

敗血症における血中マイクロ RNA の経時的変化

栗山直英・川治崇泰・長谷川大祐・加藤由布
下村泰代・森山和広・西田 修
(藤田医科大学医学部・麻酔・侵襲制御医学講座)

1 緒 言 (序)

マイクロ RNA は 22 塩基ほどの一本鎖 non coding RNA で、1 種類のマイクロ RNA が複数の mRNA に結合し、標的となる遺伝子発現を抑制する¹。

血漿中に存在する特定のマイクロ RNA の測定は、敗血症の診断に有用であるとの報告だけではなく、敗血症における炎症の評価など、その病態を示すバイオマーカーとしての可能性も示唆された²⁻¹⁰。敗血症の病態は、過剰な炎症などの宿主生体反応の破綻による臓器障害であり、敗血症の遷延は多臓器不全に進展する^{11,12}。

従来、敗血症による多臓器不全の指標として SOFA スコアが用いられており、その経時的変化は不全臓器の重症度を示す指標として用いられる¹²⁻¹⁴。

これまで、敗血症の重症度とマイクロ RNA の経時的推移を調査した報告はない。

今回、『敗血症患者において、マイクロ RNA の経時的測定により敗血症の重症度、病態を評価できる』という仮説のもと、当院 ICU に入室した敗血症症例において、マイクロ RNA アレイによる 2,565 種のマイクロ RNA の発現プロファイリングを行い、重症度スコアとマイクロ RNA の経時的変化を調査・検討したので報告する。

2 実験方法

本研究は藤田医科大学病院倫理委員会の承認を得た後に実施した。2017 年 8 月～2018 年 2 月までに敗血症にて当院 ICU に入室した患者 10 人の ICU 入室時、day2、day4 に採血を行い、マイクロ RNA アレイによるマイクロ RNA 発現プロファイリングを行った。また対照として、18 歳以上で文書による同意取得が得られた健常者 5 人から採血を行い、マイクロ RNA アレイによるマイクロ RNA 発現プロファイリングを行った。

敗血症の診断は sepsis3 ガイドラインに基づいて行

い、敗血症の重症度評価として、SOFA スコア、APACHE II スコアを用いた。

採血検体は、採血後速やかに遠心分離を行い、血漿検体として -80℃ で冷凍保管した。RNA 抽出キットは、3D-Gene RNA extraction reagent (東レ製) を用いた。マイクロ RNA の測定は、2,565 種のマイクロ RNA を網羅測定する DNA チップ (東レ社製 3D-Gene) を用いて、鎌倉テクノサイエンスにて測定・解析を行った。各検体のマイクロ RNA の測定は 1 回で、1 枚のチップで、最大 3 検体を測定した。アレイデータの標準化は、サンプルごとに median 値を算出し、それを 25 に揃える global normalization を行った。発現量の比の算出において、高発現側の global normalization 値 20 をカットオフとし、それよりも発現が低いものは採用しなかった。

健常者と比較し、敗血症患者の ICU 入室時マイクロ RNA シグナル値の平均が 2 倍以上または 0.5 倍以下となったものを発現変動ありとし、マイクロ RNA のヒートマップを作成した。

3 実験結果

患者背景を表 1 に示す。症例 9 は敗血症にて ICU 入室したが、原疾患である造血器悪性腫瘍に対して化学療法を実施したため除外とした。SOFA スコアは入室時 8.9 ± 4.1 (mean \pm SD) であったが、day2 の時点で 9 ± 4.4 、day4 には 5.7 ± 3.3 にまで改善した。ICU 退室時の転機は全例で生存であった。

健常者と比較し、ICU 入室時にシグナル値が 2 倍以上または 0.5 倍以下となった 62 種類のマイクロ RNA を図 1 に示す。健常者と比較して発現量が高値であったマイクロ RNA は 24 種類、低値であったマイクロ RNA は 38 種類であった。

