

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670624

研究課題名(和文)分泌型microRNAによる脳血管攣縮機構の解明と新規バイオマーカーの同定

研究課題名(英文)microRNA/mRNA expression profile for further elucidation of the mechanism of cerebral vasospasm and identification of novel biomarkers

研究代表者

溝口 昌弘 (Mizoguchi, Masahiro)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：50380621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳血管攣縮は、くも膜下出血後発生する脳動脈の可逆的収縮であり、くも膜下出血患者の予後を規定する重大な合併症である。動物モデルにおける脳血管、脳におけるmiRNA/mRNA発現解析により、くも膜下出血後のMMP-9、miR-21の発現上昇、TIMP3、miR-351の発現低下とその関連性を同定した。また、くも膜下出血後、血管で高発現したRelaxinが、血清、髄液中でもその発現に相関がみられる事を明らかにした。本研究結果は、miRNA/mRNA発現プロファイルに基づく解析が、新たな脳血管攣縮機構の解明と新規バイオマーカー同定に繋がることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cerebral vasospasm is a reversible contraction of the cerebral artery after subarachnoid hemorrhage, which is a critical complication that defines the prognosis of the patients. By miRNA/ mRNA expression analysis in the brain and cerebral vessels in animal models, we identified overexpression of MMP-9, miR-21 and underexpression of TIMP3, miR-351 and its relevance after subarachnoid hemorrhage. Also, after subarachnoid hemorrhage, Relaxin, which was highly expressed in cerebral vessels, further investigation revealed that Relaxin, which was highly expressed in cerebral vessels, is also detected even in the cerebrospinal fluid and serum. The results of this study revealed that the analysis based on the miRNA / mRNA expression profiles may lead to elucidation of novel cerebral vasospasm mechanism and identification of novel biomarkers.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳血管障害 脳血管攣縮 くも膜下出血 microRNA 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

脳血管攣縮は、くも膜下出血後4日目から14日目頃に発生する脳動脈の可逆的収縮であり、くも膜下出血患者の予後を規定する重大な合併症である。現在まで様々な治療法の試みが報告されているが、その発症を完全に予防、制御することは不可能である。脳血管攣縮の発症には様々な因子の関与が示唆されているが、未だその発症機序は不明な点が多く、新たな診断・治療法の開発にはその分子生物学的機序の解明が不可欠である。micro RNA(miRNA)は近年新たに同定された小分子 non-codingRNA であり、その配列特異的に遺伝子発現を制御する新たな分子制御機構である。様々な生物学的現象への関与が明らかとなっており、近年飛躍的に研究が進んでいる。その機能は転写後レベルで複数の遺伝子発現制御を行い、細胞増殖、細胞死、形質転換など様々な生物学的機能を制御している。分泌型miRNAはエクソソーム内や特異的蛋白と結合し、非常に安定した状態で体液中に存在している。近年、細胞間コミュニケーション機構として注目されている。また、赤血球にも豊富なエクソソーム、分泌型miRNAが含有されており、その機能が維持していることも近年明らかとなっている。

2. 研究の目的

microRNA(miRNA)は新たな遺伝子発現制御機構であり、分泌型のmiRNAは細胞間の相互作用機構として重要な役割を果たしている事が明らかとなりつつある。近年、平滑筋機能に対するmiRNAの関与が示唆されているが、脳血管攣縮におけるmiRNAの分子生物学的機能は未だ不明である。本研究では、miRNAに着目し、その発現解析に基づき脳血管攣縮の新たな分子機構の解明を目指す。さらに分泌型miRNAが体液中でも安定して存在していることより、体液中miRNA発現と脳血管攣縮の関連を解明

し、臨床上有用な新規バイオマーカー、治療標的の同定を目指す。

3. 研究の方法

1) ウサギくも膜下出血モデル作成、経時的網羅的遺伝子発現解析

オスの日本白色ウサギ (2.5 ~ 3.0 kg) に、麻酔下にて、ウサギを腹臥位にし、0.5 mL の脳脊髄液を大槽から経皮的に吸引し、代わりに 2.5mL の自家動脈血を注入した。その後、頭部を 30 度下方に傾斜させた状態で 30 分間保持した。2 日目、1 回目と同様に 2 回目の自家血注入を施行した。対照モデルとしては、SAH 未発症モデルを用いた(day 0)。

