



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

学位論文

全血 mRNA-microRNA 統合解析 に基づく肺炎の新規病態解明

大阪大学大学院歯学研究科口腔科学専攻

顎顔面口腔外科学講座

(指導教員: 田中 晋教授)

小田紗矢香

緒言

近年口腔内細菌はう蝕や歯周炎に留まらず、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[1]。

肺炎は肺胞や遠位気管支樹を侵す急性呼吸器感染症で、咳や発熱、低酸素血症などの呼吸器症状、および胸部画像上の浸潤を臨床的特徴とする[2,3]。世界疾病負担調査(Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study、以下 GBD と記す)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[4]。2019 年の GBD によると、世界 204 カ国において約 4 億 8900 万人が下気道感染症に罹患し、そのうち約 240 万人が死亡している[5]。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[6]。現在の肺炎治療は抗菌化学療法が中心であり、この現状を改善するため肺炎の新規病態解明と治療薬開発が急務となっている。

病原体はそれぞれ病原体関連分子パターン(Pathogen-associated molecular pattern molecules、以下 PAMPs と記す)と呼ばれる分子構造を放出する。PAMPs はパターン認識レセプター(Pathogen recognition receptor、以下 PRR と記す)に認識され、免疫反応を引き起こす[7,8]。また PRR は宿主の傷害細胞から放出される損傷関連分子パターン(Damage-associated molecular patterns、以下 DAMPs と記す)も認識する[8]。PRR は PAMPs や DAMPs を認識すると、宿主の防御反応の第一段階である

自然免疫を促す。次に PRR は樹状細胞の成熟を誘導し、防御反応の第二段階である適応免疫の誘導を促す。Toll 様受容体 (TLR) は最初に同定された PRR で、炎症性サイトカイン、I 型インターフェロン、ケモカイン、抗菌ペプチドを分泌し炎症反応を進行させる[7,8]。

ヒトゲノム配列の公開により、約 30 億塩基対のゲノム DNA 配列の中に占めるタンパク質コード領域はわずか 1~2% であり、ヒトゲノムの大部分を占めているのは反復配列やイントロンなどタンパク質を翻訳していないノンコーディング領域であることが明らかとなった[9]。RNA はタンパク質に翻訳される mRNA とタンパク質に翻訳されないノンコーディング RNA (以下 ncRNA と記す) に大別される。ncRNA は核内では核構造および転写を制御し、細胞質では mRNA の安定性、翻訳、翻訳後修飾を調節することにより、遺伝子発現ネットワークにおける重要な制御因子とされている[10]。ncRNA の一種である microRNA (以下 miRNA と記す) 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、細胞周期、分化、アポトーシスに寄与するとされる。miRNA は敗血症、糖尿病、腫瘍、慢性閉塞性肺疾患、喘息、炎症性腸疾患、統合失調症など、炎症性免疫反応および抗炎症性免疫反応への関与が指摘されている[11]。

近年、乳がんや原発性骨髄線維症、特発性肺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ており、病態を制御する miRNA についての研

究が進んでいる[12-14]。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。

肺炎は細菌性肺炎や人工呼吸器関連肺炎、誤嚥性肺炎などに細分化され、いずれも対策として口腔衛生管理が求められている[15]。レンサ球菌属やコリネバクテリウム属は主要な口腔内細菌の一種であり[16]、肺炎において高頻度で同定され肺炎病態に影響することが示唆されており[17,18]、肺炎は歯科治療と密接に関係している。

したがって肺炎の病態解明は、歯科医療においても重要な役割を果たすと考えられる。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。

研究対象・方法

1. 研究計画および対象症例

本研究は 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[19]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[20]。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[21]。敗血症の診断基準は、①感染臓器(当研究では肺)における致死的な臓器不全を認める、②SOFA スコア(Sequential Organ Failure Assessment、ICU の重症度評価) ≥ 2 点以上の急上昇があるという 2 項目を満たすことである[21]。敗血症性ショックの診断基準は、①十分な輸液負荷にもかかわらず平均血圧 $> 65\text{mmHg}$ を維持するために血管収縮薬を必要と

