

Title	未破裂脳動脈瘤の成長及び破裂に関与する体液中マイクロRNAの同定
Sub Title	Identification of circulating microRNA in body fluids associated with growth and rupture of cerebral aneurysm
Author	松井, 悠輔(Matsui, Yūsuke)
Publisher	
Publication year	2021
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2020. )
JaLC DOI	
Abstract	くも膜下出血において未破裂瘤に比べて発現が低下している49種のマイクロRNAを同定した。破裂の結果として低下しているものを除外するためにモデルマウスを用いて、モデル血清中のマイクロRNAの発現プロファイルを、コントロール群と比較し、くも膜下出血の結果として2倍以上発現が低下した42種類のマイクロRNAを同定した。これらを比較検討し4種類のマイクロRNAは破裂の結果発現が低下していると考え検討から除外した。残ったマイクロRNAのうちhsa-miR-23b-3pは脳動脈瘤の形成抑制への関与が報告されており、今回の研究結果からはその減少が動脈瘤増大及び破裂に関与している可能性が示唆された。 I identified 49 microRNAs whose expression was reduced in serum in patients with subarachnoid hemorrhage compared to those in patients with unruptured aneurysms. Using model mice to exclude those that are declining as a result of rupture, we compared the expression profiles of microRNAs in SAH-model mouse serum with those in the control group and identified 42 microRNAs whose expression decreased more than two-fold as a result of subarachnoid hemorrhage. These were compared and examined, and 4 kinds of microRNAs were excluded from the examination because the expression of the result of the rupture was lowered. Among the remaining microRNAs, hsa-miR-23b-3p has been reported to be involved in the inhibition of cerebral aneurysm formation, and our findings suggest that the reduction may be involved in aneurysm increase and rupture.
Notes	研究種目 : 若手研究 研究期間 : 2019 ~ 2020 課題番号 : 19K18439 研究分野 : 脳神経外科学
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_19K18439seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_19K18439seika</a>

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 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18439

研究課題名（和文）未破裂脳動脈瘤の成長及び破裂に関与する体液中マイクロRNAの同定

研究課題名（英文）Identification of circulating microRNA in body fluids associated with growth and rupture of cerebral aneurysm

研究代表者

松井 悠輔 (MATSUI, Yusuke)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：10837462

