

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462110

研究課題名(和文) 遠隔臓器虚血プレコンディショニングによる脊髄虚血耐性効果の臨床的検討

研究課題名(英文) Clinical study on the protective effect of ischemic preconditioning against spinal cord injury

研究代表者

高橋 雅弥 (TAKAHASHI, Masaya)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60634730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウスに対する虚血プレコンディショニングが施行されて24時間後の血液中のエクソソームに含有されているmicroRNAの発現レベルの変化が網羅的に解析された。胸部ステントグラフト内挿術を受ける患者に対して、術前に虚血プレコンディショニングが施行された患者と施行されなかった患者の術前と術後24時間におけるエクソソームに含有されているmicroRNAが網羅的に解析された。血管新生に關与するANGPT1を抑制することが報告されているmicroRNAは虚血プレコンディショニングが施行された患者で発現が下がっていることが観察された。

研究成果の概要(英文)：GDF15 is known as one of ischemia-reperfusion protective factors. The GDF15 expression level in CD34-positive bone marrow cells was higher compared to CD34-negative bone marrow cells and PBMC in C57BL/6 mice. Ischemic preconditioning was performed in abdominal aorta of mice. MicroRNAs was extracted from plasma exosomes at 24 hour after IPC. MicroRNA microarray analyses were performed using miRNA Oligo chip. IPC was performed for patients undergoing thoracic stent graft. MicroRNAs was extracted from serum exosomes before surgery and at 24 hour after IPC. MicroRNA microarray analyses were performed using miRNA Oligo chip. Expression level of one microRNA targeting ANGPT1 was downregulated in IPC treated patients undergoing thoracic stent graft.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：虚血プレコンディショニング 脊髄虚血保護

1. 研究開始当初の背景

胸部大動脈病変に対する治療法として、従来の手術法(人工血管置換術)とステントグラフト内挿術がある。これらの治療法は確立された方法であるが、重篤な合併症として脊髄梗塞による対麻痺が一定の確率(人工血管置換術:10~15%、ステントグラフト内挿術:2~3%)で発生し、患者のQOLおよび予後に影響を与えてしまう(J Thorac Cardiovasc Surg. 2003;126:1288-94、J Vasc Surg. 2007;46:1103-1110; discussion 1110-1、Circulation. 2008;118:808-17)。

これまでに、短時間の虚血を繰り返し行う(ischemic preconditioning: IPC)ことにより、虚血に対する抵抗性を獲得するという報告があり、虚血性心疾患に対する冠動脈病変に対する治療施行時に応用されている(J Am Coll Cardiol. 2009;53:1814-22、Lancet. 2010;375:727-34、Circ Cardiovasc Imaging. 2010;3:656-62)。

2. 研究の目的

IPCが虚血再灌流障害に対して有する臓器保護作用の機序解明の為に、エクソソームに含有されているmicroRNAの発現をマウスとヒトで解析する。

(1) マウス脊髄虚血再灌流障害モデルにおけるIPCによるエクソソームに含有されているmicroRNAの網羅的解析

(2) 胸部ステントグラフト内挿術を受ける患者におけるIPCによるエクソソームに含有されているmicroRNAの網羅的解析

3. 研究の方法

(1) マウスIPCモデル作製

イソフルラン麻酔下でC57BL/6マウスの腹部大動脈を5分間taping後に、5分間再灌流するサイクルを合計3回行った。

(2) マウスCD34陽性骨髄細胞採取・単離

マウス大腿骨から採取した骨髄細胞に対してrat抗マウスCD34抗体をon iceで後、抗rat IgGマイクロビーズ抗体を反応させて磁気カラムを使用して、骨髄細胞をCD34陰性とCD34陽性に分けた。

(3) ヒトIPCプロトコル

上腕部にcuffを巻き、5分間虚血(200 mmHgの圧)と5分間再灌流を4サイクル行う(Lancet. 2009;374:1557-65)。胸部ステントグラフト内挿術を受ける患者3名の中で、2名は術直前にIPCを実施し、1名はIPC無処置とした。術前、術後24時間に採血した。

(4) マウスエクソソーム単離

IPCをして24時間後に、EDTAで採血して遠心分離により、血漿を回収した。Total Exosome Isolation Kit (from plasma)