図 2 は ICU 入室時マイクロ RNA の発現を重症度スコア順で示した。健常者と比較し、SOFA スコア、

表1 患者背景

敗血症患者	性別	疾患	年齢	ICU潜在日数(日)	人工呼吸器管理日数(日)	APACHE2	ICU入室時SOFA score	Day2 SOFA score	Day4 SOFA score	ICU退室転機	WBC (/ μ L)	CRP (mg/dL)	PCT (ng/mL)
症例1	男	小腸穿孔	60	9	2	16	5	6	5	生存	18800	13.59	4.62
症例2	男	尿路感染症	60	9	3	16	13	12	9	生存	5400	0.21	51.5
症例3	男	十二指腸穿孔	90	4	3	24	11	9	3	生存	5700	11.11	50.4
症例4	男	尿路感染症	67	39	19	38	16	18	12	生存	3200	0.8	32.6
症例5	女	大腸穿孔	81	4	2	17	8	5	1	生存	17100	25.69	0.44
症例6	男	肺炎	77	7	0	16	4	5	5	生存	23800	6.93	25.01
症例7	女	十二指腸穿孔	77	6	3	20	5	8	4	生存	2600	30.41	21.3
症例8	女	大腸穿孔	50	9	2	16	10	14	7	生存	2800	20.47	76.6
症例10	男	術後敗血症	63	5	3	15	5	5	3	生存	40400	20.68	30.97
症例11	男	尿路感染症	47	12	5	30	12	8	8	生存	21600	23.66	93.5

白血球数(WBC)、C反応性蛋白(CRP)、プロカルシトニン(PCT)はICU入室時に測定

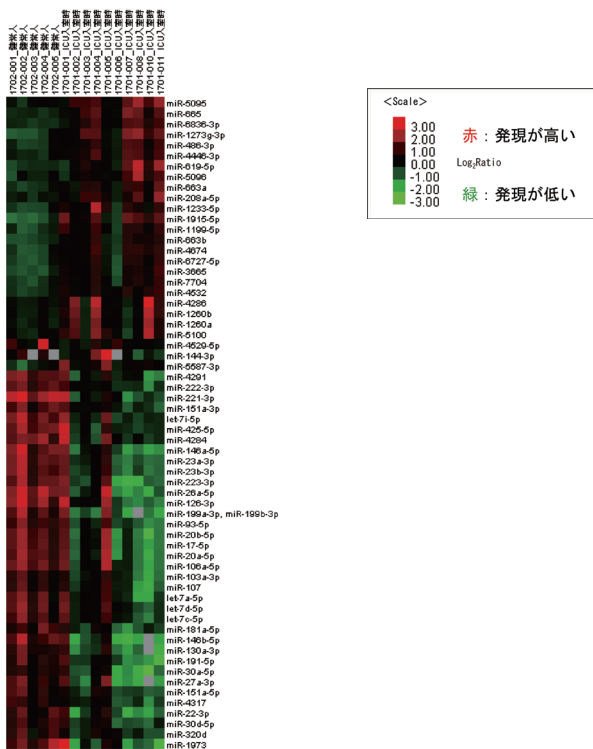


図1 発現変動のあったマイクロRNA
健常者と比較し、ICU入室時のシグナル値が2倍以上または0.5倍以下となったマイクロRNA 62種を示す。発現量が高値であったマイクロRNA は24種類、低値であったマイクロRNA は38種類であった。

APACHE II スコアともに重症度が増すとともに、マイクロRNA の発現変動が大きくなっていった。

図3にマイクロRNA の経時的変化を示す。発現量が高値であったマイクロRNA はICU入室時から時間経過とともに減少し、day4には健常者と同等になっていた。健常者と比較して、発現量が低値であったマイクロRNA はday4の時点でも発現は低値のままであった。