する、②血中乳酸値が 2mmol/L または 18mg/dL を超えるという 2 項目を満たすことである[21]。

肺炎患者群のうち併存疾患に悪性腫瘍を含む症例が 5 例あり、内訳は乳がん 2 例、甲状腺がん 1 例、右腎細胞がん 1 例、プロラクチン産生下垂体神経内分泌腫瘍(プロラクチノーマ) 1 例だった。5 例とも手術歴があるが、免疫チェックポイント阻害薬を用いた化学療法歴はなかった。

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。

本研究は 2020 年6月に大阪大学医学部附属病院の施設審査委員会の承認を得た。(許可番号:885、Novel Omix Project; Occonomix Project; <http://www.osaka-u-taccc.com/occonomix/index.html>)

2. 対象症例の評価項目

全ての対象症例に対し年齢、性別、肥満度(BMI)、合併症(高血圧症、糖尿病、高脂血症など)を調査した。肺炎患者群と健常対照群間で年齢、性別、BMI に関してそれぞれスチューデントの t 検定を行った。加えて肺炎患者群に関する SOFA スコア、臨床変数(人工呼吸器使用の有無、病院転帰)を電子カルテより収集した。

3. mRNA/miRNA の発現の同定

対象症例の末梢血液に対し PAXgene™ Blood RNA System (BD Bioscience、San Jose、CA、米国)を用いて白血球の全 RNA 分離を行った。すべての血液サンプルはコレクションチューブに採取し、解析まで-30℃で保存した。ライブラリー調製は TruSeq stranded mRNA sample prep kit (Illumina、San Diego、CA、米国)を用いた。

4. RNA シーケンス

検体より採取した白血球の全 RNA に対し、SMART-Seq HT キット(タカラバイオ、Mountain View、CA、米国)を用いて全長 cDNA を合成した。cDNA を PCR で増幅後、シーケンサーNovaSeq 6000 (Illumina、San Diego、CA、米国、大阪大学微生物病研究所 遺伝情報実験センターゲノム解析室受託研究)により RNA シーケンス(以下 RNA-seq と記す)を行った。RNA-seq は RNA 断端の両端をシーケンス対象とする 101bp ペアエンドモードで行った。イルミナライブラリーは、Nextera DNA Library Preparation Kit を用いて調製した。DNA ライブラリーは、MGIEasy Universal Library Conversion Kit (App-A)を用いて DNBSEQ 用のライブラリーに変換した。配列決定は DNBSEQ-G400RS プラットフォームを用い、2×100bp ペアエンドモードで行った。

5. mRNA の塩基配列決定と RNA-seq

配列決定されたリードは、2009 年版のヒトリファレンスゲノム配列(以下 hg19 と記す)にマッピングした[22]。mRNA の配列決定は、TopHat (version 2.0.13)、Bowtie2 (version 2.2.3)、SAMtools (version 0.1.19)を組み合わせで行った。100 万個のマッピングしたフラグメントに対し、エクソンのキロベースあたりの値を Cufflinks (version 2.2.1)より計算した。遺伝子レベルの発現 raw read counts は featureCounts を用いて算出した。miRNA の標的 mRNA(以下 miRNA-targeted mRNA と記す)は、miRNA Target Filter®(QIAGEN)を用いた in silico 解析により予測される miRNA-targeted mRNA の相互作用を同定した。いずれも RNA-seq の結果をもとに発現量を計算し、エクセルデータ上にまとめた。

6. miRNA の塩基配列決定と RNA-seq

miRNA ライブラリーは NEBNext Small RNA Library Prep Set for Illumina (New England Biolabs、Ipswich、MA、米国)を用いて構築し、シーケンサーNovaSeq 6000 により 101bp シングルエンドリードで配列決定した。miRNA-Seq は、デフォルトパラメータを用いた small RNA alignment and small RNA analysis pipeline に従い、Strand NGS version 3.0 software (Strand Life Sciences、Bengaluru、India) を用いて実施した。small RNA-Seq データの解析の前にリードをアダプター配列でトリミングし、hg19

にマッピングした[22]。mRNA と同様に発現量を計算し、エクセルデータ上にまとめた。

7. mRNA および miRNA の統計解析

<解析 1> 肺炎患者群と健常対照群を比較する解析

mRNA の raw count データは Integrated Differential Expression and Pathway analysis ver.0.96 (<http://bioinformatics.sdstate.edu/idep96/>、以下 iDEP.96 と記す)を用いて正規化を行った[23]。ここでの正規化は低発現遺伝子のフィルタリングおよびリードカウントの調整を目的としており、本研究では min.CPM(100 万リードカウントあたりの最低リードカウント)を 0.5 およびライブラリー数を 3 と規定し、3 症例以上で CPM 値が 0.5 以上の遺伝子を解析対象とした。

