

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：24791949

研究課題名(和文) 血小板内microRNA発現の違いが心肺補助循環時の血小板機能低下へ及ぼす影響

研究課題名(英文) Effect of differences in intraplatelet microRNA expression on platelet dysfunction after cardiopulmonary bypass

研究代表者

前田 祥子 (Maeda, Sachiko)

京都府立医科大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：90529512

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)：心肺補助装置使用時に、血小板機能低下のため止血凝固能傷害に悩まされる。我々は血小板機能低下の原因となる血小板内Bax上昇とGlycoprotein Ib低下に個人差があり、その原因として血小板内microRNA発現の程度と相関があるとの仮説の元、実験を行った。In Vitro系での実験結果を元に心臓手術予定患者を対象に臨床研究を施行した。周術期に採血した血液より血小板のRNAを生成後microRNAの発現を定量解析して、心肺補助装置使用による血小板機能低下、血小板数低下及び周術期の出血量、輸血量と相関関係を調べた。Baxを標的遺伝子とするmiR-886-5pがこれらの現象と強い相関関係があった。

研究成果の概要(英文)：Thrombotic disorders by platelet dysfunction are frequently observed after cardiopulmonary bypass. We tested the hypothesis that differences in intraplatelet microRNA expression are related with intraplatelet Bax and platelet surface glycoprotein Ib expression, which subsequently affect perioperative blood loss.

In in vitro studies, we found that increase in intraplatelet miR-886-5p in thrombin-stimulated platelets has a strong relationship with preservation of platelet surface glycoprotein Ib expression and inhibition of intraplatelet Bax expression. In in vivo studies, we found a relationship between intraplatelet miR-886-5p expression, and platelet surface glycoprotein Ib and intraplatelet Bax expression in patients undergoing cardiac surgery after cardiopulmonary bypass. Patients showing increase in intraplatelet miR-886-5p expression had a tendency of decreased postoperative blood loss. Further studies are required to determine the complete clinical relevance of this relationship.

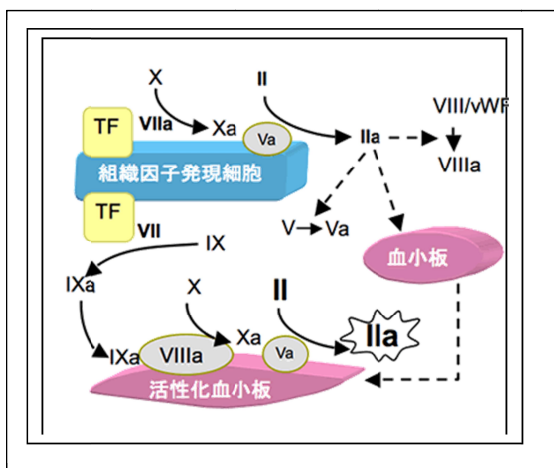
研究分野：救急医学

科研費の分科・細目：集中治療医学

キーワード：遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 従来より、ヒトの体内凝固反応経路は、外因系と内因系という凝固カスケードが別々に作用するとされてきたが、この説では、先天性凝固疾患患者の病態が説明できない。近年、内因系と外因系は一連の経路であり、凝固反応連鎖は組織因子産生細胞または血小板細胞上で起きるとされる説 (Cell Based Theory, Blood Reviews17, 2003, S1-5) (図1) が提唱され、血小板活性化の状態が止血凝固系の制御において



最も重要な役割を担うと考えられている。

- (2) 我々は最近の研究結果により、心臓手術患者における人工心肺離脱直後にトロンビン刺激に対する血小板不応性現象の原因として、血小板活性化 (Hyperactivity) に伴う血小板細胞内 p38MAPK リン酸化、Bax、Bak の発現亢進と血小板膜表面 GPIb, PAR-1 の発現低下にあると考えた。つまり、血小板活性化 (Hyperactivity) 後の血小板細胞死の過程が、周術期の血小板機能低下と血小板数減少に関与することが示唆された。(図2) これらの研究内容は本年平成 23 年度日本心臓血管麻酔学会において最優秀演題を得た。現在、麻酔関連の医学雑誌に投稿中である。

## 2. 研究の目的

- (1) 健康人から採取した血小板の RNA より miRNA の発現を定量し、トロンビンによる Bax、Bak 発現上昇と血小板膜表面 GPIb, PAR-1 の発現の低下との相関関係を示し、分子生物学的手法を用いて、介在する細胞内情報伝達系を解明すること。(In Vitro系)
- (2) 人工心肺下心臓手術予定患者の術前の採血により採取した血小板の RNA より micro RNA の発現を定量して、心肺補助装置使用による血小板機能低下及び血小板数低下及び、周術期の出血量、輸血量との相関関係を調べ、今後有望な予測因子になるかを明らかにすること。(In Vivo系)

