

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462370

研究課題名(和文) 周術期抗血小板薬薬効モニタリングのための血小板由来microRNA発現解析の検討

研究課題名(英文) The efficacy of using microRNAs in platelets as a method of platelet function monitoring based on next-generation sequencing

研究代表者

中山 力恒 (Yoshinobu, Nakayama)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90568198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：現在、患者予後と明らかな関連があると報告が認められる血小板機能モニタリングは、ごく僅かである。今回、我々は、周術期抗血小板薬効モニタリングのために有用な血小板由来microRNA明らかにするために研究を行った。まず、第一段階として、薬物及びびり応力を用いた血小板刺激を行い、最も鋭敏に反応するmicroRNAを同定することを行った。実際には、刺激前後の血小板由来microRNAを次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析した。その結果、mir-155を含むいくつかのmicroRNAに有意差を認めており、実際に抗血小板薬を用いた次の研究段階に移る予定である。

研究成果の概要(英文)：Currently, platelet function monitoring in the perioperative field has very limited clinical relevance. The present study was aimed to investigate the efficacy of using microRNAs in platelets as a method of platelet function monitoring. In the first step, we stimulated platelets with drugs and the application of shear stress, and compared the microRNA expressions in platelets between pre- and post-stimulation using next-generation sequencing technology. Comprehensive analyses by next-generation sequencing identified several microRNAs (including mir-155) exhibiting significant expression changes. Focusing on the microRNAs showing significant changes in the first step, we will perform the next step using antiplatelet agents.

研究分野：周術期学

キーワード：血小板 microRNA

## 1. 研究開始当初の背景

血小板機能をモニタリングする装置は、非生理的高濃度の試薬や生体内とは異なったり応力を用いて血小板凝集を惹起し、測定に利用するもの (HEMA TRACER® や VerifyNow®) が主流であり、患者予後と明らかな関連があると報告が認められるものは、ごく僅かであるのが現状である。

(JAMA. 2010; 303: 754-762., Platelets. 2013;24(5):352-61.)

また、周術期に関しても術後血栓塞栓症の一因である手術侵襲等に伴う血小板機能亢進や、心臓血管手術時の人工心肺回路接触等に起因する血小板機能変化を既存のモニタリング装置で正確に反映できるとは言い難い。近年、miRNAをはじめとする低分子の機能性 RNA が注目を集めている。特に 21-24 塩基から構成される miRNA は発生期の形態形成、細胞分化、アポトーシスなどの細胞の高次機能発現の調節に重要な役割を果たすことが知られている。過去の研究では、細胞内の miRNA が解析の主な対象であったが、最新の知見では血中に分泌される miRNA に注目が集まり、悪性腫瘍だけでなくリウマチなどの炎症性疾患のバイオマーカーになり得るとして報告されている。

(Expert Rev Mol Diagn. 2013;13:183-204., Int J Oncol. 2012;41:1897-91.)

血小板に関する miRNA では、マイクロアレイ・スクリーニングにより、miRNA-126, -197, -223, -24, -21 が血小板や血小板から放出される微小な膜小胞体であるマイクロパーティクルに高く発現していることが判明し、それらの血漿中濃度が血中に放出されたマイクロパーティクル量に関係することが示されている。これらの結果から、血小板の活性化に miRNA が関与している可能性が示唆

されている。(Circ Res. 2010; 107: 810-817., J Am Coll Cardiol. 2012; 60: 290-299.)

今回、我々は、血小板機能を抗血小板薬で抑制し、特定の miRNA に変化が認められれば、それらの miRNA が抗血小板薬の薬効に対するサロゲート(代用)マーカーになり得ると考えている。我々の予備実験 (In vitro) では、アスピリンを 5 段階の様々な濃度となるように多血小板血漿を調整し、上記の miRNA-126, -197, -223 をマイクロアレイ法にて計測したところ、それらの miRNA が段階的に抑制されるという結果が得られた。

## 2. 研究の目的

- 1) 高速次世代シーケンサで網羅的解析を行い、抗血小板薬に対して最も鋭敏な血漿中の血小板由来の miRNA を同定する。
- 2) 最も臨床的な使用頻度が高く、エビデンスが蓄積されているアスピリンおよび P2Y<sub>12</sub> 阻害薬の投与量を段階的に変化させて投与された健常人について、miRNA と既存の複数の血小板機能モニタリングを経日的に計測し、血小板機能(抑制)に対する鋭敏性を比較する。
- 3) 周術期患者を抗血小板薬継続群と休薬群に分類し、miRNA と既存のモニタリングの血小板機能変化に対する鋭敏性だけでなく、臨床アウトカムへの関連性についても前向きに比較する。

## 3. 研究の方法

1. 採取した健常人の血液から、血小板、マイクロパーティクル、血漿、多血小板血漿、乏血小板血漿のサンプルを作成し、各サンプルにおける miRNA の発現を網羅的に解析する。そして、血小板に対して

最も鋭敏な miRNA を同定する。

2. アスピリンおよび P2Y<sub>12</sub> 阻害薬の投与量を段階的に変化させて投与した健康人について、miRNA と既存の複数の血小板機能モニタリングを経日的に計測し、どちらが血小板機能(抑制)をより鋭敏に反映するかを比較する。
3. 周術期患者を抗血小板薬継続群と休薬群に分類する。両群の miRNA と既存の複数の血小板機能モニタリングを経日的に計測し、休薬による血小板機能変化をより鋭敏に反映するものを同定する。また、休薬による血小板機能変化と臨床エンドポイントの関連性についても解析を行う。