肺炎患者群と健常対照群の二群間比較である主成分分析を行うにあたり、データを正規分布に近づける必要がある。本研究では iDEP.96 上で EdgeR:log2(CPM+c)を用いてデータを log2 表示に変換した[24]。EdgeR:log2(CPM+c)における定数 c は Pseudo count (擬似カウント)という対数変換の際に 0 が含まれないよう調整する値[25]であり、1 から 10 の範囲で指定できる。この数値が大きいほど、低カウントからのノイズの影響を受けにくくなる。本研究において c の値は先行研究[26]を参考とし 4 に設定した。この設定で主成分分析を行い、肺炎患者群と健常対照群間の mRNA および miRNA に関してそれぞれ比較した。主成分分析では肺炎患者群を青色の三角形、健

常対照群を赤色の丸でそれぞれ表現した。

更に mRNA および miRNA の発現変動遺伝子 (Identifying Differential Expressed Genes、以下 DEGs と記す) を評価するため、limma-voom 法[27]により iDEP.96 から DEGs のデータを抽出した。DEGs の中でもより優位なものを可視化および識別することを目的とし、VolcanoR(<https://huygens.science.uva.nl/VolcanoR/>)を用いて火山型分布図を描出、発現変動解析を実施した[28]。0 を基準とし発現が上昇しているものを赤色、発現が減少しているものを青色で色分けし、それぞれの遺伝子を丸で表現した。本研究では解析 2 以降に向けて適切な遺伝子数を確保するため、カットオフ値を $|\log_2 \text{fold change}| > 1.2$ および偽陽性率 (False Discovery Rate、以下 FDR と記す) < 0.05 に設定した。また変動の大きい遺伝子は、原点(0,0)からのデータのマンハッタン距離($|\Delta X| + |\Delta Y|$)[28]が大きなものから上位をそれぞれ図示した。

miRNA の raw count データも同様の手順および設定で解析を行った。

＜解析 2＞発現変動した mRNA、miRNA に対する解析

健常対照群と比較し、肺炎の病態に有意に関与する細胞シグナル伝達経路を調べる解析を行った。解析 1 で抽出したデータを Ingenuity Pathway Analysis (QIAGEN、IPA 2022 Fall 版、以下 IPA と記す)でスクリーニングした[29]。スクリーニングにおける統計的閾値の設定は z スコアを絶対値 2 以上、 p 値を 0.05 未満、発現比を常用対数

で表示とし、Benjamini-Hochberg 法[30]で多重比較検定補正を行った。 z スコアは細胞シグナルと上流制御因子の活性化の指標であり、強く発現上昇を予測するものは z スコア ≥ 2 に対応し、強く発現減少を予測するものは z スコア ≤ -2 に対応する[31]。

パスウェイは複数の生体分子の相互作用から構成され生体活動を維持していくのに必要な生命現象を制御している生物学的過程や経路のことを指す[32]。IPA のパスウェイ解析で mRNA および miRNA-targeted mRNA の機能的特徴を評価した。それぞれ最も発現上昇しているシグナルと、最も発現減少しているシグナルを選定した。

次にパスウェイ解析で得られた 2 つのシグナルに対しヒートマップ解析を行った。ヒートマップ解析は症例ごとの因子の発現変動を図示するものであり、高発現の因子を赤色、低発現の因子を青色で表現した。ヒートマップ解析で各因子が全体的に発現変動し、その変動が肺炎患者群と健常対照群で異なる傾向が示されると、パスウェイ解析結果の妥当性が裏づけられる。IPA よりそれぞれのシグナルを構成する因子を抽出し、ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>)を用いて検証した[33]。

次に IPA を用い、肺炎病態の上流制御因子を既存の報告から推測する上流解析を行った。上流解析では健常対照群と比較し、肺炎患者群で発現が上昇している遺伝子やタンパク質を解析対象とした。

＜解析 3＞miRNA の発現量を比較する解析

解析 2 上流解析は既存の報告からの予測で解析していたため、実測値と必ずしも一致する結果ではない。そのため解析 3 では RNA-seq のデータを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。