4 考 察

これまでに敗血症診断のバイオマーカーとして、マイクロRNA 測定の有用性を示唆した報告はあるが²⁻⁹、マイクロRNA の経時的変化を観察した報告はない。本研究は、敗血症患者における重症度の推移とマイクロRNA の経時的変化評価した初めての研究である。健常者と比較し、敗血症で発現変動が見られたマイクロRNA の中には、これまで敗血症との関連について報告のないマイクロRNA も含まれていた。変動のあった62種類のマイクロRNA に関して、個々のマイクロRNA の持つ細胞機能調節分子としての役割が明らかになっているものは少ない。重症度指標と関連のあったマイクロRNA の細胞機能調節作用を解析し、さらに症例数を増やした検討を行うことで、敗血症診療のバイオマーカーの確立につながる可能性がある。

近年、マイクロRNA を介した免疫制御に関する知見も増え、Toll-like receptor (TLR) を介する免疫反応においても、マイクロRNA による複雑な制御が関与していることが明らかになった¹⁵。敗血症において、細胞機能調節分子としての役割が明らかになっているマイクロRNA のなかで、miR-146、miR-223が注目されている。Alamらによれば、miR-146の発現はTLR/NF- κ Bシグナルの複数箇所を抑制的に作用し、抗炎症的に働く¹⁵と報告している。またmiR-223の発現は、miR-146と同様のTLR/NF- κ Bを介した抗炎症作用だけでなく、顆粒球の分化誘導と血小板の活性化、血小板凝集に影響を与えるとの報告もある¹⁶⁻¹⁸。今回の検討においてもICU入室時にmiR-146、miR-223の発現低下を認め、day4まで発現低下は継続した。miR-146、miR-223の持続した発現低下により、炎症

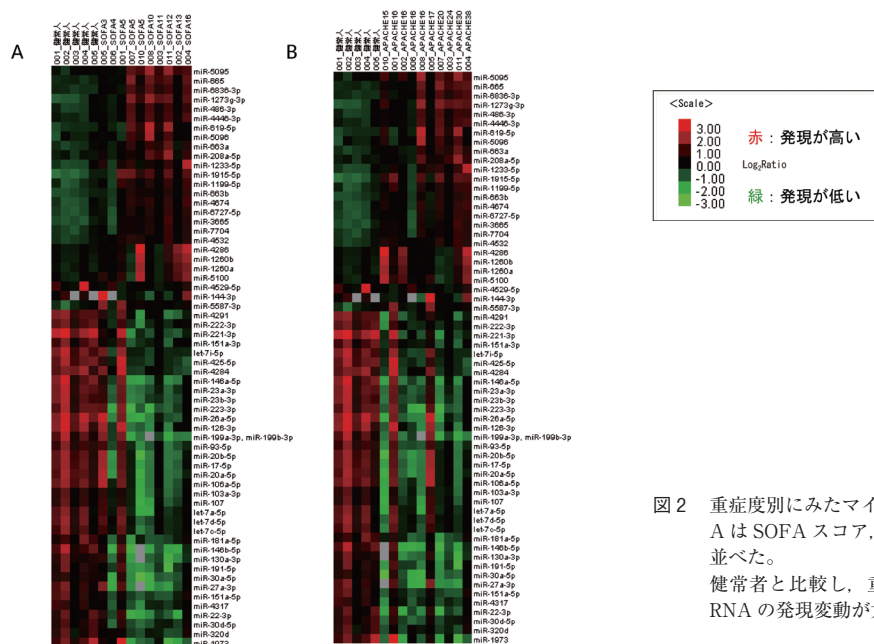


図2 重症度別にみたマイクロ RNA の発現量
A は SOFA スコア, B は APACHE II スコアによる重症度順に並べた。
健常者と比較し, 重症度スコアが増加するとともにマイクロ RNA の発現変動が大きくなる傾向にあった。

