性が示唆された。今後も引き続き研究を行い、最終的には In vivo での研究を予定している。

5, 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

1. 気管挿管困難患児に対する呼吸管理 気管切開が奏功した高度側彎合併先天性筋ジストロフィー患児の気道障害 **澤田麻衣子**, 牛島一男, 加納龍彦, 笹野 寛, 勝屋弘忠 日本集中治療医学会誌 2011 ; 18, 393-6. 査読有り
2. 膝蓋下脂肪体炎により下肢の痛みを生じていた1症例 山本洋介, 山田信一, 有川貴子, 永田環, 中川景子, 大石羊子, **澤田麻衣子**, 福重哲志, 牛島一男 日本ペインクリニック学会誌 2010 ;17, 488-90. 査読有り
3. 術前検査で深部静脈血栓症が認められた3症例 **澤田麻衣子**, 河野靖生, 新山修平, 渡邊誠之, 加納龍彦 Therapeutic Research 2008 ;29, 657-58 査読有り
4. Cesarean section for case with preoperatively-suspected placenta accrete followed by hysterectomy due to uncontrollable massive bleeding Kono Y, **Sawada M**, Kano T. Masui. 2007 ;56(12):1425-8. Japanese. 査読有り
5. Combination of spinal and inhalation anesthesia for nephrectomy in a cirrhotic patient **Sawada M**, Kono Y,

Kano T. Masui. 2007 ;56(1):77-9.

Japanese. 査読有り

6. 平木照之, **澤田麻衣子**, 渡邊誠之, 加納龍彦 インフォームドコンセント取得に十分な時間を要した脳動脈狭窄合併の大動脈手術患者 臨床麻酔 2004 ;28, 927-29
7. 加納龍彦, **澤田麻衣子** 体内時計の概念から手術、麻酔はいつ開始するのがよいか? 臨床麻酔 2004 ;28, 923
8. An increase in body temperature during radiofrequency ablation of liver tumors. **Sawada M**, Watanabe S, Tsuda H, Kano T. Anesth Analg. 2002 ;94(6):1416-20. 査読有り
9. Anesthetic management of a patient with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) Mishima Y, Katsuki S, **Sawada M**, Sato T, Hiraki T, Kano T. Masui. 2002 ;51(7):762-4. Japanese. 査読有り

[学会発表](計2件)

1. 第40回日本集中治療医学会, 松本, 2013.3.1
肥満が集中治療室患者の転帰に及ぼす影響
濱岡早枝子, 橋本 壮志, 高山 千尋, 黄瀬 ひろみ, 松山 広樹, **澤田 麻衣子**, 木村 彰夫 橋本 悟
2. 第40回日本集中治療医学会当院における急性期患者における終末期医療、ケアへの取り組み, 松本, 2013.3.1
澤田麻衣子, 松山広樹, 野口綾子, 橋本壮志, 徳平夏子, 濱岡早枝子, 黄瀬ひろみ, 木村彰夫 橋本悟, 佐和貞治

〔図書〕

澤田麻衣子, 橋本悟. 中心静脈栄養における
注意点. 麻酔科研修ノート. 稲田英一編. 第
2版. 診断と治療社; 2014. p241-243

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤田 麻衣子 (SAWADA MAIKO)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号: 90330860

(3) 連携研究者

該当無し