## 3. 研究の方法

### 平成 24 年度 (In Vitro系)

- A) 健康成人(約 N=50)より血小板高反応者、低反応者の選定 血小板作動薬に対する血小板凝集曲線より High Responder (高反応者) と Low Responder (低反応者) のリスト作成した。
- B) 白血球除去した洗浄血小板溶液の生成と miRNA の分離・濃縮 高反応者群と低反応者群 (各 N=20) の血小板濃厚血漿溶液を作成後、CD45 陽性ネガティブセレクションにより白血球除去を行い RNA とタンパクを精製する。miRNA の分離と濃縮は、市販の miVana™ miRNA Isolation Kit 等を用い抽出した。
- C) 包括的 miRNA の発現プロファイリング 次に、定量性のある網羅的 micrRNA プロファイリングを従来のマイクロアレイより優れた TaqMan® Array MicroRNA Card, (Applied Biosystems 社) を用いた実験に



より施行。高反応者群と低反応者群で miRNA の発現の違いを網羅的に評価した。高反応者群と低反応者群で発現に違いのあった microRNA に関して、mRNA に相補的な配列が無いか複数の miRNA Prediction Tool (Miranda, TargetScan Human5.0, PicTar, miRBase Targets Version 5.0) により、血小板活性化、細胞死と関係のあると予想される miRNA を探索を行った。

#### D) 特定 miRNA の検出と定量

以上の実験過程で候補に上がった miRNA とそれに相補的配列の mRNA 及びタンパク発現をリアルタイム PCR (RNA レベル) と、フローサイトメトリー等 (タンパク質レベル) で定量評価した。

### 平成 25 年度 (In Vivo 系)

#### E) 臨床研究

上記の In Vitro 系での実験結果をもとに人工心肺下心臓手術予定患者を対象に臨床研究を施行した。

手術開始前、人工心肺終了後に採取した血液より、Platelet Rich Plasma を生成後、洗浄血小板溶液を作成した後、miVana™ miRNA Isolation Kit を用いて、血小板の RNA を生成、定量した。その後、TaqMan® MicroRNA Assays を用いて、リアルタイム PCR 法により、その発現を定量解析して、心肺補助装置使用による血小板機能低下及び血小板数低下及び、周術期の出血量、

輸血量との相関関係を調べた。

#### 4. 研究結果

##### (In Vitro 系)

今回の実験過程において、miR-886-5p の発現とトロンピン刺激による血小板内 Bax の発現、及び血小板表面 Glycoprotein Ib の発現低下に相関があることを見出した。

##### (In Vivo 系)

結果として、血小板 miR-886-5p が上昇した患者において、血小板表面 Glycoprotein Ib 発現低下、血小板内 Bax の発現上が周術期に顕著に見られた。また、出血量も増加する傾向にあった。

また、今後の研究展開のため、旧来のアレイによる包括的な解析より、定量性のある次世代シーケンサーを購入し、血小板に発現している microRNA と、活性化された血小板から血中に放出された miRNA 発現の包括的解析の予備実験を行った。

その方法として mirVana™ miRNA Isolation Kit を用いて Small RNA を生成後、以下の様に行った。

1. Small RNA のライブラリ作成 Ion Total RNA-Seq Kit を用いてフラグメント化
2. cDNA に変換 逆転写酵素を用いる
3. ベース調整 (4 時間) エマルジョン PCR 法を用いて、cDNA を増幅
4. シーケンシング (3 時間) シーケンサーによる miRNA 発現定量
5. データ解析 (1 時間) サーバーに SFF または FASTQ 形式のデータが転送される

発現定量解析には、CLC バイオ社の解析ソフト (Genomic Work Bench) を使用した。

これらの実験結果は、今後学会、論文等で報告を予定にしている。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計3件)

1. 中山力恒、中嶋康文、前田祥子、小川覚、溝部俊樹. トロンボエラストメトリーを用いた周術期止血管理は小児開心術における術後出血量および術後輸血量を減少させる。日本麻酔科学会学術集会 2013年5月23日—25日 札幌
2. 中山力恒、中嶋康文、竹下淳、小川覚、前田祥子、溝部俊樹 小児患者に対する超音波ガイド下観血的動脈圧カテーテル留置および末梢静脈カテーテル留置に影響する因子. 第41回日本集中治療医学会学術集会 2014年2月27日—3月1日
3. 敗血症性ショック症状がマスクされた膿胸合併神経芽細胞腫の一乳児例 駒井翔太、徳平夏子、志馬伸朗、木村彰夫、松山広樹、黄瀬ひろみ、澤田麻衣子、橋本壮士、加藤裕子、井上美帆、前田祥子、坂東瑞樹、嶋本早希、橋本悟、安炳文、柳生茂希. 第57回日本集中治療医学会近畿地方会 2012年7月7日

〔図書〕(計2件)

1. 経食道心エコーハンドブック 2D TEE  
克誠堂出版 監訳 溝部俊樹  
前田祥子 一章翻訳 担当
2. 経食道心エコーハンドブック 3D TEE  
克誠堂出版 監訳 溝部俊樹  
前田祥子 一章翻訳 担当

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

前田 祥子 (MAEDA SACHIKO)  
京都府立医科大学・医学部附属病院・病院  
助教  
研究者番号：90529512

### (2)研究分担者

該当無し

研究者番号：

### (3)連携研究者

該当無し