本研究の肺炎患者群における肺炎の重症度は、入院加療となった時点で大きな差がない[34]。敗血症に関しては、敗血症性ショックの有無で重症度の違いをみとめた。

したがって解析 3 は敗血症性ショックの有無をアウトカムに設定し、解析 1 で示された miRNA 72 個に対しノンパラメトリック検定であるウィルコクソンの順位和検定を行った[35]。本検定で有意差を認めた miRNA に対し、JMP® Pro 17(JMP Statistical Discovery LLC SAS Campus Drive Cary, North Carolina, 米国)を用いて miRNA の発現量について検証した。

＜解析 4＞mRNA と miRNA の相互作用に関する解析

解析 1、2 の結果を総合的に利用し IPA で PD-1、PD-L1 cancer immunotherapy シグナルについて解析を行った。同シグナル内で mRNA が関与する因子を図示し、解析 1 で抽出した miRNA の中から各因子の制御に関与すると構造上推測されたものを図示した。またこの解析で示された miRNA のうち、解析 2 上流解析で検出された miRNA との関連を評価した。解析 3 で検出された miRNA も同様に、この解析で示さ

れた miRNA との関連を評価した。

同様の解析を Th1 シグナルについても行い、このシグナルにおける miRNA の影響
および解析 2、3 で検出された miRNA との関連について評価した。

結果

<患者背景>

表 1 に示すように、対象症例は肺炎患者群 14 例、健常対照群 15 例とした。

表 2 に示すように、肺炎患者群と健常対照群の年齢の中央値はそれぞれ 78 歳と 55 歳であり有意差($p = 0.00003$)があった。BMI はそれぞれ 21.8kg/m^2 、 21.7kg/m^2 とであり有意差はなかった($p = 0.91$)。肺炎患者群で男性が 10 例、女性が 4 例であり、健常対照群で男性が 8 例、女性が 7 例であり、性別に有意差はなかった($p = 0.33$)。

肺炎患者群は 14 例のうち 11 例が人工呼吸管理を受けた。肺炎患者群は 14 例全て 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[21]。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た[21]。

対象症例 29 例において死亡例はなかった。

<解析 1>肺炎患者群と健常対照群を比較する解析

主成分分析

mRNA は第一主成分が肺炎患者群で減少傾向にあり、第二主成分が健常対照群で二極化していた。健常対照群 15 例のうち第二主成分がプラスであるもの 12 例、マイナスであるもの 3 例についてスチューデントの t 検定を行ったところ、年齢に有意差($p = 0.0041$)を認めた。第二主成分がマイナスの 3 例は全て若年者であることから、第

二主成分は年齢と関連する内容であることが示唆された。

miRNA は第一主成分が肺炎患者群で減少傾向にあり、第二主成分に関しては 2 群間で類似した傾向があった。以上より mRNA、miRNA の発現は肺炎患者群と健常対照群は異なる傾向であることが示された(図 1A-B)。

発現変動解析

火山型分布図において 13916 個の mRNA、1797 個の miRNA、および 1920 個の miRNA-targeted mRNA が DEGs として抽出された。火山型分布図のカットオフ値を $|\log_2 \text{Fold Change}| > 1.2$ 、 $\text{FDR} < 0.05$ で設定したところ、DEGs は mRNA で発現上昇 1209 個と発現低下 1461 個(図 2A)、miRNA で発現上昇 51 個と発現低下 21 個(図 2B)、miRNA-targeted mRNA で発現上昇 646 個と発現低下 1274 個(図 2C)が示された。mRNA と miRNA は原点からマンハッタン距離が最大のものから上位 10 個、miRNA-targeted mRNA は原点からマンハッタン距離が最大のものから上位 5 個を図中に記載した(図 2A-C)。