(Thermo Fisher SCIENTIFIC)を使用してエクソソームを単離した。

(5) ヒトエクソソーム単離

血清作製用採血管を使用して血清を回収し、Total Exosome Isolation (from serum) (Thermo Fisher SCIENTIFIC)を使用してエクソソームを単離した。

(6) microRNA単離・網羅的解析

エクソソームからTotal Exosome RNA and Protein Isolation Kit (Thermo Fisher SCIENTIFIC)を用いて単離されたmicroRNAはmiRNA Oligo chip(東レ)で解析された。

4. 研究成果

(1) CD34陽性骨髄細胞におけるGDF15発現

虚血再灌流障害に対して保護作用を有するGDF15は、ヒトCD34陽性内皮前駆細胞で発現しており(PLoS One 2011;6:e23210、NatMed 2011;17:581-588)、IPC後にCD34陽性骨髄細胞が末梢血中に動員されることから(J Am Coll Cardiol. 2009;53:1814-22)、マウスCD34陽性骨髄細胞におけるGDF15の発現を確認した。CD34陽性骨髄細胞におけるGDF15 mRNAの発現レベルは、CD34陰性骨髄細胞、骨髄、末梢血単核球より高く(図1上)、GDF15タンパクもCD34陽性骨髄細胞において高い結果であった(図1下)。

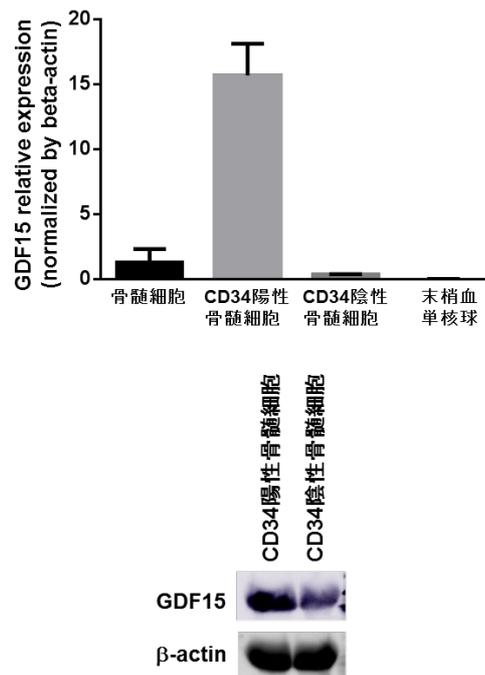


図1 CD34陽性骨髄細胞におけるGDF15発現

(2) マウスにおける IPC 後のエクソソーム中の microRNA の発現変化

IPC を 24 時間後と sham における microRNA の発現を網羅的に解析した。Table 1 は IPC により発現が 0.3 以下になった microRNA。Table 2 は IPC により発現が 2 倍以上がった microRNA。

Name	sham	IPC	fold change
mmu-miR-3067-3p	433	33	0.08
mmu-miR-6366	198	21	0.11
mmu-miR-2861	836	90	0.11
mmu-miR-711	412	53	0.13
mmu-miR-5126	1447	196	0.14
mmu-miR-3960	796	109	0.14
mmu-miR-3072-5p	281	42	0.15
mmu-miR-2137	865	135	0.16
mmu-miR-762	319	62	0.19
mmu-miR-149-3p	136	28	0.20
mmu-miR-5112	168	40	0.24
mmu-miR-6538	169	44	0.26
mmu-miR-744-5p	63	18	0.28

Name	sham	IPC	fold change
mmu-miR-875-5p	16	59	3.62
mmu-miR-98-3p	38	131	3.44
mmu-miR-126-3p	20	67	3.28
mmu-miR-670-5p	19	60	3.20
mmu-miR-411-5p	19	56	2.92
mmu-miR-344-5p	20	58	2.87
mmu-miR-3058-3p	17	44	2.62
mmu-miR-1249-5p	20	50	2.50
mmu-miR-686	19	48	2.47
mmu-miR-146a-5p	18	44	2.46
mmu-miR-488-5p	16	39	2.43
mmu-miR-3073a-5p	19	42	2.16
mmu-miR-7a-2-3p	18	39	2.16
mmu-miR-3961	20	43	2.13
mmu-miR-33-3p	17	35	2.11
mmu-miR-30b-3p	17	35	2.08
mmu-miR-652-3p	18	36	2.06
mmu-miR-125b-1-3p	16	33	2.01

