

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350514

研究課題名(和文) アフェレシス療法でのcirculating microRNA除去と治療応用の研究

研究課題名(英文) The study of circulating microRNA removal using apheresis

研究代表者

草生 真規雄 (KUSAOI, Makio)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：80534916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：microRNAはmRNAの翻訳阻害により、発生、分化、細胞増殖、遊走、細胞死に関与する生命活動に重要な遺伝子産物である。全身性エリテマトーデス患者を対象に、マイクロアレイチップを用いたアフェレシスにより血中に存在するcirculating microRNAの減量、除去が可能であるのか検討を行った。その結果、Circulating microRNAは血漿分離膜により分離された血漿中に移行可能であることを世界で初めて示すことができた。また、その移行割合は一定ではなく、エクソソームやマイクロパーティクルといった血中でのmicroRNAの担体の大きさに左右される可能性があることが推測された。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs are important inhibitors of mRNA translation, participate in differentiation, migration, cell proliferation, and cell death. We examined whether the removal or reduction of circulating miRNAs with apheresis for systemic lupus erythematosus patients using a microRNA array chip. We present the first report that circulating miRNAs in peripheral blood can be separated and possibly directly removed using membrane separation apheresis. Furthermore, it was presumed that the separation rate of microRNAs may depend on the size of microRNAs carrier in the peripheral blood such as exosomes and microparticles.

研究分野：血液浄化療法

キーワード：microRNA circulating microRNA アフェレシス 全身性エリテマトーデス 血漿吸着療法 血漿交換療法

1. 研究開始当初の背景

microRNA は mRNA の翻訳阻害により、発生、分化、細胞増殖、遊走、細胞死に関与するという点で重要であり、核酸創薬のターゲットとして現在に至るまで研究が飛躍的に進展している。その発現分布は組織、疾患特異的であり、例えば代表的な慢性炎症性疾患である関節リウマチにおいては INF パスウェイや TNF などの制御因子とされる miR-146a をはじめ、慢性炎症にとって増悪的な因子と考えられ破骨細胞との関連も指摘されている miR-155 など、多数の体内発現変化が報告されている。加えて、細胞膜から放出されるエクソソーム中に含有されたり、蛋白質や脂質との複合体の状態となったりと、比較的安定した状態で末梢血を循環する circulating microRNA が存在しており、他の細胞に取り込まれることで、蛋白合成・翻訳をコントロールするという細胞間蛋白合成の連携現象の可能性が報告されており、注目を集めていた。これは、circulating microRNA が各種疾患、病態形成をはじめ生理的恒常性発現に影響している可能性が高いことを示している。

当研究が始まった当初、microRNA の治療的利用は様々な研究機関により検討されていたが、疾患に対し抑制的に働く microRNA を体外から投与するか、増悪的に作用する生体内 microRNA を、合成したアンチセンス miRNA を投与する事でブロックするという手段が想定されていた。しかし安定性の低さや、目標への薬物送達の方法などについてはいまままだ多くの課題が残されている。

アフエレスとは体外循環によって全血液からリンパ球、顆粒球などの細胞成分と血漿成分を分離し、さらに血漿成分から抗体、炎症性サイトカイン、代謝物質、中毒物質などの病態因子を除去する治療法を指す。病態物質を含む液性因子を直接減少させたり、活性化された血球細胞を除去したりすることで免疫能の修飾、賦活、細胞機能の回復など病態の改善効果を得ることのできる副作用の少ない治療として、特に難治性疾患に対し有用な医療技術である。

アフエレスには遠心分離法と膜分離法があるが、現在本邦では医工学技術の進歩により膜分離によるアフエレスが一般的である。アフエレス治療種には、分離した血漿中の病態関連因子を廃棄し、新鮮凍結血漿やアルブミン加乳酸リンゲルなどと置換を行う単純血漿交換療法をはじめ、血漿をさらに膜型血漿分画器を用いて濾過する二重膜濾過法、吸着剤やリガンドで標的物質のみを除去する血漿吸着療法、血球細胞を除去する血球成分除去療法がある。