<解析 2> 発現変動した mRNA、miRNA に対する解析

パスウェイ解析

mRNA のパスウェイ解析は 30 個の細胞シグナルが発現上昇し 33 個の細胞シグナ

ルが発現減少した。それぞれ上位 10 個を示す(図 3A-B)。発現上昇の中では PD-1、PD-L1 cancer immunotherapy シグナルが最も有意な p 値を示した (Benjamini-Hochberg 調整 p 値= 5.2E-01、 z スコア=3.266)。発現減少の中では Th1 シグナルが最も有意な p 値を示した (Benjamini-Hochberg 調整 p 値= 7.7E-01、 z スコア=-2.694)。一方免疫反応に関わる Th2 シグナルは有意差があるものの (Benjamini-Hochberg 調整 p 値= 7.7E-01)、 z スコアが絶対値 2 以上の基準を満たしておらず除外した。また病原体感染により細胞障害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte、以下 CTL と記す) の分化が促進することが明らかになっている[36]が、本研究では CTL シグナルおよび Th17 シグナルに関しては明らかな有意差がなく、 z スコアが絶対値 2 以上の基準も満たしておらず除外した。

miRNA-targeted mRNA のパスウェイ解析は、6 個のシグナルが発現上昇し 52 個のシグナルが発現減少した。発現上昇した 6 個全てのシグナル(図 3C)と発現減少の上位 10 個のシグナル(図 3D)を示す。発現上昇の中では PD-1、PD-L1 cancer immunotherapy シグナルが最も有意な p 値を示した (Benjamini-Hochberg 調整 p 値= 6.6E-01、 z -score=2.985)。発現減少の中では Th1 シグナルが最も有意な p 値を示した (Benjamini-Hochberg 調整 p 値= 8.9E-01、 z -score=-3.024)。mRNA と同様に Th2 シグナルは有意差があるものの (Benjamini-Hochberg 調整 p 値= 9.E-01)、 z スコアが絶対値 2 以上の基準を満たしていなかったため除外した。また CTL シグナルおよび

Th17 シグナルに関しては明らかな有意差がなく、 z スコアが絶対値 2 以上の基準も満たしておらず、本研究では明らかな変動は確認されなかった。

以上より、パスウェイ解析で mRNA および miRNA-targeted mRNA において PD-1、PD-L1 cancer immunotherapy シグナルおよび Th1 シグナルが大きく変動していることが示された。

ヒートマップ解析

mRNA では 28 個の因子が PD-1、PD-L1 cancer immunotherapy シグナルに関与し、それぞれの変動は肺炎患者群と健常対照群で概ね分かれていた(図 4A)。PD-1 の発現は減少し、シグナルの key となるがん抑制遺伝子の PTEN[37]が上昇している。各因子の全体的な変動をベクトルの総和として解析すると、シグナルそのものは発現上昇(z スコア ≥ 2)しておりパスウェイ解析と矛盾しない。Th1 シグナルでは 37 個の因子が関与し、それぞれの変動は肺炎患者群と健常対照群で概ね分かれていた(図 4B)。Th1 シグナルでは key となる TBX21 (以下 T-bet と示す)の減少[38]が見られ、シグナルそのものは発現減少(z スコア ≤ -2)しておりパスウェイ解析と矛盾しない。

miRNA-targeted mRNA では 26 個の因子が PD-1、PD-L1 cancer immunotherapy シグナルに関与し(図 4C)、34 個の因子が関与 Th1 シグナルに関与していた。いずれも変動は肺炎患者群と健常対照群で概ね分かれていた(図 4D)。また mRNA と同

様に PTEN および T-bet の変動も観察された。

以上よりパスウェイ解析の妥当性が示された。

上流解析

IPA より mRNA の上流制御因子を解析したところ、TNF、IL-1 β 、ID3などが発現上昇していた。そのうち上位 20 個を図 5A に示した。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、同様に上位 20 個を図 5B に示した。

miRNA-targeted mRNA でも同様に、miR-1275、miR-486-3p、miR-4723-5p など発現上昇した上流制御因子の上位 20 個を図 5C に示した。また IL-7R、N6AMT1、PAX5 など発現減少した上流制御因子の上位 20 個を図 5D に示した。

<解析 3>miRNA の発現量を比較する解析

肺炎患者群 14 例は、敗血症性ショックの有無により重症肺炎患者群 6 例と非重症肺炎患者群 8 例に分かれた。解析 1 で示された 72 個の miRNA のうち、ウィルコクソンの順位和検定で miR-148a-5p、miR-148b-5p、miR-184、miR-192-5p、miR-199a-5p、miR-221-5p、miR-30a-3p、miR-374b-5p、miR-3909、miR-4746-5p、miR-548ae-3p、miR-6503-3p の 12 個に有意差を認めた。それぞれのデータ分布を図 6 に示した。