(3) 胸部ステントグラフト内挿術を受ける患者に対する IPC 後のエクソソーム中の microRNA の発現変化

術前に IPC 施行して胸部ステントグラフト内挿術を受けた患者 2 名 (IPC 患者) と IPC 無処置で胸部ステントグラフト内挿術を受けた患者 1 名 (無処置患者) の術前と術後 24 時間におけるエクソソーム中の microRNA を解析した。術後 24 時間で、無処置患者と比較して IPC 患者で発現が上がった microRNA は 10 個 (Table 3)、発現が下がった microRNA は 1 個あった (Table 4)。

Table 3	Table 4
hsa-miR-106a-3p	hsa-miR-204-3p
hsa-miR-642b-3p	
hsa-miR-663a	
hsa-miR-671-5p	
hsa-miR-1233-5p	
hsa-miR-4442	
hsa-miR-4532	
hsa-miR-4687-3p	
hsa-miR-4763-3p	
hsa-miR-6503-3p	

発現が下がった microRNA である miR-204-3p は血管新生に参与する ANGPT1 を抑制することが報告されていた (Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014;55:4295-303、Sci Rep. 2016;6:34504.)。

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 34 件)

- Ueno K, Samura M, Nakamura T, Tanaka Y, Takeuchi Y, Kawamura D, Takahashi M, Hosoyama T, Morikage N, Hamano K. Increased plasma VEGF levels following ischemic preconditioning are associated with downregulation of miRNA-762 and miR-3072-5p. Sci Rep. 2016;6:36758. doi: 10.1038/srep36758. (査読有)
- Miyazaki Y, Okamura T, Fujita A, Mikamo A, Oda T, Wada Y, Yamashita A, Suzuki R, Takahashi M, Hamano K, Yano M. Coronary obstruction occurring 72h after transcatheter aortic valve replacement with a self-expandable valve. Int J Cardiol. 2016;223:1-3. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.08.132. (査読有)
- Oda T, Okamura T, Miyazaki Y, Nakamura T, Mikamo A, Wada Y, Yamashita A, Takahashi M, Hayashida K, Hamano K, Yano M. 1-Year Follow-Up of Contained Aortic Root Rupture After Transcatheter Aortic Valve Replacement. JACC Cardiovasc Interv. 2016;9:295-6. doi:10.1016/j.jcin.2015. (査読有)
- Ueno K, Takeuchi Y, Samura M, Tanaka Y, Nakamura T, Nishimoto A, Murata T, Hosoyama T, Hamano K. Treatment of refractory cutaneous ulcers with mixed sheets consisting of peripheral blood mononuclear cells and fibroblasts. Sci Rep. 2016;6:28538. doi: 10.1038/srep28538. (査読有)
- Nakamura T, Hosoyama T, Kawamura D, Takeuchi Y, Tanaka Y, Samura M, Ueno K, Nishimoto A, Kurazumi H, Suzuki R, Ito H, Sakata K, Mikamo A, Li TS, Hamano K. Influence of aging on the quantity and quality of human cardiac stem cells. Sci Rep. 2016;6:22781. doi: 10.1038/srep22781. (査読有)
- Samura M, Morikage N, Suehiro K, Tanaka Y, Nakamura T, Nishimoto A, Ueno K, Hosoyama T, Hamano K. Combinatorial Treatment with Apelin-13 Enhances the Therapeutic Efficacy of a Preconditioned

