

平成30年6月18日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462761

研究課題名(和文)人工心肺手術周術期の血小板由来microRNAによる炎症惹起作用機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of inflammatory mechanisms by platelet-derived microRNA after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass

研究代表者

中嶋 康文 (NAKAJIMA, Yasufumi)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：70326239

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)：人工心肺下心臓手術後の血小板機能低下の機序は、未だ解明の余地がある。無核細胞の血小板にも、種々の刺激で、有核細胞同様にアポトーシスが誘導される。人工心肺下手術周術期に起きる血小板機能障害の原因として、アポトーシスに関連する細胞内情報伝達系が関与している可能性があるとの仮説で実験を行った。血小板は、また、転写、翻訳機能を有し、RNAを含有している。本研究において、幾つかのmicroRNAが周術期に変化し、その結果、ターゲットとなるmRNAとタンパク質が低下することで、血小板の機能低下をもたらすとの仮説の元、実験を行った。手法として、次世代シーケンサーでmicroRNAの変化を網羅的に解析した。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of platelet dysfunction after cardiopulmonary bypass (CPB) is largely unknown. We therefore evaluated time-dependent changes in blood intra-platelet Bax (a pro-apoptotic molecule) concentrations and platelet dysfunction. Platelets were found to contain abundant RNAs, including miRNAs, and mRNA splicing machinery, and exhibit a protein synthesis function. We hypothesized that the expression levels of several miRNAs significantly change during CPB, and the mRNA and protein expression level alterations triggered by these miRNA changes lead to platelet dysfunction after CPB. CPB increases platelet Bax expression, which contributes to reduced platelet-surface GPIb expression and thrombin-induced platelet calcium changes. Next generation sequencing technology revealed that the expression levels of several miRNAs in circulating platelets significantly changed during CPB. These changes in platelet signalling might contribute to platelet dysfunction after CPB.

研究分野：集中治療医学、麻酔科学

キーワード：遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

開心術の黎明期より、人工心肺装置に代表される体外循環装置を、手術時や重症の患者管理に用いた際に、血小板機能障害と、凝固障害が起きることが、広く認識されている。凝固障害に関しては、輸液や体外循環充填液による凝固因子の希釈障害と、凝固系の亢進による消費障害の機序が証明され、それに対する対策が臨床的になされているが、血小板機能障害に関する機序に関しては、未だ不明の点も多く、さらに防止する有効な対策も無く、血小板製剤の輸血で対応しているのが現状である。また、無核細胞の血小板にも、種々の刺激で、有核細胞同様にアポトーシスが誘導される。人工心肺下手術周術期に起きる血小板機能障害の原因として、アポトーシスに関連する細胞内情報伝達系が関与している可能性がある。

血小板は止血凝固系の本来の役割以外に、免疫系及び炎症系にも関与していることが近年知られている。(Ware J, et al. *Curr Opin Hematol.* 2013;20:451-6.) 特に、血小板が活性化される事で血小板より放出される僅か1 $\mu$ M以下大のマイクロパーティクルは1967年に"Platelet Dust (血小板のゴミ)"として初めて報告されたが、最近の研究で他の血球や血管内皮細胞との相互作用により、炎症増悪病態の重要な要因となっている(図1、2、3)。(Lynch SF et al. *Br J Haematol.* 2007;137:36-48, Italiano JE Jr, *Curr Opin Hematol.* 2010;17:578-84)

生命を構成するタンパク質は、DNAの遺伝情報をもとにつくられる。この際、DNAの持つ情報は一時的にRNAにコピーされ、タンパク質の設計図として働く。しかし、最近タンパク質の設計図としては働かない21-24塩基程度の小さなRNA (small RNA) が、遺伝子発現を調節するのに大きな役割を演じている。小さなRNAに属するmiRNAは、多くの真核生物のゲノムに組み込まれており、異な

る種間でも保存されている。miRNAには自身自身の塩基配列と対合できる標的部位を持つ様々な遺伝子の翻訳を抑制する働きがあり(図4)、これによって、細胞の発生、増殖、分化、そして細胞周期等、重要な生物学的機能を緻密に制御している。これまでに、動物、植物、ウィルス等において10000個近くのmiRNAが報告されているが、ヒトでも2000個程度は存在し、全遺伝子の1/3以上の働きを調節している。miRNAは幾つものタンパク質と相互作用し、複合体を作って初めて機能を発揮するとされている。