Circulating microRNA はエクソソームと結合して存在している場合、その大きさは 40 ~ 100nm ほどである。また、

Argonaute (Ago) 2 (分子量約 96kDa) などの蛋白に結合して存在している場合はそれよりも大きな分子量である可能性がある。アフエレス同様、血液浄化療法の一つである血液透析では、末梢血の circulating microRNA を除去することはできないと報告されているが、これは透析膜の特性である低分子の特異的な除去によるとされる。一方アフエレスでは膜孔径の組み合わせやリガンド、吸着剤の特徴を使い分けることにより、狙った分子量の複合体や抗体を除去することが可能であり、これにより circulating microRNA を効率的に除去できると期待できる。慢性炎症性疾患などの病的状態においては、末梢血液中の circulating microRNA による細胞間相互作用が病態形成の一因となっている可能性は高く、これを選択的に、効率的に除去できれば病態の改善に資することができると考えられた。

血中に存在する microRNA 自体を直接除去することで病態を改善しようという試みは、まだ世界をみわたしても報告がなかった。そこで本研究ではアフエレスによる circulating microRNA の除去・減量、ひいては病態改善の可能性に着目した。これにより本邦が中心である膜分離型アフエレスを、これまでに無い新しい機序を持つ病因除去治療法として、世界に医療技術を発信できる可能性があった。

2. 研究の目的

膜分離型アフエレスが circulating microRNA を選択的、効率的に除去可能であることを示し、さらに改善を加えることで慢性炎症性疾患等の病態改善に資する手段として確立し、世界に発信するとともに臨床応用することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 血漿分離膜通過前後での circulating microRNA 発現変化検討

当大学医学部倫理委員会での承認を経た上で、当院にてアフエレスを施行している全身性エリテマトーデス患者 5 名について書面にて同意を得られた方のアフエレス療法で用いた血漿分離膜 (旭化成メディカル社 プラズマフロー OP-05W) での血液、分離した血漿からのサンプル採取を行った (図 1)。

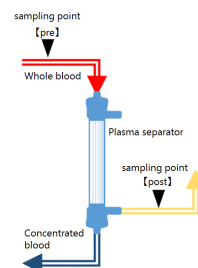


図 1 サンプル採取ポイント

microRNA 抽出キット(3D-Gene RNA extraction reagent from liquid sample (東レ株式会社))を用いて説明書に沿って microRNA を抽出。抽出した RNA は 3D-Gene miRNA labeling kit (東レ株式会社)を用いて標識がなされた。標識された RNA は 3D-Gene Human miRNA Oligo chips (東レ株式会社)上で混成化された。こうして 2567 項目の microRNA について、マイクロアレイチップデバイスで網羅的に発現解析を行った。

(2) 分離血漿中に含有される circulating microRNA の血漿吸着膜の通過による発現変化の検討

次に当院にてアフエレスス(血漿吸着療法)を施行している全身性エリテマトーデス患者3名において、血漿分離膜で分離処理された血漿中に含有されている circulating microRNA が、分離血漿ごと血漿吸着膜に入った後にどのようにその発現が変化するのかについて検討を行った。書面にて同意を得られた血漿吸着療法を施行している全身性エリテマトーデス患者3名について、血漿分離膜により分離された後の血漿がさらに血漿吸着膜に入る直前、直後で検体を採取(図2)。microRNA 抽出キット(3D-Gene RNA extraction reagent from liquid sample (東レ株式会社))を用いて説明書に沿って microRNA を抽出したのち、3D-Gene miRNA labeling kit (東レ株式会社)を用いて標識を行った。標識された RNA は 3D-Gene Human miRNA Oligo chips (東レ株式会社)上で混成化され、2567 項目の microRNA について、マイクロアレイチップデバイスで網羅的に発現解析を行った。