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：くも膜下出血において未破裂瘤に比べて発現が低下している49種のマイクロRNAを同定した。破裂の結果として低下しているものを除外するためにモデルマウスを用いて、モデル血清中のマイクロRNAの発現プロファイルを、コントロール群と比較し、くも膜下出血の結果として2倍以上発現が低下した42種類のマイクロRNAを同定した。これらを比較検討し4種類のマイクロRNAは破裂の結果発現が低下していると考え検討から除外した。残ったマイクロRNAのうちhsa-miR-23b-3pは脳動脈瘤の形成抑制への関与が報告されており、今回の研究結果からはその減少が動脈瘤増大及び破裂に関与している可能性が示唆された。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究結果によって、末梢血から分離可能な血清中のhsa-miR-23b-3pの減少が動脈瘤増大に対するバイオマーカーとして応用可能である可能性が示唆された。現時点での臨床動脈瘤の破裂予測は患者背景や動脈瘤の部位および形態からなされることが一般的であるため、本研究成果が臨床応用されれば、真に破裂予防のための治療を必要とする動脈瘤を有する患者を選別することが可能となり、破裂しやすい動脈瘤を有する患者がくも膜下出血になることを予防することが可能になるとともに、破けづらい動脈瘤を有する患者に対しては破裂の懸念に起因する心労を軽減できるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：I identified 49 microRNAs whose expression was reduced in serum in patients with subarachnoid hemorrhage compared to those in patients with unruptured aneurysms. Using model mice to exclude those that are declining as a result of rupture, we compared the expression profiles of microRNAs in SAH-model mouse serum with those in the control group and identified 42 microRNAs whose expression decreased more than two-fold as a result of subarachnoid hemorrhage. These were compared and examined, and 4 kinds of microRNAs were excluded from the examination because the expression of the result of the rupture was lowered. Among the remaining microRNAs, hsa-miR-23b-3p has been reported to be involved in the inhibition of cerebral aneurysm formation, and our findings suggest that the reduction may be involved in aneurysm increase and rupture.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：くも膜下出血 脳動脈瘤 破裂予測 マイクロRNA バイオマーカー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本邦での脳動脈瘤破裂くも膜下出血（以下くも膜下出血とする）の年間発症率は10万人当たり20人であり、発症後約半数が救命困難な状態に陥るとされている。更に1/3の症例に永続的な神経脱落症状を来たすため、発症後に病前の生活に戻れるものは全患者の1/3に満たない。脳神経外科学が発展した現代になってなお予後不良な疾患である。また壮年期の発症も多く、患者本人と家族の生活基盤を瞬時に搖るがしかねない社会的損失も大きい疾患であるといえる。一方未破裂脳動脈瘤の有病率は人口の数パーセントと報告されており、計算上本邦における潜在的な未破裂脳動脈瘤保持者は数百万人規模となる。さらに本邦の人口当たりMRI稼働台数は世界一であり、多くの未破裂脳動脈瘤が発見される素地がある。未破裂動脈瘤が発見される機会が多いことは、破裂を未然に防ぐ機会がある一方で、血圧管理や禁煙、節酒といった動脈瘤の成長及び破裂を助長する因子を避けることを除いては、外科的治療をあいて他に有効な破裂予防法が確立されていないのが現状である。実臨床においては、PHASE scoreやUCAS JAPANを踏まえ、破裂のリスクが高いと考えられる動脈瘤に対してのみ外科的介入が検討されているが、いずれも年齢や人種、家族歴といった患者特性、さらには動脈瘤の場所、大きさ、形といった形態学的情報に基づいた予測法であり、実際に手術を行うと、術前は小さくて手術の必要性に乏しいと考えられた動脈瘤の壁が今にも破裂しそうに脆弱であったり、またその逆の状況にも遭遇する。このため、現状の破裂予測に勝る、動脈瘤の成長及び破裂のマーカーとなるような予測因子の確立が望まれる。動脈瘤の成長には種々の炎症関連因子が関与することが既に示されている事から、分子生物学的なマーカーが、動脈瘤の成長及び破裂の予測に役立つと考えた。また分子生物学的マーカーとしては動脈瘤の成長から破裂に至る過程は複数の遺伝子が関与する複雑な過程であることから、ひとつで複数の遺伝子を制御するため複雑な事象を一元的に説明できる可能性があるマイクロRNAを検討することとした。またマイクロRNAは産生された細胞からエクソソーム内に放出され、体内を循環することが知られているため、動脈瘤の組織を得ることなく、体液中から比較的低侵襲に採取、測定可能であるとの利点を有する。以上を踏まえた本研究の核心をなす学術的「問い合わせ」は「動脈瘤の成長及び破裂に関与するマイクロRNAを患者体液中で同定し、破裂予測のマーカーとして臨床応用することで未破裂脳動脈瘤に対する先制医療に寄与することは可能であるか？」というものであり、このような背景に基づいて研究を開始した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、分子生物学的特性に基づいた動脈瘤破裂予測を可能とする体液中バイオマーカーとしてのマイクロRNAを同定することにある。目的達成の方法として動物モデルと臨床検体を並行して扱うことで有機的に検討を進めることに本研究の独自性がある。特にマイクロアレイ解析は網羅的な解析であるが故に多数の候補マイクロRNAを同定し、その全てが真に意義のあるマイクロRNAであるか否かの判断に苦慮し得ることが考えられるが、動物モデルにおけるマイクロRNAと臨床検体におけるヒトオルソログの発現を比較検討することで、真に意味のあるマイクロRNAを同定することが可能になると想っている。研究の創造性発展性としては、動脈瘤破裂に関わる遺伝子産物が明らかになった先に動脈瘤破裂予防を目的とした先制医療を確立することを視野に入れた研究である。