## 2. 研究の目的

救急患者や手術患者に、体外循環装置を長時間使用すると血小板が活性化する。その後、血小板自体は機能低下を起こしながら、血小板から放出される物質が、周辺に炎症病態を引き起こすことが知られている。我々は、人工心肺下心臓手術周術期に惹起される血小板機能低下、及び炎症病態に及ぼす血小板内情報伝達系、及び血小板由来microRNA (miRNA)の役割に関して *In Vivo*, *In Vitro* 両面から探索する事を主眼に置いて研究を施行した。

また、本研究の実験結果が解明することにより、心臓血管周術期の血小板機能低下、炎症病態制御の可能性を探求し、今後の遺伝子治療の研究展開をしたいと考えた。

## 3. 研究の方法

**対象** 人工心肺下心臓予定手術患者、及び健康成人

### 採血

健康成人 1回採血

患者 手術前、人工心肺中、離脱直後、離脱後4時間、8時間、24時間

### (血小板細胞内情報伝達系に関する研究)

1. 血小板凝集反応 (透過法)
2. 血小板Ca放出反応 (Fluoro-3, フローサイト法)。
3. 血小板内キナーゼリン酸化解析

ERK, AKT, p38, JNK のリン酸化 / Total (比) 変化の定量 (フローサイト法)。

4. 血小板ミトコンドリア膜電位変化の定量 (JC-1 染色、フローサイト法)
5. 血小板ミトコンドリアチトクローム C 含量の変化 (ウェスタン、フローサイト法)
6. 血小板膜表面へのホスファチジルセリンの発現の変化 Annexin V<sup>+</sup> (フローサイト法)
7. 血小板内 Bcl-2 ファミリータンパク質の発現の変化 Bcl-x1, Bcl-2, Bax, Bak, Bim 発現の変化 (フローサイト法)
8. 血小板内カスパーゼ発現の変化 Caspase 3, 9 (フローサイト法)

次に市販されている Bcl-2 ファミリータンパク質 (Bcl-x1 又は Bax) をコードした細胞透過性ペプチド (Calbiochem 社) の前投与 (50uM) により、細胞死変化が修飾されることを確認した。

### (miRNA に関する研究)

- a. **miRNA の分離と濃縮** クエン酸採血後、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。mirVana™ miRNA Isolation Kit 等を用いて抽出する。
- b. **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 miRNA プロファイリングを、従来のマイクロアレイより優れた次世代高速シーケンサー Ion PGM システム (Life Technology 社) を用いて絶対的な定量法を施行。
  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. **ピース調整 (4 時間)** エマルジョン

PCR 法を用いて、cDNA を増幅

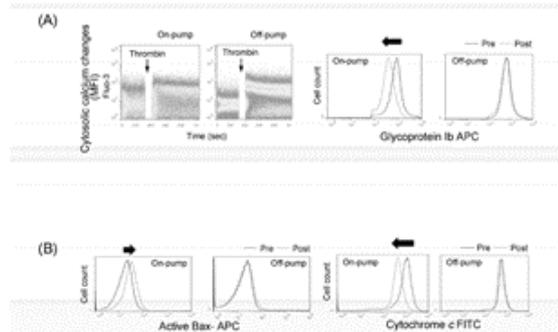
4. **シーケンシング (3 時間)** シーケンサーによる miRNA 発現定量
5. **データ解析 (1 時間)** サーバーに SFF または FASTQ 形式のデータが転送される。発現定量解析には、CLC バイオ社の解析ソフト (Genomic Work Bench) を使用する。

上記の発現定量結果から、周術期において特に血小板内で miRNA が減少し、血漿及びマイクロパーティクルで上昇した miRNA を選別する。

6. **特定 miRNA の検出と定量** リアルタイム PCR 法による発現定量により、シーケンサーにより得られた結果の確認を行う。(TaqMan® MicroRNA Assays)

### 4. 研究成果

我々は人工心肺下心臓手術において、アポトーシス誘導分子である Bax の周術期経時の変化と、血小板機能障害の関連を調べた。



(図 1)

人工心肺下心臓手術患者において、人工心肺前に比べ、人工心肺後に、血小板の凝集能の低下、血小板表面 GPIb, ミトコンドリア内チトクローム C の低下、血小板内 Bax の上昇を、フローサイトメトリー法で確認した。