くも膜下出血発症後、Day0.3.5.7 において抽出した脳底動脈の収縮性を確認後、smallRNA を含むtotalRNA、蛋白を抽出。

DNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析をRabbit oligo DNA microarray (Agilent 社)によりtotal 43,623遺伝子発現をDay0.3.5.7で経時的に解析を行った。

2) ラット SAH モデル作成、網羅的 microRNA / mRNA 発現解析

網羅的microRNA解析を目的に雄性

Sprague Dawley rat (体重300-350グラム) を用いて、ラットSAHモデル作成に着手した。完全な鎮痛、鎮静下にてラットくも膜下出血モデルの作成を行った。仰臥位として手術台上に固定し、卓上顕微鏡を用い、外頸動脈から4-0ナイロン糸を挿入し、順行性に内頸動脈分岐部を損傷した。SAH群のラットは、20分、1、3、6、24、48時間経過した時点で灌流固定を行った。最も安定した24時間後にSAH評価を行い、Sugawaraらのスコアリングでmoderate以上の6サンプルを対象に、basal cortex、frontal cortex、hippocampus、striatum、脳血管)より、mirVana miRNA isolation kit を用いて、miRNAを含んだtotal RNAを抽出した。microarray (TORAY 3D-Gene)を用いてmiRNA/mRNAの網羅的発現解析を行った。

microarrayにより、発現変動が強い
miRNA/mRNAに対してはreal-time PCRにて
validationを行った。

4. 研究成果

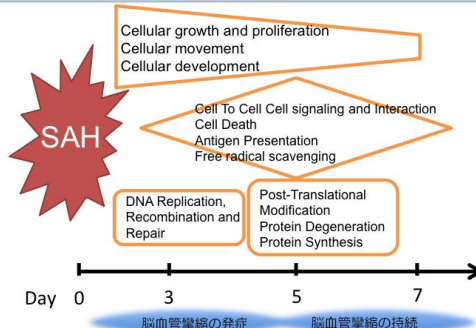
1) ラット SAH モデル作成

網羅的 microRNA 解析を目的にラット SAH モデル作成に着手した。SAH モデル作成に用いたラットは 42 匹、control 群などに用いたラットは 17 匹、麻酔死などで使用できなかったラットが 3 匹であった。SAH 群のラットは、20 分、1、3、6、24、48 時間経過した時点で灌流固定を行った。Sham 群では死亡したラットは存在しなかったが、SAH 群のラットでは全 42 匹中 8 匹で死亡した(mortality 19%)。死亡した 8 匹のうち、3 匹はほぼ即死であり、20 分以内の死亡数は 8 匹のうち 3 匹であった(mortality 38%)。24 時間経過した時点でのラットの死亡数は、全 6 匹中 5 匹であり(mortality 83%)、最も死亡率が高かった。その他の time point で死亡したラットは存在しなかった。血腫の量、分布はラット毎にかなりのばらつきがあったが、全 42 匹のうち 14 匹(41%)のラットで中等度以上の SAH 発症に成功した。

2) ウサギ SAH モデル脳底動脈遺伝子発現解析

ウサギ SAH モデル脳底動脈における経時的遺伝子発現変動を網羅的に解析した(day0,3,5,7)。パスウェイ解析にて、脳血管攣縮の初期に“cellular growth and proliferation” “cellular movement” “cellular development” に関与している遺伝子が発現変動し、脳血管攣縮の極期に“cell-to-cell signaling and interaction” “cell death” “antigen presentation” に関与する遺伝子が著しく変動していることを確定化し、論文化し報告した。

発現変動遺伝子群のfunction category の変動



さらに Day5,7 で最も高発現を示した relaxin-1 とそのレセプターである RXFP 1 の詳細な検討により、relaxin-1 発現上昇と RXFP 1 発現低下の脳血管攣縮への関与が示唆された。さらに、この変化が血清、髄液中でも同定できる可能性が示された。

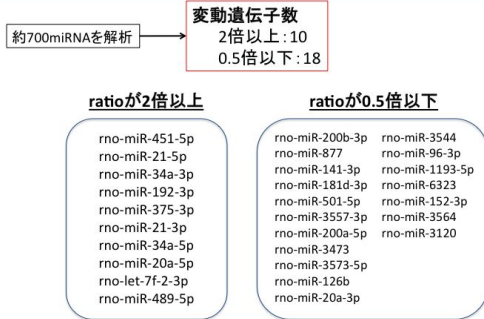
3) 動物モデルより全血採取および分泌型 microRNA 発現解析

ラット SAH モデル、マウス脳腫瘍モデルより心房穿刺にて全血を採取し、microRNA 抽出し、分泌型 microRNA 発現解析が可能かを検証した。マウス腫瘍モデルにおいて、腫瘍特異的 miR-21 の高発現を同定することができた。動物モデルの全血より高発現 miRNA を同定することが可能であることを確認した。

4) ラット SAH モデルにおける miRNA / mRNA の網羅的発現解析

ラット endovascular perforation model (EP model)を作成した。24 時間後に SAH 評価を行い、Sugawara らのスコアリングで moderate 以上の 6 サンプルを解析した。EPmodel で最も brain damage が強いと考えられる脳(basal cortex)より、miRNA を含有する total RNA を抽出し、miRNA/mRNA の網羅的発現解析を行った。microRNA 解析では、発現が 2 倍以上のものが 10 個、0.5 倍以下のものが 18 個同定された。mRNA 解析では、発現が 2 倍以上のものが 1429 個、0.5 倍以下のものが 1223 個同定された。Gene ontology 解析では、細胞外マトリックス関連遺伝子の発現変動が有意に多かった。

**miRNA microarray (Rat miRNA Oligo chip - 4 plex)
(24h sham vs 24h SAH)**

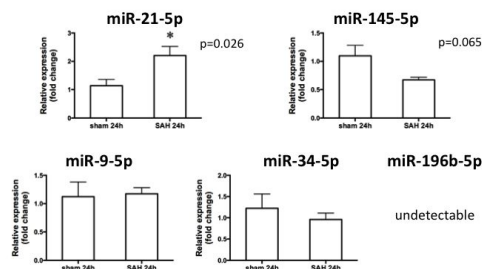


5) MMP-9 遺伝子関連 miRNA 発現解析

近年、delayed cerebral ischemia と関連が示唆されている MMP-9 に着目し、miRNA 発現データの解析を行った。Real time PCR を用いて、MMP-9 発現亢進の validation を行った。Microarray の結果とこれまでの報告より5つの miRNA(miR-9, -21, -34, -145, 196b)を選び発現解析を行い、miR-21 の有意な発現亢進と miR-145 の発現低下傾向を同定した。

MMP-9に間接的に関与するmiRNAの発現

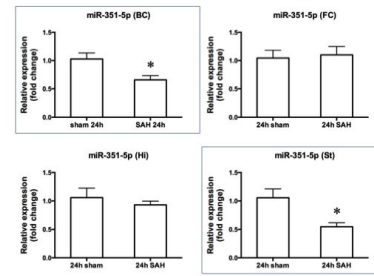
[RT-PCR (n=6)]



6) miR-21, -145 関連遺伝子、MMP-9 関連 miRNA の発現解析 (局在による関連)

データベースより標的遺伝子、miRNA 候補を選出し、マイクロアレイデータを再検討した。新規遺伝子は同定できなかったが、新たに MMP-9 関連 miRNA として miR-351 が同定され、validation をおこない、その関連性が示唆された。その発現形式は、脳の解析部位により異なることも明らかとなった。Basal cortex と striatum において、miR-351 の発現低下が MMP-9 の発現亢進に関与していることが示唆された。