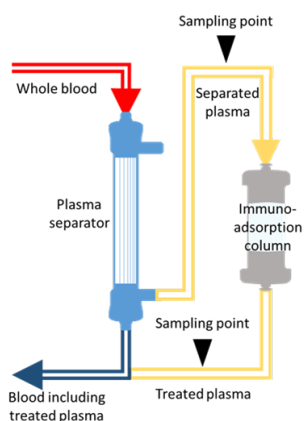


図2 サンプル採取ポイント

4. 研究成果

(1) まずアフエレススを施行した全身性エリテマトーデス患者について、血漿分離器前後での circulating microRNA 発現変化の検討を行った。当院にてアフエレスス

を施行している全身性エリテマトーデス患者計5名について、血漿分離膜(旭化成メディカル社 プラズマフローOP-05W)前後での血液、分離した血漿からのサンプルを採取。治療膜前後の末梢血液サンプルは遠心分離により血漿化し、それぞれから前述のとおり circulating microRNA を抽出した。そのうえでマイクロアレイチップにて網羅的に発現解析を行った。

5名の全身性エリテマトーデス患者検体すべてにおいて、その末梢血から circulating microRNA と考えられる約500種類もの数多くの microRNA 発現を認めた。これらの中には、circulating microRNA であると全身性エリテマトーデス患者において既に報告がなされているもの(例:let-7b, miR-16, miR-223, miR-451, miR-1246 など)が含まれている一方で、未だ循環末梢血においてその発現が circulating microRNA として報告がなされていなかったものも多数存在していた。

さらに、アフエレススで用いた血漿分離膜により分離された血漿中にも多数の circulating microRNA が発現していることを確認した。循環血漿中に含まれている circulating microRNA と考えられる microRNA の大多数が、膜分離型アフエレススにより分離された血漿にも含まれていた。今回の研究で見出された全ての circulating microRNA のマイクロアレイ解析データは NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)にて公表がなされている(accession number GSE76241)。この研究により膜分離法アフエレススにより circulating microRNA が末梢血から分離され、直接除去できる可能性があることを世界で初めて示すことができたと考えている。

加えて、新たな知見も見出すことが出来た。上述のように血漿分離膜により分離された血漿中にも多数の circulating microRNA 発現が検出されたが、マイクロアレイデータの発現シグナルによる推測されるその分離割合は決して一様ではなく、ほぼ分離血漿内にそのまま移行しているものと、分離血漿内には存在しているもののその移行割合が50%以下であるものといったように、microRNA の種類により分離血漿への移行割合が様々であることが推測された。中には移行割合が10%以下であると推測されるものもあった。これらの microRNA 種による移行割合の違いは、各全身性エリテマトーデス患者において共通の傾向を認めていた。血漿分離膜として用いたプラズマフロー®OP-05W(旭化成メディカル株式会社)の膜孔径は300nmほどであり、microRNA が末梢血液中において Ago2 や HDL などの蛋白に結合して存在している場合や、40-100nm の大きさである

エクソソームに含有されて存在している場合は血漿分離膜を容易に通過して末梢血液中から分離血漿中にほぼ移行することが予想される。一方、エクソソームと同様に細胞外小胞の一つであるマイクロパーティクルは100-1000nmほどの大きさを持つことが知られており、そこに含有される circulating microRNA の一部は孔径300nmの膜の通過効率が低下している可能性が示唆された。全身性エリテマトーデス患者においてマイクロパーティクルに特異的に含有されるような circulating microRNA が存在しているのかということや、circulating microRNA の担体によりある程度その除去率に選択性を持たせることが可能なのかということについては今後の検討が必要であるが、これまで報告がなされていなかったような現象が明らかとなったと考えている。