#### Step 1

1. 健康成人(約 N=10)の全血検体に血小板刺激前後のサンプル作成  
クエン酸採血後、薬物(ADP, Thrombin) またはズリ応力(Viscometer CAP2000 装置)を負荷することで血小板刺激を行う。負荷前後の全血検体を、遠心操作にて多血小板血漿作成後、洗浄血小板溶液の作成。また乏血小板血漿を作成後、超遠心(16000g for 90min)にて、マイクロパーティクルペレットを作成する。最終的に洗浄血小板溶液、マイクロパーティクル、血漿、多血小板血漿、乏血小板血漿のサンプルを作成する。
2. miRNA の分離・濃縮  
上記の5つのサンプルについて、miRNA の分離と濃縮を、RNeasy Plus Mini Kit and RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) 等を用い、抽出する。
3. miRNA 発現の網羅的解析  
得られた5つのサンプルに対して、miRNA

発現の絶対的定量評価が可能で、従来のマイクロアレイより優れた Ion PGM システム (次世代シーケンサ, Life Technology 社)を用いて、次のような手順で網羅的解析を施行する。

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

cDNA に変換 逆転写酵素を用いる。  
ビース調整(4時間) エマルジョン PCR 法を用いて、cDNA を増幅  
シーケンシング(3時間) シーケンサによる miRNA 発現定量  
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。

3 の結果から、血小板活性化を最も鋭敏に反映する血漿中の miRNA を複数同定する。

#### step 2

40歳以下の健康成人(男性) 最大10名に対して、アスピリンおよび P2Y<sub>12</sub> 受容体阻害薬を漸増的に投与し、Day 0, 7, 14, 21 のサンプルポイントにおいて、前年度の結果から得られた特定の miRNA を中心とする miRNA 群を TaqMan quantitative polymerase chain reaction (Taqman qPCR 法) で測定する。投与量は、過去の文献の報告を基に、治療域と安全性を考慮の上、決定した。

(Platelets. 2013;24:615-24., Am J Cardiol. 2006;98:681-4., Chest. 2013;doi:10.1378, chest.13-0459., 等)

同様のサンプルポイントで、miRNA 変化と既存の血小板機能モニタリングのどちらがより鋭敏に血小板機能を反映するかを比較する。

P2Y<sub>12</sub> 受容体阻害薬に関しては、クロピドグレルが日本人に多いチトクローム P450 遺伝子

多型の影響を受け、薬効にばらつきが存在する可能性があるため、本邦で使用可能となった、チトクローム P450 遺伝子多型の影響がわずかで薬効にばらつきが少ない、プラスゲレルも追加予定である。既存の血小板機能モニタリング装置については、現在、日本で最も一般的な透過光法 (HEMA TRACER®)、欧米で使用頻度の高い VerifyNow® および Multiplate®、さらには日本で開発段階にあり、生体内の状態により近い血小板機能モニタリングとされている T-TAS® (Total Thrombus Formation Analyzing System) を比較対象として予定した。

### step 3

アスピリン及びクロピドグレルが術前投与されている周術期患者 12 名を全休薬群、クロピドグレルのみ休薬群、全続薬群に分類する。そして、経目的に miRNA 及び既存の血小板機能モニタリング装置で血小板機能を計測し、休薬による血小板機能変化をより鋭敏に反映するものを同定する。また、休薬による血小板機能変化と臨床エンドポイントの関連性についても解析を行う予定とした。

### 統計学的解析

miRNA の発現解析は Empirical digital gene expression 法を用いて行った。CLC Genomic Workbench version 8.5.1 (Qiagen, Venlo, The Netherlands) をソフトウェアとして使用した。

### 4. 研究成果

研究は予想していた速度を大幅に下回った。

その理由としては、大きく 2 つ挙げられる。

1) cDNA 作成過程が安定しない。

miRNA 抽出の過程で、バイオアナライザーで miRNA が抽出されていることは確認できるものの、cDNA を作成し、シーケンスに持ち込むのに十分な収量に到達しない検体が多かった。また、行程を進めても、それらの検体は cDNA の過程では primer dimer を生じやすかった。

特に、血小板刺激後に多く、刺激によって血小板自体を loss してしまっていることが大きな要因と考えられたため、刺激強度の調整に時間を要した。また、同様の刺激強度でも個体差があり、ドロップアウト例も存在した。

2) テンプレート調整・エマルジョン PCR の過程が安定しない。

Ion touch 2 及び、Ion touch ES を使用した、テンプレート調整・エマルジョン PCR の過程が煩雑であり、安定しなかった。また、Ion 318 chip へのローディングも簡単ではなく、ローディング率が低いケースもあった。しかし、二年次より、Auto でそれらの過程を行うことが可能な Ion Chef system を導入したため、この過程に関しては、大幅な改善を認めた。

以上のことから、現段階で step 1 がほぼ終了した段階である。miRNA-155 を含むいくつかの miRNA に有意差を認めている。今後、step2 を行うための準備を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕該当なし

〔学会発表〕該当なし

〔図書〕該当なし

〔産業財産権〕該当なし

〔その他〕該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 力恒 (Yoshinobu Nakayama)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号: 90568198

(2) 研究分担者

佐和 貞治 (Teiji Sawa)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号: 10206013

溝部 俊樹 (Toshiki Mizobe)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号: 50239266

小川 覚 (Satoru Ogawa)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号: 50636131

中嶋 康文 (Nakajima Yasufumi)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号: 70326239

(3) 連携研究者 該当なし

(4) 研究協力者 該当なし