- Cell-Based Therapy for Peripheral Ischemia. *Sci Rep.* 2016;6:19379. doi: 10.1038/srep19379. (査読有)
7. Hasan AS, Luo L, Yan C, Zhang TX, Urata Y, Goto S, Mangoura SA, Abdel-Raheem MH, Zhang S, Li TS. Cardiosphere-Derived Cells Facilitate Heart Repair by Modulating M1/M2 Macrophage Polarization and Neutrophil Recruitment. *PLoS One.* 2016;11:e0165255. doi:10.1371/journal.pone.0165255. (査読有)
 8. Long J, Guo H, Cui S, Zhang H, Liu X, Li D, Han Z, Xi L, Kou W, Xu J, Li TS, Ding Y. IL-35 expression in hepatocellular carcinoma cells is associated with tumor progression. *Oncotarget.* 2016;7:45678-45686. doi: 10.18632/oncotarget.10141. (査読有)
 9. Zhang S, Li TS, Soyama A, Tanaka T, Yan C, Sakai Y, Hidaka M, Kinoshita A, Natsuda K, Fujii M, Kugiyama T, Baimakhanov Z, Kuroki T, Gu W, Eguchi S. Up-regulated extracellular matrix components and inflammatory chemokines may impair the regeneration of cholestatic liver. *Sci Rep.* 2016;6:26540. doi: 10.1038/srep26540. (査読有)
 10. Doi H, Kitajima Y, Luo L, Yan C, Tateishi S, Ono Y, Urata Y, Goto S, Mori R, Masuzaki H, Shimokawa I, Hirano A, Li TS. Potency of umbilical cord blood- and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for scarless wound healing. *Sci Rep.* 2016;6:18844. doi: 10.1038/srep18844. (査読有)
 11. Seko D, Ogawa S, Li TS, Taimura A, Ono Y. μ -Crystallin controls muscle function through thyroid hormone action. *FASEB J.* 2016;30:1733-40. doi: 10.1096/fj.15-280933. (査読有)
 12. Hosoyama T, Samura M, Kudo T, Nishimoto A, Ueno K, Murata T, Ohama T, Sato K, Mikamo A, Yoshimura K, Li TS, Hamano K. Cardiosphere-derived cell sheet primed with hypoxia improves left ventricular function of chronically infarcted heart. *Am J Transl Res.* 2015;7(12):2738-51. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4731671/>(査読有)
 13. Kugimiya N, Nishimoto A, Hosoyama T, Ueno K, Enoki T, Li TS, Hamano K. The c-MYC-ABCB5 axis plays a pivotal role in 5-fluorouracil resistance in human colon cancer cells. *J Cell Mol Med.* 2015;19:1569-81. doi:10.1111/jcmm.12531. (査読有)
 14. Kitajima Y, Doi H, Ono Y, Urata Y, Goto S, Kitajima M, Miura K, Li TS, Masuzaki H. Estrogen deficiency heterogeneously affects tissue specific stem cells in mice. *Sci Rep.* 2015;5:12861. doi: 10.1038/srep12861. (査読有)
 15. Ono Y, Urata Y, Goto S, Nakagawa S, Humbert PO, Li TS, Zammit PS. Muscle stem cell fate is controlled by the cell-polarity protein Scrib. *Cell Rep.* 2015;10:1135-48. doi:10.1016/j.celrep.2015.01.045. (査読有)
 16. Guo CY, Luo L, Urata Y, Goto S, Huang WJ, Takamura S, Hayashi F, Doi H, Kitajima Y, Ono Y, Ogi T, Li TS. Sensitivity and dose dependency of radiation-induced injury in hematopoietic stem/progenitor cells in mice. *Sci Rep.* 2015;5:8055. doi: 10.1038/srep08055. (査読有)
 17. Tanaka T, Li TS, Urata Y, Goto S, Ono Y, Kawakatsu M, Matsushima H, Hirabaru M, Adachi T, Kitasato A, Takatsuki M, Kuroki T, Eguchi S. Increased expression of PHD3 represses the HIF-1 signaling pathway and contributes to poor neovascularization in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Gastroenterol.* 2015;50:975-83. doi: 10.1007/s00535-014-1030-3. (査読有)
 18. Tanaka Y, Mikamo A, Suzuki R, Kurazumi H, Kudo T, Takahashi M, Ikenaga S, Shirasawa B, Hamano K. Mortality and morbidity after total aortic arch replacement. *Ann Thorac Surg.* 2014;97:1569-75. doi:10.1016/j.athoracsur.2014.01.014. (査読有)
 19. Ali H, Galal O, Urata Y, Goto S, Guo CY, Luo L, Abdelrahim E, Ono Y, Mostafa E, Li TS. The potential benefits of nicaraven to protect against radiation-induced injury in hematopoietic stem/progenitor cells with relative low dose exposures. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;452:548-53. doi:10.1016/j.bbrc.2014.08.112. (査読有)
 20. Luo L, Kawakatsu M, Guo CW, Urata Y, Huang WJ, Ali H, Doi H, Kitajima Y, Tanaka T, Goto S, Ono Y, Xin HB, Hamano K, Li TS. Effects of antioxidants on the quality and genomic stability of induced pluripotent stem cells. *Sci Rep.* 2014;4:3779. doi:10.1038/srep03779. (査読有)

