

Title	肺血管が分泌するエクソソームの網羅的解析を介した肺血管リモデリングマーカーの探索
Sub Title	Marker for pulmonary vessel remodeling
Author	武井, 眞(Takei, Makoto)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>本研究では肺血管内皮細胞から特異的に分泌され、そのリモデリングを反映する肺血管リモデリングマーカーの探索を目的とした。肺血管から特異的に分泌されるマーカーを同定するために、肺高血圧症症例の肺動脈及び肺静脈から血液をサンプリングし、含有されるエクソソームに含まれるsmall RNA, miRNAをRNAシーケンシングを用いて比較した。複数のsmall RNA, miRNAが肺動脈に比して肺静脈に有意に多く含まれていたが、qPCR法による定量では再現性を持って増加しているsmall RNAは同定できなかった。エクソソームに含まれるRNAの定量法についてさらなる検討が必要と考えられた。</p> <p>The aim of the current study was to identify pathogenic marker derived from vascular endothelial cells which reflect remodeling of pulmonary vasculature. For this purpose, we compare contents of exosomes in pulmonary vein and pulmonary artery in patients with pulmonary hypertension, especially focusing on small RNAs and micro RNAs with RNA sequencing. As a result of the RNA sequencing, we successfully identified several small RNAs and micro RNAs which were abundant in pulmonary vein compared to pulmonary artery. However, those difference in abundance were not confirmed with quantative PCR analysis. Now we are trying to establish the quantification methods for RNAs included in exosomes with reliable reproducibility.</p>
Notes	<p>研究種目：若手研究(B) 研究期間：2016～2018 課題番号：16K21356 研究分野：循環器内科</p>
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K21356seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和 元年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21356

研究課題名（和文）肺血管が分泌するエクソソームの網羅的解析を介した肺血管リモデリングマーカーの探索

研究課題名（英文）Marker for pulmonary vessel remodeling

研究代表者

武井 眞 (TAKEI, MAKOTO)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・共同研究員

研究者番号：40624622

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では肺血管内皮細胞から特異的に分泌され、そのリモデリングを反映する肺血管リモデリングマーカーの探索を目的とした。肺血管から特異的に分泌されるマーカーを同定するために、肺高血圧症症例の肺動脈及び肺静脈から血液をサンプリングし、含有されるエクソソームに含まれるsmall RNA, miRNAをRNAシーケンシングを用いて比較した。複数のsmall RNA, miRNAが肺動脈に比して肺静脈に有意に多く含まれていたが、qPCR法による定量では再現性を持って増加しているsmall RNAは同定できなかった。エクソソームに含まれるRNAの定量法についてさらなる検討が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現時点で肺血管リモデリングマーカーの確立はなされていない。しかしながら、肺動脈と肺静脈に含まれるエクソソームに含まれる内容物が有意に異なっていることは本研究から明らかにされており、今後エクソソーム含有物の解析法が進歩することにより本手法により肺血管リモデリングマーカーの確立が期待できる。肺血管のリモデリングは循環器疾患、肺疾患などの終末像に共通しており、そのマーカーの確立は重要な臨床医学的意義がある。

研究成果の概要（英文）：The aim of the current study was to identify pathogenic marker derived from vascular endothelial cells which reflect remodeling of pulmonary vasculature. For this purpose, we compare contents of exosomes in pulmonary vein and pulmonary artery in patients with pulmonary hypertension, especially focusing on small RNAs and micro RNAs with RNA sequencing. As a result of the RNA sequencing, we successfully identified several small RNAs and micro RNAs which were abundant in pulmonary vein compared to pulmonary artery. However, those difference in abundance were not confirmed with quantitative PCR analysis. Now we are trying to establish the quantification methods for RNAs included in exosomes with reliable reproducibility.

研究分野：循環器内科

キーワード：肺高血圧症 エクソソーム リモデリング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19（共通）

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症（Pulmonary Arterial Hypertension: PAH）や Eisenmenger 症候群は肺動脈圧の上昇から、右心不全をきたす生命予後不良の難治性疾患であり、肺動脈の内膜や中膜の肥厚として病理学的に定義される肺血管リモデリングが肺動脈圧上昇の本態である。現在複数の肺血管拡張薬が臨床応用されており、PAH の早期診断、早期治療の重要性は広く認識されているが、臨床的には肺血管リモデリングを早期に診断することは困難であった。その理由として、