<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。図 7 は PD-1、PD-L1 cancer immunotherapy シグナルのうち T 細胞と直接関わる因子のみを抽出したため 30 個の miRNA が図示されており、解析 3 からは miR-184、miR-221-5p、miR-374b-5p、miR-3909 の 4 個が示された。

Th1 シグナルにおける解析では 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 miR-148a-5p、miR-148b-5p、miR-184、miR-192-5p、miR-199a-5p、miR-221-5p、miR-30a-3p、miR-374b-5p、miR-3909、miR-4746-5p、miR-548ae-3p、miR-6503-3p の miRNA は全てこのシグナルに関与していた。図 8 は Th1 シグナルの中で Th1 細胞と直接関係する因子を抽出しており、30 個の miRNA が示された。解析 3 からは miR-148a-5p、miR-184、miR-199a-5p、miR-30a-3p、miR-374b-5p、miR-4746-5p、miR-548ae-3p の 7 個が示された。

考察

1.肺炎における免疫応答

PRR は PAMPs と DAMPs の両方を認識し、免疫反応を引き起こす[7,8]。ほとんどの感染症では、病原体は自然免疫系によって減少し最終的には排除される。しかし病原体が持続的に存在すると、免疫応答が不良になることから感染症が重症化し、敗血症を引き起こす[39]。解析 2 のパスウェイ解析において肺炎患者群の mRNA および miRNA-targeted mRNA は共に、主として自然免疫を司る細胞シグナルが変動していた。細菌感染に対し免疫応答が起きたことで発現上昇した細胞シグナルが存在する一方、感染の遷延により免疫細胞の疲弊が徐々に進むことで Th1 シグナルのように発現減少したものが混在すると考えられる(図 3A-D)。本研究では自己免疫疾患や慢性炎症性疾患の予防や抗腫瘍免疫の抑制に関わる制御性 T 細胞 (Regulatory T cell、以下 T-reg と記す)[40]の直接的な変動は認めなかったが、サンプル数を増やし新たなコホートを用いた検証が必要と考えられる。

パスウェイ解析の発現上昇した細胞シグナルに関しては、mRNA と miRNA-targeted mRNA で Inflammasome シグナルが、mRNA では加えて triggering receptor expressed on myeloid cells-1 シグナル(以降 TREM1 シグナルと記す)も変動した。

Inflammasome は IL-1 β や IL-18 のように強力な炎症性サイトカインの産生と分泌を細かく制御し、敗血症病態に関与する[41]とされている。TREM1 シグナルは好中

球、成熟単球、マクロファージの表面に存在する糖タンパク質であり敗血症において変動することが知られている[11]さらに mRNA においては好中球細胞外トラップ (Neutrophil extracellular traps、以下 NETs と記す)に関するシグナルも上昇している。好中球は全身性血液感染により活性化すると NETs を放出し、病原体を捕捉し殺すはたらきがある[42]。NETs は T 細胞の疲弊と機能不全を引き起こし、その反応は PD-1/PD-L1 軸を介している可能性がある指摘されている[43]。以上より Inflammasome シグナル、TREM1 シグナル、NETs シグナルの上昇により、重篤な全身性炎症反応が惹起されていることが示された(図 3A-D)。

2.肺炎由来の敗血症における血液を用いた遺伝子発現の研究

プログラム細胞死タンパク質 1(PD-1)は T 細胞の活性を調節する。プログラム細胞死リガンド 1(PD-L1)は免疫反応の共抑制因子とされる膜貫通型のタンパク質で、PD-1 と結合して PD-1 陽性細胞の増殖を抑えサイトカイン分泌を阻害する[44]。PD-1、PD-L1 cancer immunotherapy シグナルは抗原特異的 T 細胞のアポトーシスを活性化し T-reg のアポトーシスを抑制することにより、免疫反応抑制と自己寛容促進に重要な役割を担っており、がん治療の標的となる免疫チェックポイントとして着目されている[45]。

重症の敗血症患者や敗血症性ショック患者においても、T 細胞上の PD-1 および

単球上の PD-L1 の発現上昇について報告がなされている。PD-1、PD-L1 cancer immunotherapy シグナルは疲弊した T 細胞に作用し、免疫抑制分子を放出することで敗血症による免疫抑制に重要な役割を担うことが明らかになっている[39,46-48]。