(2) さらに、分離された血漿がアフエリシスで用いる血漿吸着膜や血漿分画器といった、いわゆる二次膜として用いられる治療膜においてどのように吸着がなされているのかについて検討を行った。血漿吸着療法を施行されている全身性エリテマトーデス患者3名において、分離後血漿がさらに血漿吸着膜に入る直前、直前で前述のとおり検体を採取した。その後マニュアルに従い circulating microRNA を抽出。microRNA アレイチップにて網羅的に発現解析を行った。すべての患者において血漿吸着膜通過後に miR-128-2-5p、miR-1246、miR-4532、miR-4649-5p、miR-4732-5p、miR-6885-5p、miR-6088 の著明な発現低下を認めていた。これらの microRNA については、血漿吸着膜により遺伝子産物が担体ごと吸着されている可能性が示唆される。一方で、血漿中に数多く認められているほとんどの microRNA については血漿吸着膜通過後もそのマイクロアレイ上でのシグナル発現値は概ね変化を認めなかった。

血漿吸着器のセレソープ®(カネカメディックス株式会社：図3)はデキストラン硫酸をリガンドとして用い、静電的相互作用により陽性荷電の抗カルジオリピン抗体、抗DNA抗体、免疫複合体を吸着する。一方、イムソーバ®(旭化成メディカル株式会社：図3)はフェニルアラニンなどのリガンドを用い、疎水的相互作用(と一部静電的作用)により抗DNA抗体、免疫複合体、リウマトイド因子を効率よく吸着する。

Circulating miRNA を“cargo(貨物)”として末梢血液を循環しているエクソソームやマイクロパーティクルといった細胞外小胞は膜表面分子などの多様性から様々な極性を持つと考えられるが、その構成成分であるリン脂質などの影響で一般的には陰性荷電していると考えられており、今回の検討のように多くの microRNA の発現が

不変であったのは主にこの荷電と吸着特性の影響があるのかもしれない。



図3 セレソープ®、イムソーバ®の模式図

今回の検討で減少が指摘された miRNA が血漿中において何を担体としているのかは明らかではないが、その程度は担体の種類により大きく異なる可能性がある。全身性エリテマトーデス患者における血漿吸着療法の治療効果とこれらの microRNA の発現が減少したこととの関連は不明である。また、miRBase (www.mirbase.org/)、miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>)、miRandola (<http://mirandola.iit.cnr.it/>)、microRNA.org (www.microRNA.org/)といった各種データベースを参照したが、これらの病態に対する明確な機能も不明であった。担体により吸着効率が異なっている可能性を世界で初めて見出すことが出来た。

これらの成果については後述の関連学会の国際雑誌に投稿したり、複数の学会大会で講演を行ったりすることで広く世間に発信することが出来た。

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1件)

Kusaoi M, Yamaji K, Tamura N, et al, Separation of Circulating MicroRNAs Using Apheresis in Patients With Systemic Lupus Erythematosus, Ther Apher Dial. 査読有、20 巻 4 号、2016、348-53. doi: 10.1111/1744-9987.12471.

[学会発表](計6件)

草生 真規雄、山路 健 他、末梢血 circulating microRNA は血漿交換療法一次膜により血漿中から分離される、第36回日本アフエリシス学会学術大会、2015年、川越プリンスホテル、埼玉県川越市

草生 真規雄、山路 健 他、全身性エリテマトーデス患者5名の circulating microRNA プロファイルとその血漿交換療法による膜分離除去の

可否、第60回日本リウマチ学会総会・学術集会、2016年、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

草生 真規雄、山路 健 他、アフェレシスで分離される circulating microRNA はその分離割合に偏りが生じる可能性がある、日本医工学治療学会第33回学術大会、2017年、くにびきメッセ、島根県松江市

草生 真規雄、山路 健 他、全身性エリテマトーデス患者から分離された血漿中 circulating microRNA 発現の血漿吸着膜を通過することによる変化、第61回 日本リウマチ学会総会・学術集会、2017年、福岡国際会議場、福岡県福岡市

Kusaoi M, Yamaji K, Tamura N.、Separation of Circulating MicroRNAs Using Apheresis in Patients With Systemic Lupus Erythematosus.、The 11th ISFA congress、2017年、Tivoli Hotel、Denmark Copenhagen

6. 研究組織

(1) 研究代表者

草生 真規雄 (KUSAOI, Makio)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：80534916

(2) 連携研究者

山路 健 (YAMAJI, Ken)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：30327853