（１）これらの患者に対する肺生検は禁忌であり、生前に病理学的な診断を下すことが難しい

（２）臨床的には肺血管リモデリングの結果としての肺動脈圧、肺血管抵抗の上昇をもってこれらの疾患を診断するが、肺循環はコンプライアンスが高く、総肺血管床の 2/3 以上が障害され、病期が進んだ段階となって初めて肺動脈圧、肺血管抵抗の上昇が観察されること
があげられる。したがって、これらの疾患の早期診断、治療のためには画像診断、血液マーカーなど低侵襲な手法で肺動脈リモデリングを反映するバイオマーカーが求められてきた。研究開始時点において肺血管リモデリングを反映するマーカーとしてマトリックスメタロプロテアーゼなどの炎症マーカーをはじめとしていくつかの報告がなされていたが、肺動脈リモデリングとの相関性や肺血管に対する特異性の低さなど臨床応用へはまだ課題が多い状況であった。従来報告されてきたバイオマーカーの問題点として、すでに炎症マーカーや組織障害マーカーとして過去に報告のあるマーカーを検討していることが多く、方法論的に肺血管特異性が低くなってしまふことがあげられた。こうした状況を打破するため、肺血管特異性の高い新規の病態反映マーカーを探索することが求められていた。

2. 研究の目的

上述の通り肺血管特異性の高い肺血管リモデリングマーカーを探索するため、本研究においては

（１）肺血管への“入口”である肺動脈と“出口”である肺静脈の両者から検体をサンプリング、比較することにより肺血管から特異的に分泌されるマーカーを探索

（２）肺血管から分泌される因子としてエクソソームに着目し、エクソソーム内に含まれる miRNA, small RNA について解析

を組み合わせる解析した。すなわち、肺血管リモデリングの進んだ症例において肺動脈及び肺静脈からサンプルした検体からエクソソームを抽出し、エクソソーム内に含まれる miRNA を比較することで肺血管から特異的に分泌されるバイオマーカーを探索した。（下図 1）

3. 研究の方法

（１）疾患群およびコントロール群からの肺動脈、肺静脈血エクソソームのサンプリング
心房間交通を有し、肺動脈及び肺静脈からの血液サンプリングが可能な肺動脈性肺高血圧症症例及びコントロール群として肺高血圧症を有さない心房中隔欠損症の症例から同意を取得し、肺動脈、肺静脈の血液サンプリングを行いエクソソームを抽出した。

（２）肺動脈、肺静脈内エクソソームに含まれる miRNA, small RNA の比較

上述の過程を経て抽出した肺動脈、肺静脈内エクソソームに含まれる miRNA, small RNA を small RNA シークエンシングにより比較し、バイオマーカーの候補分子を抽出した。

（３）バイオマーカー候補分子の定量

RNA シークエンシングにより抽出されたバイオマーカー候補分子を qRT-PCR を用いて定量評価し、候補分子の絞り込みを試みた（下図 1）。

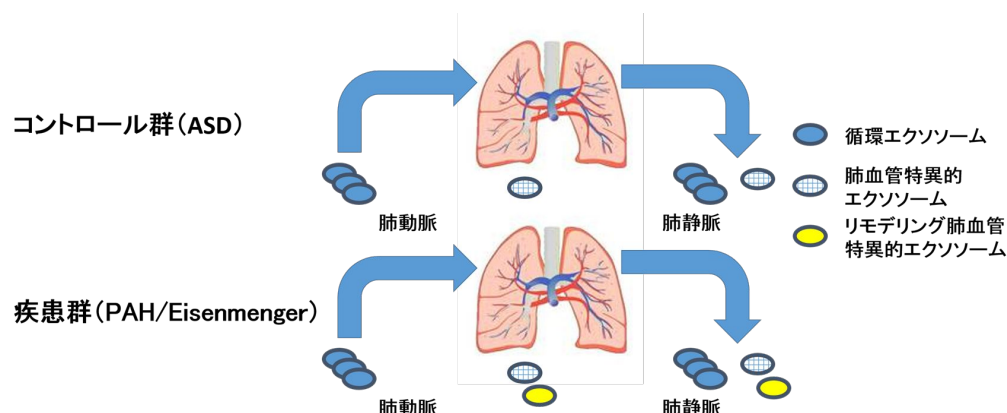


図 1

4. 研究成果

(1) 疾患群およびコントロール群からの肺動脈、肺静脈血エクソソームのサンプリング
平成 27 年度にはまず適切なサンプル量を特定するために血液からのエクソソーム抽出、抽出したエクソソームからの RNA 抽出を行った。抽出したエクソソームについて電子顕微鏡により品質確認を行った。引き続きエクソソームからの RNA 抽出を行い、適切なクオリティーのサンプルを必要量得るための血液サンプル量 (8ml) を特定した。サンプル量特定後、肺高血圧症患者 4 名、コントロール患者 3 名から同意を得て血液サンプルの提供を受けた。

(2) 肺動脈、肺静脈内エクソソームに含まれる miRNA, small RNA の比較
上述のサンプルから抽出した RNA について、RNA シークエンシングを行った。エクソソームから抽出した miRNA の RNA シークエンシングについては先進的な技術であり、標準的な手順が確立されていない状況であった。そこで、テストサンプルを用いて最適なシークエンシング、RNA 抽出、cDNA ライブラリ作成の条件検討を行った。最終的に適切なシークエンシング深度の得られた疾患検体 4 検体の結果を解析した。肺動脈において肺静脈よりも 2 倍以上含有量が上昇していた RNA は small RNA が 16 分子 (small RNA A-P) miRNA が 7 分子 (miRNA A-G) であった (下図 2)。

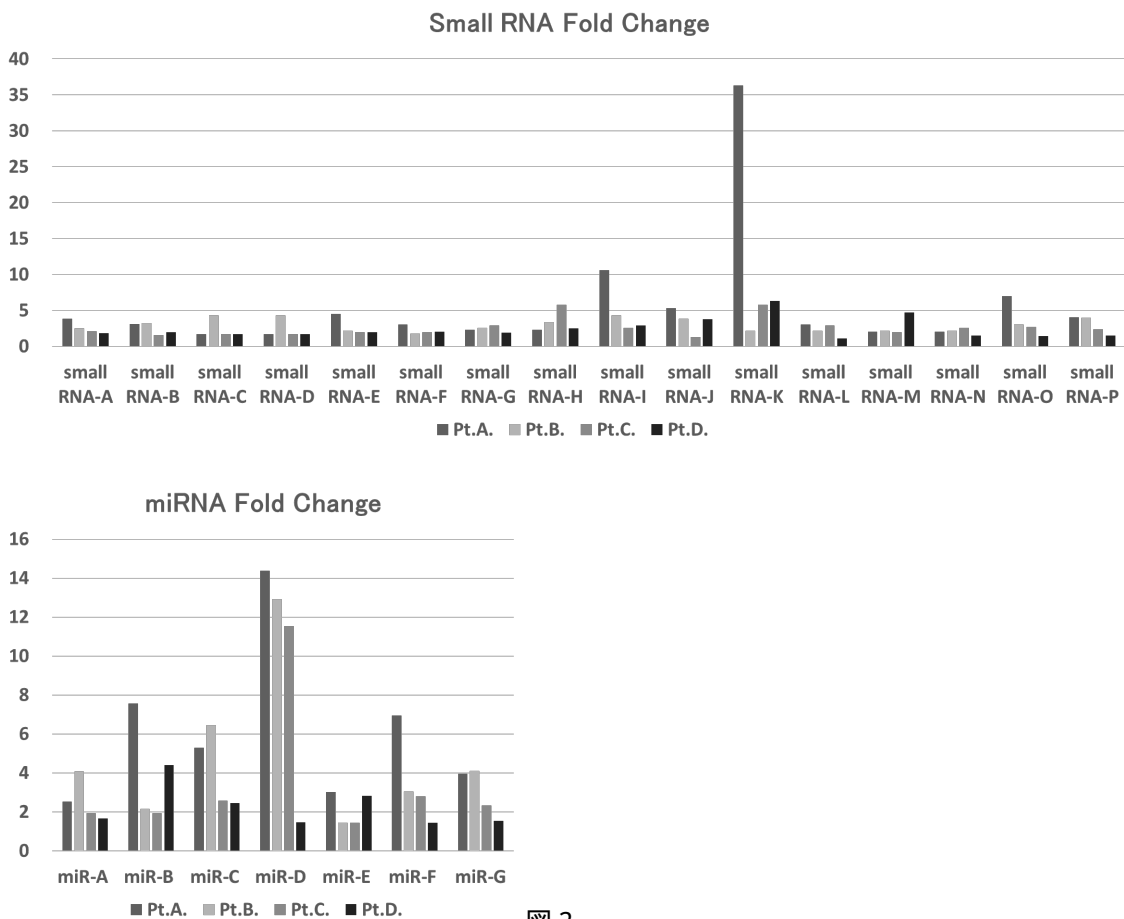


図 2

(3) バイオマーカー候補分子の定量

上述の miRNA 7 分子について qRT-PCR による定量を試みた。エクソソームサンプルに含まれる miRNA の定量については internal control の設定方法が標準化されておらず、今回の検討では small RNA シークエンシングの結果として比較的各サンプルで含有量が高く、正規化後のリード数変動が少なかった 3 分子の miRNA の平均値を internal control として各候補分子の相対的な発現量を比較する方針とし、Small RNA の定量法として比較的安定している Taqman 法を用いて qRT-PCR を試みた。しかしながら、検討した 7 分子の miRNA において small RNA シークエンシングの結果と一致する含有量の変化は観察できなかった。原因として、small RNA シークエンシングの際の正規化に用いた分子群と qRT-PCR の際に設定した internal control の含有量に差があることが考えられた。Small RNA シークエンシングの際の正規化手法、qRT-PCR の際の Internal control の設定法は前述の通り標準化されておらず、再現性については極微量の RNA しか得られないエクソソーム含有 RNA サンプルの定量における避けがたい問題とも考えられた。今後比較的各検体で含有量が高く、定量が安定する分子に絞って再度定量評価を試みる方針である。

5．主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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) 研究分担者
なし

(2) 研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。