一方敗血症の患者において Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞の機能が抑制され、死亡例では T 細胞の枯渇と T 細胞疲弊がみられるとの報告がある[48]。本研究では Th2 細胞、CTL、Th17 細胞に関するシグナルは除外したが、Th1 細胞機能の抑制が顕著である。また Th1 細胞および単球の反応が抑制されることにより、TNF、IL-1 β 、IL-6 などの炎症性サイトカインの発現が減少し、抗炎症環境がさらに強化されるとの報告もある[39]。解析 2 の上流解析でも PD-1、PD-L1 cancer immunotherapy シグナルの TNF や、Th1 シグナルの IL-6 など炎症性サイトカインの変動が確認されており、T 細胞疲弊や抗炎症環境の強化が起きていることが示唆された(図 5A-D)。

感染症とヒト白血球抗原 (HLA) には多様な関連性の報告があり、中でも敗血症は HLA-DQB1 との関連が報告されている[49]。Th1 および Th2 細胞の特異的転写因子である T-bet および GATA-3[38]は、敗血症患者において正常対照群と比較して有意に低いとの報告もある[50]。解析 2 ヒートマップ解析において mRNA における PD-1、PD-L1 cancer immunotherapy シグナルの HLA-DQB1 の発現は健常対照群と比較し有意に減少し、Th1 シグナルにおいて T-bet と GATA-3 の発現は健常対照群と比較し有意に減少している。miRNA-targeted mRNA でも同様の傾向を示すことから、

HLA-DQB1、T-bet、GATA-3 の変動に miRNA の関与が示唆された(図 4A-D)。

3.肺炎由来の敗血症における T 細胞疲労に影響する key miRNA について

先行研究で miR-199a-5p は PD-1 の発現を抑制し、肺がんや口腔扁平上皮癌などの腫瘍性病変の進行に関与すると明らかにされている[51,52]。また解析 3 の中で miRNA 発現量の最も多かった miR-30a-3p は敗血症での細胞アポトーシスへの関与が報告されている[53]。miR-192-5p も敗血症による心筋損傷や急性腎障害の際に発現が増加し、全身性炎症反応症候群と比較し敗血症症例で上昇するとされる[54]。

解析 1-4 の結果は先行研究と矛盾しておらず、解析 3 で有意差のある miRNA (図 6) は肺炎由来の敗血症病態の制御において key miRNA の候補となりうることを示唆された。中でも miR-184 に着目すると、先行研究では口腔がんや肺がんなどの制御因子と推測される[55]一方、市中肺炎の診断でバイオマーカーとして機能する可能性も示唆されている[56]。本研究において miR-184 は一貫して発現上昇しているが、PD-1、PD-L1 cancer immunotherapy シグナルにおいて IL-2 の発現を抑制するはたらきがあり、Th1 シグナルでは増殖因子受容体結合タンパク質 2 (GRB2) の発現を抑制するはたらきがある。このことから miRNA のはたらきは複数あり、複合的に細胞シグナルへ介入していることが示唆された。key miRNA は将来核酸薬などの創薬におけるターゲットや、バイオマーカーへの応用が期待される。今後は軽度の肺炎患者のコホ

ートや、肺炎由来の敗血症で死亡症例を含むコホート、敗血症の他の感染源に着目したコホートなど様々な側面から解析を加え、それぞれの病態に特異的な miRNA について明らかにするとともに、miRNA のはたらきに関する検証も必要と考えられる。

本研究の限界点

本研究は単施設で検体採取しておりサンプルサイズが比較的小さい。また肺炎患者群について起炎菌での分類を行っていない。これは検体採取が新型コロナウイルス感染症拡大(第2波～第3波)の時期にあたり、喀痰検査による起炎菌同定が困難であったことに起因しているため、今後の研究では同定可能と考えられる。さらに肺炎患者群と健常対照群で年齢に有意差がある。今後は多施設において対象症例をより多くすることで、さらに詳細な解析が可能になると考えられる。

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。

謝辞

本研究の遂行にあたり、指導教員として多大なるご指導とご鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科 顎顔面口腔外科学講座 田中 晋教授に深甚なる謝意を表します。

本研究を遂行する貴重な機会を与えていただき、熱心なご指導とご鞭撻を賜りました大阪大学大学院医学研究科 生体統御医学講座 救急医学教室 織田 順教授、松本 寿健特任助教に心より感謝し、篤くお礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、RNA シークエンス解析を実施し、データ解析に関してさまざまなご教示とご高閲を賜りました大阪大学免疫学フロンティアセンター ヒト免疫学講座 奥崎 大介特任准教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、ひとかたならぬご支援を賜りました大阪大学大学院医学研究科 生体統御医学講座 救急医学教室の諸兄姉に深謝いたします。