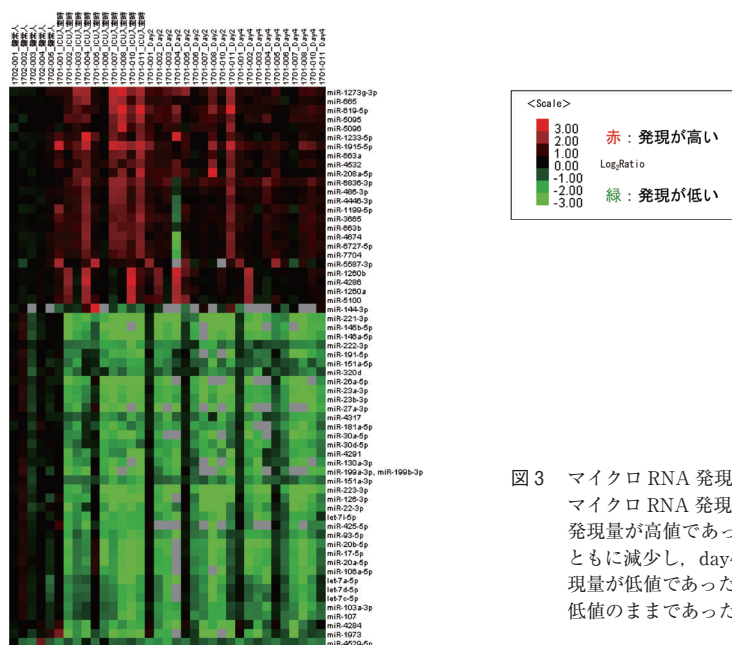


図3 マイクロ RNA 発現量の経時的変化
マイクロ RNA 発現量の経時的変化を示す。健常者と比較して, 発現量が高値であったマイクロ RNA は, ICU 入室時から時間経過とともに減少し, day4 には健常者と同等にまで低下していた。発現量が低値であったマイクロ RNA は day4 の時点でも発現量は低値のままであった。

の遷延と血小板凝集が惹起されていた可能性もある。敗血症診療において, 血液凝固や炎症のバイオマーカー測定に加えて, miR-146, miR-223 の発現推移を評価することで, 病態理解が深まる可能性がある。

今回の検討ではマイクロ RNA の測定期間が day4 までと短期間であったため, 敗血症急性期の病態のみを反映していた可能性がある。今後, 中長期の敗血症におけるマイクロ RNA 測定の検討を行い, 重症度とマイクロ RNA の推移を検討する必要がある。

5 結 論

敗血症症例において, マイクロ RNA アレイによる

2565 種のマイクロ RNA の発現プロファイリングを行い, 重症度スコアとマイクロ RNA 経時的変化を調査した。発現変動があったマイクロ RNA は 62 種類で, 重症度スコアが増加するとともにマイクロ RNA の発現変動が大きくなっていった。経時的変化の検討では, 発現が高値であったマイクロ RNA はその発現が減少したのに対して, 発現が低値であったマイクロ RNA は day4 でも発現は低値のままであった。

