

## マイクロパーティクルを介した血管内皮障害の機序解明と動脈硬化性疾患リスクマーカーの探索

熊本大学大学院生命科学研究部 臨床病態解析学講座 神力悟



九州大学大学院医学研究院 保健学部門 塩津弘倫



### 【背景】

マイクロパーティクル(Microparticle ; MP)は、直径 200-1000 nm の大きさで血小板、血管内皮細胞の活性化により細胞膜から放出される細胞外小胞体的一种である。MP は内部に標的となる mRNA に結合し、その不安定化や分解を行うマイクロ RNA(miRNA)を豊富に含んでおり、miRNA の他細胞への受け渡しを介した細胞間コミュニケーションの一端を担っている。

Clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP)は、造血器腫瘍の診断基準には当てはまらないものの、DNA に 2%以上の体細胞変異を有した造血幹細胞のクローン性増殖として定義される。CHIP を有する高齢者は特有の合併症として、高い頻度で心血管疾患を引き起こすことが報告されているが、CHIP と心血管疾患発症の関連は未だ明確ではない。

我々は CHIP の合併症となる心血管疾患の中でも、特に血栓形成を起こす深部静脈血栓症 (Deep vein thrombosis ; DVT)に注目した。本研究では DVT 患者を対象に、血中 MP 内 miRNA が関与する血栓形成メカニズムの解明を目的とし、以下の解析を行った。

### 【方法】

DVT 患者群 15 名 (平均年齢 :  $69.9 \pm 14$  歳)、健常群ボランティア群 15 名 (平均年齢 :  $68.7 \pm 13$  歳)から得られた血漿を対象とした。患者群の基礎疾患の内訳は 15 例中、悪性腫瘍患者が 14 例であった。採血から 1 時間以内に血球を分離した。MP の分離には遠心法、孔径 1000 nm のミリポアフィルタを併用した。MP から抽出した miRNA を対象に 3D-

Gene miRNA Oligo chip (東レ株式会社)によるマイクロアレイを用いた網羅的解析、ならびに RT-qPCR による定量解析を実施した。本研究は熊本大学大学院生命科学研究部ならびに九州大学医系地区倫理審査委員会の許諾を得て行った。

#### 【結果と結語】

2 群間で各種検査値を比較したところ、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリットは DVT 群で有意に低値を示し、D-dimer は DVT 群で有意に高値を示した ( $p < 0.05$ )。

MP より抽出した miRNA をマイクロアレイによる網羅解析を行ったところ、952 種の miRNA を検出した。検出した miRNA を用いたクラスタリングによって健常群と DVT 群の 2 群の分類が可能であることを確認した。発現倍率の変動と統計解析結果を用い、DVT 群での変化が大きい miRNA を特定したところ、17 種の miRNA の有意な変動を認めた。特に変動が大きかった miRNA 上位 10 種のうち、DVT 群で高値を示した miRNA は 2 種、低値を示した miRNA は 8 種であった。

変動を認めた miRNA より、miR-1343-3p、6680-5p、4485-5p を対象に定量解析を行ったところ、miR-4485-5p のみ DVT 群で高値を示し、網羅解析結果と一致した。また、培養細胞と健常群由来 MP の共培養により、細胞内で miR-4485-5p の増加が認められたため、MP 内 miRNA の細胞への移行が示唆された。

以上より、MP 内 miRNA を介した血栓形成メカニズムの存在が示唆された。今後のさらなる MP 内 miRNA 解析は、クローン造血による心血管疾患の発症メカニズムの解明に貢献すると考えられる。

#### 【感想】

この度は日本臨床検査医学会学術推進プロジェクトにてご支援いただき、誠にありがとうございました。本研究では血栓症と MP 内 miRNA の関連の解明を目的に研究を進めました。病態との関連に関しては更なる検討が必要ですが、ご支援のもと様々な解析を行うことができ、検査試料としての MP 内 miRNA の可能性を見いだすことができました。今後の臨床検査の発展に貢献できるよう引き続き研究を進めて参る所存です。末筆ながら本プロジェクトの益々の発展をお祈り申し上げます。