### 3. 研究の方法

未破裂脳動脈瘤患者から血液の提供を受け、また動脈瘤が破裂し、くも膜下出血を来たすに至った患者からも血液の提供を受け、それぞれ血清を単離し、血清中のマイクロRNAの発現プロファイルをマイクロアレイの手法を用いて解析した。

上記の解析の結果同定されたマイクロRNAには、破裂の結果として低下しているマイクロRNAと、破裂を来たすに至ったプロセスに関与するマイクロRNAが混在しているものと考察し、前者を除外するためにくも膜下出血モデルマウスを用いて、モデルマウス血清中のマイクロRNAの発現プロファイルを、コントロール群の血清中のマイクロRNAのそれと比較し、くも膜下出血の結果として発現が低下したマイクロRNAを同定した。くも膜下出血モデルマウスとしては8週齢のC57BL/6NCrマウスを腹腔内麻酔ののち、頭部を固定、bregmaの4.5mm前方の傍正中部に小孔を穿ち、そこから定位的に100μlの同種マウスの心臓から採血した血液を定位的に注入する自家血注入前方循環モデルを採用した。

前述の2種類のマイクロアレイ解析の結果を比較検討し、それぞれで共通にオルソログが同定されているマイクロRNAは目的とする動脈瘤の増大及び破裂に関与した発現低下ではなく破裂の結果としてその発現が低下しているものと考察し以下の検討対象から除外した。

これらを除外し、残ったマイクロRNAに関して公開されたデータベースを用いた*in silico*の機能解析を行い、動脈瘤の破裂に関与する可能性のあるマイクロRNAを絞り込んだ。

上記と並行して未破裂脳動脈瘤モデルマウスの確立も目指したが、この手法は安定したモデルマウスを確立するに至らず、当初の研究目的を達成するために前述の実験と検討を行い研究を遂行した。

### 4. 研究成果

未破裂脳動脈瘤患者から血液の提供を受け、また動脈瘤が破裂し、くも膜下出血を来たすに至った患者からも血液の提供を受け、それぞれ血清を単離し、血清中のマイクロRNAの発現プロ

ファイルをマイクロアレイの手法を用いて解析した。マイクロアレイ解析の結果、くも膜下出血においては未破裂脳動脈瘤に比べて発現の上昇よりも低下を認めるマイクロ RNA が目立って同定された。くも膜下出血群においてコントロール群と比較して 4 倍以上発現が低下しているマイクロ RNA が 49 種類同定された（表 1）。この 49 種類には、破裂の結果として低下しているマイクロ RNA と、破裂を来たすに至ったプロセスに関するマイクロ RNA が混在しているものと考察し、前者を除外するためにくも膜下出血モデルマウスを用いて、モデルマウス血清中のマイクロ RNA の発現プロファイルを、コントロール群の血清中のマイクロ RNA のそれと比較し、くも膜下出血の結果として 2 倍以上発現が低下した 42 種類のマイクロ RNA を同定した（表 2）。これらを比較検討した結果、4 種類のマイクロ RNA のオルソログがそれぞれのマイクロアレイ解析の結果で同定されており、これらは目的とする動脈瘤の増大及び破裂に関与した発現低下ではなく破裂の結果としてその発現が低下している可能性が考えられた。これらを除外し、残ったマイクロ RNA のうち hsa-miR-23b-3p に関しては脳動脈瘤の形成抑制への関与が報告されており、今回の研究結果からはその減少が動脈瘤増大及び破裂に関与している可能性が示唆された。また、その変化を末梢血中で捉えることができる可能性があり、動脈瘤の増大および破裂に対するバイオマーカーの候補になると考えられた。