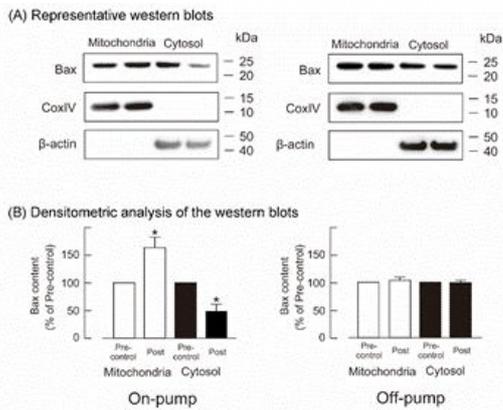
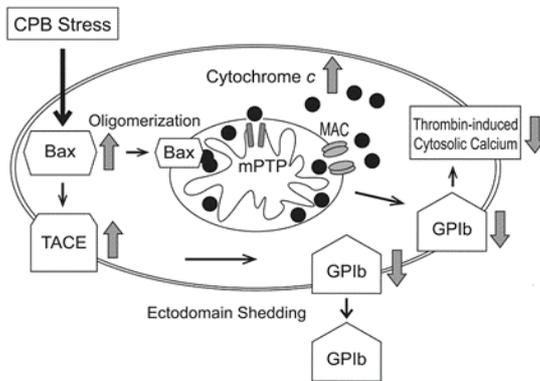


Figure 2

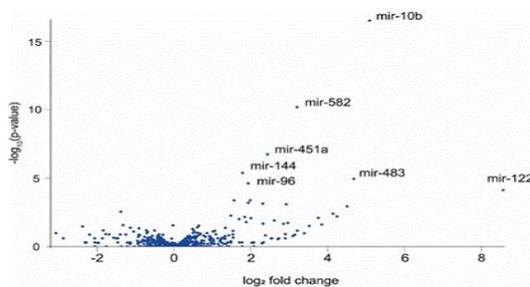
(図2)

人工心肺下心臓手術患者においては、細胞内 Bax の発現が、細胞質からミトコンドリアに移行している一方で、非人工心肺手術に関しては、細胞内 Bax の発現の細胞内移行は見られない。



(図3)

人工心肺下心臓手術患者における細胞死に関連する血小板内細胞情報伝達系の変化



(図4)

次世代シーケンサーによる miR の網羅的解

析により、以下の7つの miR が、手術前に比べ、有意に人工心肺後に上昇した。

**(結論)**

人工心肺を用いた心臓手術周術期において、トロンピンに対する血小板の不応性・凝集能低下と、アポトーシス(細胞死)進行の指標となるミトコンゴリア膜電位の低下及び血小板内 Bak, Bax の上昇に、相関関係があること、また細胞内 Bcl-XL 濃度を細胞性透過性ペプチドを用いて上昇させれば、血小板の細胞死を制御することができることを報告した。(Br J Anaesth. 2017 Dec 1;119(6):1118-1126.)

また、人工心肺下心臓手術において、人工心肺前後の miR 発現の網羅的解析を施行した。幾つかの miR が有意に人工心肺離脱後に上昇した。その中で、miR10b-5p と miR96-5p が有意に上昇することで、その各々のターゲットタンパクとなる GPIb と VAMP8 の mRNA が有意に低下することが推察された。GPIb は、血小板膜表面抗原の中でも、血小板機能に重要な役割を果たしているタンパク質である。それらを鑑みると、人工心肺後の血小板機能低下の機序に miR の発現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7件)

A Comparative Study of Point-of-Care Prothrombin Time in Cardiopulmonary Bypass Surgery. Okabayashi S, Ogawa S, Tanaka KA, Nishiyama T, Takeshita S, Nakayama Y, Nakajima Y, Sawa T, Mizobe T. J Cardiothorac Vasc Anesth. 2017 Dec 29. pii: S1053-0770(17)31036-4. doi: 10.1053/j.jvca.2017.12.044. [Epub ahead of print] 査読有

Potential contribution of erythrocyte microRNA to secondary erythrocytosis and thrombocytopenia in congenital heart disease. Mukai N, Nakayama Y, Murakami S, Tanahashi T, Sessler DI, Ishii S, Ogawa S, Tokuhira N, Mizobe T, Sawa T, Nakajima Y. Pediatr Res. 2018 Apr;83(4):866-873. doi:

10.1038/pr.2017.327. Epub 2018 Jan 17. 査読有

Changes in platelet Bax levels contribute to impaired platelet response to thrombin after cardiopulmonary bypass: prospective observational clinical and laboratory investigations. Murase M, Nakayama Y, Sessler DI, Mukai N, Ogawa S, Nakajima Y. Br J Anaesth. 2017 Dec 1;119(6):1118-1126. doi: 10.1093/bja/aex349. 査読有

A Practical Training Program for Peripheral Radial Artery Catheterization in Adult Patients: A Prospective, Randomized Controlled Trial. Nakayama Y, Inagaki Y, Nakajima Y, Sessler DI, Mukai N, Ogawa S, Mizobe T, Sawa T. Anesthesiology. 2016 Oct;125(4):716-23. doi:10.1097/ALN.0000000000001263. 査読有

Optimal site for ultrasound-guided venous catheterisation in paediatric patients: an observational study to investigate predictors for catheterisation success and a randomised controlled study to determine the most successful site. Takeshita J, Nakayama Y, Nakajima Y, Sessler DI, Ogawa S, Sawa T, Mizobe T. Crit Care. 2015 Jan 20;19:15. doi: 10.1186/s13054-014-0733-4. 査読有

Thromboelastometry-guided intraoperative haemostatic management reduces bleeding and red cell transfusion after paediatric cardiac surgery. Nakayama Y, Nakajima Y, Tanaka KA, Sessler DI, Maeda S, Iida J, Ogawa S, Mizobe T. doi: 10.1093/bja/aex349. 査読有

Fibrinogen measurements in plasma and whole blood: a performance evaluation study of the dry-hematology system. Ogawa S, Tanaka KA, Nakajima Y, Nakayama Y, Takeshita J, Arai M, Mizobe T. Anesth Analg. 2015 Jan;120(1):18-25. doi: 10.1213/ANE.0000000000000448. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

向井 信弘、中山 力恒、影山 京子、徳平 夏子、佐和 貞治、中嶋 康文  
保存赤血球製剤中における赤血球内 microRNA 経時変化の網羅的解析 第 65 回日本麻酔科学会学術集会 (2018)

向井 信弘、中山 力恒、影山 京子、徳平 夏

子、佐和 貞治、中嶋 康文

次世代シーケンサーを用いた、チアノーゼ先天性心疾患における血球異常症の発症メカニズムに関する赤血球中 microRNA の網羅的解析 第 64 回日本麻酔科学会学術集会 (2017) 最優秀演題

DES 挿入患者の周術期の抗血栓療法 抗凝固薬・抗血小板薬の周術期の使い方  
コーディネータ：溝部 俊樹 (京都府立医科大学大学院 医学研究科 麻酔科学教室) / コメントータ：塩見 紘樹 (京都大学大学院医学研究科)、中嶋 康文 (関西医科大学附属枚方病院) 第 64 回日本麻酔科学会学術集会 (2017)

凝固 cardiac non cardiac

Perioperative hemostatic changes in cardiac and non-cardiac surgery  
中嶋 康文, 中山 力恒, 向井 信弘, 小川 覚, 溝部 俊樹 第 62 回日本麻酔科学会学術集会 (2015)

microRNA (血小板領域を中心に) microRNA as a novel biomarkers for platelet activation

中嶋 康文, 中山 力恒, 向井 信弘, 石井 祥代, 佐和 貞治 第 62 回日本麻酔科学会学術集会 (2015)

〔図書〕(計 件)  
該当なし

〔産業財産権〕  
該当なし

出願状況 (計 件)  
該当なし

取得状況 (計 件)  
該当なし

〔その他〕該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中嶋 康文 (NAKAJIMA, Yasufumi)  
関西医科大学・医学部・教授  
研究者番号：7 0 3 2 6 2 3 9

(2)研究分担者

佐和 貞治 (SAWA, Teiji)  
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

石井 祥代 (ISHII, Sachiyo)  
京都府立医科大学・  
医学(系)研究科(研究院)・助教  
研究者番号: 40457958

溝部 俊樹 (MIZOBE, Toshiki)  
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 (OGAWA, Satoru)  
京都府立医科大学・  
医学(系)研究科(研究院)・講師  
研究者番号: 50636131

中山 力恒 (NAKAYAMA, Yoshinobu)  
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

(3)連携研究者

該当無し

(4)研究協力者

該当無し