**miR-351-5p
局在毎の発現 (n=6)**



Basal cortex と Striatum において、miR-351-5p の発現の低下が MMP-9 の発現亢進に関与していることが示唆された。

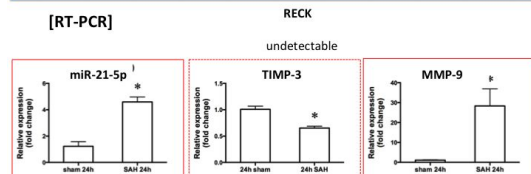
BC: basal cortex, FC: frontal cortex, Hi: hippocampus, St: striatum

7) 血管、血液中の miRNA 発現解析

血管でも同様に解析を行ない、miR-21 の発現亢進、TIMP-3 の発現低下、MMP-9 の発現亢進が明らかとなった。血中 miR-21 発現解析を行ったが、対照群と明らかな差を同定することはできなかった。SAH 後の血管において miR-21 発現亢進に伴う、TIMP3 低下が MMP-9 の発現亢進に関与していることが示唆された。

arteryにおけるmiR-21-5p, TIMP-3, RECKの発現 (n=6)

[RT-PCR]



arteryのMMP-9はmiR-21-5pの発現亢進によるTIMP-3の発現低下が関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

Kurogi R, Kikkawa Y, Matsuo S; Nakamizo A, Mizoguchi M, Sasaki T.

Upregulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 contributes to restoration of the extracellular matrix in the rabbit basilar artery during cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage
Brain Research (査読有), 2015:26-36.

DOI:10.1016/j.brainres.2015.04.049.

Kikkawa Y, Kurogi R, Sasaki T.

The Single and Double Blood Injection Rabbit Subarachnoid Hemorrhage Model Transl Stroke Res (査読有). 2015,6:88-97.
DOI: 10.1007/s12975-014-0375-5.

Matsuo M, Kikkawa Y, Hokama M, Kurogi R, Nakamizo A, Mizoguchi M, Sasaki T.

Gene expression profiling and bioinformatics analysis of rabbit basilar artery after experimental subarachnoid hemorrhage J Neurol Neurophysiol (査読有) 2014,5:
DOI:10.4172/2155-9562.1000201

Kikkawa Y, Kameda K, Matsuo S, Kurogi R, Nakamizo A, Mizoguchi M, Sasaki T.

Mechanisms underlying increased vascular smooth muscle contractility in the rabbit basilar artery following subarachnoid hemorrhage. Acta Neurochir Suppl. (査読有) 2014, 120:95-8.
DOI:10.1007/978-3-319-04981-6_16.

〔学会発表〕(計4件)

黒木亮太、佐山徹郎、溝口昌弘、中溝玲、森恩、橋口公章、天野敏之、吉川雄一郎、吉本幸司、飯原弘二
ラットくも膜下出血モデルにおける MMP-9 関連 micro RNA の発現解析
Stroke 2015、第 31 回スバズム・シンポジウム(広島)
2015 年 3 月 26 日

吉川雄一郎、松尾諭、黒木亮太、中溝玲、吉本幸司、溝口昌弘、佐々木富男
ultra-high resolution CT を用いた脳血管攣

縮と微小脳循環評価の試み

第 30 回スバズムシンポジウム(大阪)

2014 年 3 月 13 日

松尾諭、吉川雄一郎、黒木亮太、中溝玲、吉本幸司、溝口昌弘、佐々木富男

ウサギくも膜下出血モデル脳底動脈における relaxin の発現とその役割
第 72 回日本脳神経外科学会総会(神奈川)
2013 年 10 月 16 日

黒木亮太、吉川雄一郎、松尾諭、中溝玲、吉本幸司、溝口昌弘、佐々木富男

ウサギくも膜下出血脳底動脈における細胞外マトリックスのリモデリングに関わるタンパク質の発現変動とその役割
第 72 回日本脳神経外科学会総会(神奈川)
2013 年 10 月 16 日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
溝口昌弘(Mizoguchi Masahiro)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号: 50380621

(2)研究分担者
吉川雄一郎(Kikkawa Yuichiro)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号: 80423515

中溝玲(Nakamizo Akira)
九州大学大学院・医学研究院・研究員
研究者番号: 80529800

天野敏之(Amano Toshiyuki)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号: 70448413

(3)連携研究者 なし