6 利益相反

本論文の共同著者である森山和広は東レ株式会社から原稿料等の報酬を得ている。

文 献

- 1) Bartel DP : MicroRNAs : target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009 ; 136 : 215 – 233.
- 2) Seeley JJ, Baker RG, Mohamed G, Bruns T, Hayden MS, Deshmukh SD, Freedberg DE, and Ghosh S : Induction of innate immune memory via microRNA targeting of chromatin remodeling factors. *Nature*. 2018 ; 559 : 114 – 119.
- 3) Wang JF, Yu ML, Yu G, Bian JJ, Deng XM, Wan XJ, and Zhu KM : Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2010 ; 394 : 184 – 188.
- 4) Wu X, Yang J, Yu L, and Long D : Plasma miRNA-223 correlates with risk, inflammatory markers as well as prognosis in sepsis patients. *Medicine*. 2018 ; 97 : e11352.
- 5) Vasilescu C, Rossi S, Shimizu M, Tudor S, Veronese A, Ferracin M, Nicoloso MS, Barbarotto E, Popa M, Stanciu O, Fernandez MH, Tulbure D, Bueso-Ramos CE, Negrini M, and Calin GA : MicroRNA fingerprints identify miR-150 as a plasma prognostic marker in patients with sepsis. *PLoS. One*. 2009 ; 4 : e7405.
- 6) Puskarich MA, Nandi U, Shapiro NI, Trzeciak S, Kline JA, and Jones AE : Detection of microRNAs in patients with sepsis. *J. Acute. Dis*. 2015 ; 4 : 101 – 106.
- 7) Rogobete AF, Sandesc D, Bedreag OH, Papurica M, Popovici SE, Bratu T, Popoiu CM, Nitu R, Dragomir T, AAbed HIM, and Ivan MV : MicroRNA Expression is Associated with Sepsis Disorders in Critically Ill Polytrauma Patients. *Cells*. 2018 ; 7 : 271.
- 8) Zhang W, Jia J, Liu Z, Si D, Ma L, and Zhang G : Circulating microRNAs as biomarkers for Sepsis secondary to pneumonia diagnosed via Sepsis 3.0. *BMC. Pulm. Med*. 2019 ; 19 : 93.
- 9) Szilágyi B, Fejes Z, Pócsi M, Kappelmayer J, and Nagy B Jr : Role of sepsis modulated circulating microRNAs. *EJIFCC*. 2019 ; 30 : 128 – 145.
- 10) Essandoh K and Fan GC : Role of extracellular and intracellular microRNAs in sepsis. *Biochim. Biophys. Acta*. 2014 ; 1842 : 2155 – 2162.
- 11) Hotchkiss RS, Monneret G, and Payen D : Sepsis-induced immunosuppression : from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol*. 2013 ; 13 : 862 – 874.
- 12) Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, and Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC : The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016 ; 315 : 801 – 810.
- 13) Vincent JL, de Mendonça A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, Sprung CL, Colardyn F, and Blecher S : Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units : results of a multicenter, prospective study. Working group on “sepsis-related problems” of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit. Care. Med*. 1998 ; 26 : 1793 – 1800.
- 14) Blanco J, Muriel-Bombín A, Sagredo V, Taboada F, Gandía F, Tamayo L, Collado J, García-Labatut A, Carriedo D, Valledor M, De Frutos M, López MJ, Caballero A, Guerra J, Alvarez B, Mayo A, and Villar J : Grupo de Estudios y Análisis en Cuidados Intensivos : Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis : a Spanish multicentre study. *Crit. Care*. 2008 ; 12 : R158.
- 15) Alam MM and O’Neill LA : MicroRNAs and the resolution phase of inflammation in macrophages. *Eur. J. Immunol*. 2011 ; 41 : 2482 – 2485.
- 16) Elgheznawy A, Shi L, Hu J, Wittig I, Laban H, Pircher J, Mann A, Provost P, Randriamboavonjy V, and Fleming I : Dicer cleavage by calpain determines platelet microRNA levels and function in diabetes. *Circ. Res*. 2015 ; 117 : 157 – 165.
- 17) Kaudewitz D, Skroblin P, Bender LH, Barwari T, Willeit P, Pechlaner R, Sunderland NP, Willeit K, Morton AC, Armstrong PC, Chan MV, Lu R, Yin X, Gracio F, Dudek K, Langley SR, Zampetaki A, de Rinaldis E, Ye S, Warner TD, Saxena A, Kiechl S, Storey RF, and Mayr M : Association of MicroRNAs and YRNAs With Platelet Function. *Circ. Res*. 2016 ; 118 : 420 – 432.
- 18) Haneklaus M, Gerlic M, O’Neill LA, and Masters SL : miR-223 : infection, inflammation and cancer. *J. Intern. Med*. 2013 ; 274, 215 – 226.

(2020年9月2日受理)