1. 藤田 陽、美甘章仁、池 創一、鈴木 亮、高橋雅弥、白澤文吾、濱野公一、急性 A 型大動脈解離弓部全置換術における intimal protected adventitial inversion technique、第 6 9 回日本胸部外科学会定期学術集会、2016.9.28-10.1、岡山コンベンションセンター（岡山県岡山市）
2. 上野耕司、佐村 誠、中村玉美、田中裕也、竹内由利子、河村大智、高橋雅弥、細山 徹、森景則保、濱野公一、虚血プレコンディショニング後の VEGF の増加は miRNA-762 と miR-3072-5p の発現低下と関連する、第 8 回日本 RNAi 研究会、2016.8.31-9.2、グランドプリンスホテル広島（広島県広島市）
3. 中村玉美、藤田 陽、佐村 誠、上田晃志郎、山下 修、鈴木 亮、高橋雅弥、森景則保、美甘章仁、濱野公一、広範囲胸部大動脈瘤に対する long elephant trunk を用いた staged TEVAR completion、第 4 4 回日本血管外科学会学術総会、2016.5.25-27、ホテル グランパシフィック LE DAIBA（東京都港区）
4. 高橋雅弥、美甘章仁、松野祐太郎、藤田陽、中村玉美、鈴木 亮、白澤文吾、濱野公一、分節遮断冷却血液注入と選択的肋間動脈灌流による術中脊髄保護法、第 4 6 回日本心臓血管外科学会学術総会、2016.2.15-17、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）
5. 高橋雅弥、中島正夫、岩本圭亮、藤田 陽、鈴木 亮、白澤文吾、美甘章仁、濱野公一、前壁心筋梗塞後巨大心室瘤の 1 手術例、第 3 0 回心臓血管外科ウィンターセミナー学術集会、2016.1.24-26、ホテル双葉（新潟県南魚沼郡）
6. 美甘章仁、藤田 陽、中村玉美、藏澄宏之、鈴木 亮、高橋雅弥、白澤文吾、濱野公一、胸部下行/胸腹部大動脈瘤の外科治療成績 脊髄循環血液量維持と Critical 肋間動脈同定再建、第 6 8 回日本胸部外科学会定期学術集会、2015.10.17-20、神戸ポートピアホテル（兵庫県神戸市）
7. 高橋雅弥、小林 峻、工藤智明、藏澄宏之、白澤文吾、美甘章仁、濱野公一、遠隔成績からみた透析症例に対する冠動脈バイパスグラフトの選択、第 4 5 回日本心臓血管外科学会学術総会、2015.2.16-18、国立京都国際会館（京都府京都市）
8. 高橋雅弥、小林 峻、工藤智明、藏澄宏之、白澤文吾、美甘章仁、濱野公一、自己心膜による弁尖腱索一括形成が有効であった tethering による僧帽弁閉鎖不全症の一例、第 2 9 回心臓血管外科ウィンターセミナー学術集会、2015.1.28-30、ヒルトンニセコビレッジ（北海道虻田郡）

9. 藏澄宏之、美甘章仁、小林 峻、工藤智明、鈴木 亮、高橋雅弥、白澤文吾、濱野公一、胸腹部大動脈病変を含む広範囲大動脈瘤に対する外科治療、第 6 7 回日本胸部外科学会定期学術集会、2014.9.30-10.3、福岡国際会議場・福岡サンパレスホテル&ホール（福岡県福岡市）
10. 高橋雅弥、小林 峻、工藤智明、藏澄宏之、鈴木 亮、白澤文吾、美甘章仁、濱野公一、主要合併症からみた弓部全置換術の長期予後、第 6 7 回日本胸部外科学会定期学術集会、2014.9.30-10.3、福岡国際会議場・福岡サンパレスホテル&ホール（福岡県福岡市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 雅弥 (TAKAHASHI, Masaya)
 山口大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：6 0 6 3 4 7 3 0

(2) 研究分担者

細山 徹 (HOSOYMA, Tohru)
 山口大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：2 0 6 3 8 8 0 3

李 桃生 (LI, Tao-sheng)
 長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授
 研究者番号：5 0 3 7 9 9 9 7

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし