OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	全血 mRNA-microRNA 統合解析に基づく肺炎の新規病態解明
Author(s)	小田, 紗矢香
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/92994
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　　名　（　　小田　紗矢香　）	
論文題名	全血mRNA-microRNA統合解析に基づく肺炎の新規病態解明

論文内容の要旨

【緒言】

近年口腔内細菌は全身疾患への影響が報告されている。その代表的な疾患には心血管疾患や糖尿病、肺炎などが挙げられる。世界疾病負担調査によると肺炎または気管支炎は下気道感染症と定義され、世界の死亡および疾病の主要な原因とされている。また肺炎は敗血症の最大の原因であり、患者の死亡率に大きく影響することが報告されている。現在の肺炎治療は抗菌化学療法が中心であり、肺炎の新規病態解明と治療薬開発が急務である。

RNAはタンパク質に翻訳されるmRNAと翻訳されないノンコーディングRNA（ncRNA）に大別される。ncRNAの一種であるmicroRNA（miRNA）は21-23塩基の短い一本鎖のRNA断片で、生物の恒常性の維持、細胞の生理的機能の制御、細胞分化などに寄与する。miRNAは悪性腫瘍、敗血症、糖尿病などの免疫反応への関与が指摘されている。

近年乳がんや原発性骨髄線維症など様々な慢性炎症性疾患でmRNA-miRNAの統合解析が行われ、病態を制御するmiRNAについての研究が進んでいる。しかし急性炎症性疾患における報告は少なく、肺炎を契機とした敗血症におけるmRNA-miRNAの統合解析に関する報告はない。本研究は肺炎病態で役割を担う細胞シグナルを評価することを目的とし、全血mRNA-miRNAの統合解析を行った。

【方法】

2020年8月～2021年2月の間に大阪大学医学部附属病院高度救命救急センターへ搬送され入院加療を受けた471症例のうち、入院日に血液検査を行い主病名が肺炎と診断された症例を対象とした。同センターの入院患者は全例が搬送時に新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）PCR検査を受けており、本研究の肺炎患者群は全例が陰性と確認された。肺炎の診断は血液検査、胸部CT検査などの臨床所見と肺炎の定義に準じた。肺炎の定義は「成人下気道感染症の管理ガイドライン」に則り、①咳を伴う急性症状、②少なくとも一つ以上の新しい胸部局所症状、③4日以上の発熱、④呼吸困難/頻呼吸の少なくとも1項目が当てはまり、他に明らかな原因がなく、胸部X線写真で新規と思われる肺陰影の所見がある状態とした。また肺炎患者群は、「敗血症および敗血症性ショックの国際コンセンサス定義第3版（Sepsis-3）」において定められた敗血症および敗血症性ショックの診断基準においても評価した。

健常対照群も肺炎患者群と同様に、当研究に対する同意を得た。

＜解析1＞肺炎患者群と健常対照群を比較する解析

mRNAおよびmiRNAのraw countデータをIntegrated Differential Expression and Pathway analysis ver.0.96（iDEP.96）を用いて正規化し、主成分分析を行った。正規化したmRNAおよびmiRNAのデータにおいてカットオフ値を｜log2 fold change｜＞1.2および偽陽性率＜0.05に設定し、発現変動遺伝子を抽出し発現変動解析を行った。

＜解析2＞発現変動したmRNA、miRNAに対する解析

解析1で得た発現変動遺伝子に対しIngenuity Pathway Analysis（IPA 2022 Fall版）を用いたパスウェイ解析を行い、発現変動が大きい細胞シグナルを同定した。同定したシグナルを構成する因子を抽出し、ヒートマップ解析で各因子の発現変動について解析しパスウェイ解析の妥当性について検討した。また上流解析で、肺炎病態を制御すると予測される因子についてデータベースをもとに予測しデータを抽出した。

＜解析3＞miRNAの発現量を比較する解析

臨床転機に準じ実測値より解析することで、病態の重症度に影響する因子を検索した。肺炎患者群を敗血症性ショックの有無で2群に分け、解析1で得られたmiRNAに対しウィルコクソンの順位和検定を行った。

＜解析4＞mRNAとmiRNAの相互作用に関する解析

IPAより解析2パスウェイ解析で得られた細胞シグナルと解析1-3から導き出したmiRNAの関連について解析した。

【結果】

肺炎患者群は14例、健常対照群15例を対象とした。肺炎患者群と健常対照群の年齢の中央値は78歳と55歳で、BMI指数はそれぞれ22.8kg/m^2と21.7kg/m^2であった。肺炎患者14例中11例が人工呼吸管理を受けていた。対象症例に死亡者はいなかった。肺炎患者群は全例がSepsis-3の診断基準を満たし、肺炎を契機とした敗血症と診断された。

肺炎患者群14例のうち6例が敗血症性ショックの診断基準を満たしていた。

＜解析1＞肺炎患者群と健常対照群を比較する解析

①主成分分析

mRNAおよびmiRNAの主成分分析で、肺炎患者群と健常対照群のRNA発現が異なる傾向にあることが示された。

②発現変動解析

RNAシークエンスより、発現変動遺伝子を採取したところ、発現が上昇したmRNAは1209個、発現が減少したmRNAは1461個だった。同様にmiRNAで51個が発現上昇、21個が発現減少していた。またmiRNAが標的とするmRNA（miRNA-targeted mRNA）においては、646個が発現上昇、1274個が発現減少していた。

＜解析2＞発現変動したmRNA、miRNAに対する解析

①パスウェイ解析

mRNAでは PD-1、PD-L1 cancer immunotherapy シグナルの発現が上昇し、Th1 シグナルの発現が減少していた。miRNA-targeted mRNA においても同様の結果が得られた。

②ヒートマップ解析

mRNAにおいてPD-1、PD-L1 cancer immunotherapy シグナルおよびTh1 シグナルを構成する因子について解析すると、いずれも肺炎患者群と健常対照群で発現の変動が分かれていた。またおよびmiRNA-targeted mRNAでも同様の結果が得られたため、パスウェイ解析の妥当性が示された。

③上流解析

mRNAは上流制御因子としてTNF、IL-1β、ID３などが発現上昇した。発現減少した上流制御因子はmiR-6882-5p、SOX4、APOEなどが挙げられた。miRNA-targeted mRNAでも同様に、miR-1275、miR-486-3p、miR-4723-5pなどの発現上昇した上流制御因子と、IL-7R、N6AMT1、PAX5などの発現減少した上流制御因子が示された。

＜解析3＞miRNAの発現量を比較する解析

miR-184、miR-192-5pなど12個のmiRNAに有意差を認めた。12個は全てTh1 シグナルに含まれ、病態を制御していることが示唆された。また12個のmiRNAのうちmiR-184、miR-199a-5pなどの9個はPD-1、PD-L1 cancer immunotherapyシグナルにも重複して関与していた。

＜解析4＞mRNAとmiRNAの相互作用に関する解析

PD-1、PD-L1 cancer immunotherapyシグナルにおける解析により、54個のmiRNAの関与が示唆された。このうち解析2上流解析で示されたmiRNAの中では、miR-1275とmiR-3103-5pが確認された。前者はCD80を活性化し、後者はCD247を不活化するはたらきがある。また解析3で得た12個のmiRNAのうち、miR-148b-5p、miR-184、miR-199a-5p、miR-221-5p、miR-30a-3p、miR-374b-5p、miR-3909、miR-548ae-3p、miR-6503-3pの9個は同シグナルへの関与が示唆された。

Th1シグナルにおけるmRNA-miRNA統合解析では58個のmiRNAの関与が示唆された。このうち解析2上流解析に関与するmiRNAはみとめなかった。一方解析3で得た12個のmiRNAは全てこのシグナルに関与していた。

【結語】

肺炎由来の敗血症病態においてmiRNAはmRNAのRNA干渉作用を介してT細胞の疲弊をきたしていることが全血mRNA-microRNA統合解析により示された。またmiRNAはPD-1、PD-L1 cancer immunotherapyシグナルとTh1シグナルを制御することが示唆された。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　小田　紗矢香　）			
	（職）		氏　名
論文審査担当者	主 査	教授	田中　晋
	副 査	教授	川端　重忠
	副 査	准教授	久保庭　雅恵
	副 査	講師	大嶋　淳

論文審査の結果の要旨

本研究は、細菌性肺炎の病態と制御機構を明らかにする目的で、肺炎患者および健常者から採取した末梢血液の RNA シークエンスで得られた発現変動遺伝子に対して mRNA-miRNA 統合解析を行った。

その結果、肺炎由来の敗血症において急性期に T 細胞の疲弊が起こること、miRNA が PD-1,PD-L1 cancer immunotherapy シグナルおよび Th1 シグナルを制御していることが示唆された。

以上の結果は、細菌性肺炎の治療標的となり得るバイオマーカーの解明に向けて重要な知見を示すものであり、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。