表 1 くも膜下出血群においてコントロール群より発現が低下していたマイクロ RNA

Name	SAH	Control	Name	SAH	Control	Name	SAH	Control
hsa-miR-199-3p	4	111	hsa-miR-222-3p	9	84	hsa-miR-30a-5p	30	169
hsa-miR-146a-5p	8	229	hsa-miR-23a-3p	111	1005	hsa-miR-584-5p	6	35
hsa-miR-28-5p	4	78	hsa-miR-342-3p	13	114	hsa-let-7d-3p	10	51
hsa-miR-126-3p	37	613	<b>hsa-miR-23b-3p</b>	<b>112</b>	<b>925</b>	hsa-miR-320e	6	33
hsa-miR-21-5p	22	351	hsa-miR-423-3p	10	79	hsa-miR-191-5p	49	246
hsa-miR-151b	5	77	hsa-miR-339-5p	6	47	hsa-let-7g-5p	26	117
hsa-miR-130a-3p	7	97	hsa-miR-27b-3p	8	63	hsa-miR-30d-5p	82	367
hsa-miR-26a-5p	62	868	hsa-miR-26b-5p	26	191	hsa-miR-425-5p	23	103
hsa-miR-199a-5p	6	85	hsa-miR-30b-5p	17	115	hsa-miR-30c-5p	22	100
hsa-miR-27a-3p	11	147	hsa-miR-223-3p	433	2878	hsa-miR-4521	6	27
hsa-miR-221-3p	35	432	hsa-let-7e-5p	15	99	hsa-miR-4317	4	17
hsa-miR-6765-3p	900	11129	hsa-miR-652-3p	5	31	hsa-miR-103a-3p	92	389
hsa-miR-3907	128	1585	hsa-miR-181a-5p	15	100	hsa-miR-30e-5p	17	72
hsa-miR-125a-5p	5	50	hsa-miR-4633-5p	6	40	hsa-miR-187-5p	830	3438
hsa-miR-6872-3p	76	786	hsa-let-7f-5p	36	231	hsa-miR-24-3p	78	323
hsa-miR-126-5p	8	79	hsa-miR-142-5p	7	46			
hsa-miR-151a-5p	8	83	hsa-miR-186-5p	7	41			

49 種類のくも膜下出血患者においてコントロール群と比べて 4 倍以上発現が低下しているマイクロ RNA を同定した

表 2 モデルマウス血清中でくも膜下出血の結果として発現が低下したマイクロ RNA

Name	Fold change	Name	Fold change	Name	Fold change
mmu-miR-5118	2	mmu-miR-6691-5p	2.14	mmu-miR-298-5p	2.35
mmu-mir-6927	2	mmu-miR-8114	2.16	mmu-miR-324-3p	2.37
mmu-miR-181a-5p	2.01	mmu-miR-6978-5p	2.19	mmu-let-7d-5p	2.46
mmu-miR-672-5p	2.02	mmu-miR-500-3p	2.21	mmu-mir-466d	2.5
mmu-miR-3092-3p	2.02	mmu-miR-6690-5p	2.24	mmu-miR-130b-3p	2.52
mmu-miR-3470b	2.04	mmu-miR-1946b	2.26	mmu-miR-421-3p	2.53
mmu-mir-181a-1	2.04	mmu-miR-18a-3p	2.27	mmu-miR-31-5p	2.53
mmu-miR-6958-5p	2.04	mmu-miR-181b-5p	2.27	mmu-miR-6900-5p	2.6
mmu-mir-6958	2.04	mmu-miR-203-3p	2.3	mmu-miR-200c-3p	2.75
mmu-miR-669a-5p	2.06	mmu-miR-7015-5p	2.3	mmu-miR-342-5p	2.75
mmu-miR-669p-5p	2.06	mmu-miR-155-5p	2.3	mmu-miR-205-5p	2.81
mmu-mir-1839	2.06	mmu-miR-493-3p	2.3	mmu-miR-691	2.88
mmu-miR-130a-3p	2.08	mmu-miR-346-5p	2.33	mmu-miR-1949	3.08
mmu-miR-151-5p	2.12	mmu-miR-99b-3p	2.35	mmu-miR-331-3p	3.19

くも膜下出血モデルマウスを確立し、くも膜下出血群でコントロール群と比較して 2 倍以上発現が低下している 42 種類のマイクロ RNA を同定した

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〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関