最後に、本研究の遂行にあたり特別なご配慮をいただきました大阪大学大学院歯学研究科 顎顔面口腔外科学講座の教室員諸兄姉に感謝申し上げます。

引用文献

- [1] Li, X., Kolltveit, K.M., Tronstad, L., and Olsen, I. (2000) :Systemic diseases caused by oral infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 13 (4), 547–58.
- [2] Torres, A., Cilloniz, C., Niederman, M.S., Menéndez, R., Chalmers, J.D., Wunderink, R.G., et al. (2021) :Pneumonia. *Nature Reviews Disease Primers*, 7 (1), 25.
- [3] Rider, A.C. and Frazee, B.W. (2018) :Community-Acquired Pneumonia. *Emergency Medicine Clinics of North America*, 36 (4), 665–683.
- [4] Troeger, C., Blacker, B., Khalil, I.A., Rao, P.C., Cao, J., Zimsen, S.R.M., et al. (2018) :Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Infectious Diseases*, 18 (11), 1191–1210.
- [5] Safiri, S., Mahmoodpoor, A., Kolahi, A.-A., Nejadghaderi, S.A., Sullman, M.J.M., Mansournia, M.A., et al. (2022) :Global burden of lower respiratory infections during the last three decades. *Frontiers in Public Health*, 10, 1028525.
- [6] Abe, T., Ogura, H., Kushimoto, S., Shiraishi, A., Sugiyama, T., Deshpande, G.A., et al. (2019) :Variations in infection sites and mortality rates among patients in intensive care units with severe sepsis and septic shock in Japan. *Journal of Intensive Care*, 7 (1), 28.
- [7] Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003) :Toll-Like Receptors. *Annual Review of Immunology*, 21 (1), 335–376.
- [8] Kawai, T. and Akira, S. (2011) :Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity*, 34 (5), 637–650.
- [9] Gregory, T.R. (2005) :Synergy between sequence and size in Large-scale genomics. *Nature Reviews Genetics*, 6 (9), 699–708.
- [10] Yao, R.W., Wang, Y., and Chen, L.L. (2019) :Cellular functions of long noncoding RNAs. *Nature Cell Biology*, 21 (5), 542–551.
- [11] Stelmasiak, M. and Słotwiński, R. (2020) :Infection-induced innate antimicrobial response disorders: from signaling pathways and their modulation to selected biomarkers. *Central European Journal of Immunology*, 45 (1), 104–116.
- [12] Zhu, K., Xu, A., Xia, W., Li, P., Han, R., Wang, E., et al. (2021) :Integrated analysis of the molecular mechanisms in idiopathic pulmonary fibrosis. *International Journal of Medical Sciences*, 18 (15), 3412–3424.
- [13] Enerly, E., Steinfeld, I., Kleivi, K., Leivonen, S.K., Aure, M.R., Russnes, H.G., et al. (2011) :miRNA-mRNA Integrated Analysis Reveals Roles for miRNAs in Primary

Breast Tumors. *PLoS ONE*, **6** (2), e16915.

- [14] Norfo, R., Zini, R., Pennucci, V., Bianchi, E., Salati, S., Guglielmelli, P., et al. (2014) :miRNA-mRNA integrative analysis in primary myelofibrosis CD34+ cells: role of miR-155/JARID2 axis in abnormal megakaryopoiesis. *Blood*, **124** (13), e21-32.
- [15] van der Maarel-Wierink, C. D., Vanobbergen, J. N., Bronkhorst, E. M., Schols, J. M., and de Baat, C. (2013). Oral health care and aspiration pneumonia in frail older people: a systematic literature review. *Gerodontology*, **30**(1), 3–9.
- [16] Kuboniwa, M., Amano, A., Kimura, K.R., Sekine, S., Kato, S., Yamamoto, Y., et al. (2004) :Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. *Oral Microbiology and Immunology*, **19** (3), 168–176.
- [17] Yang, K., Kruse, R.L., Lin, W. V., and Musher, D.M. (2018) :Corynebacteria as a cause of pulmonary infection: a case series and literature review. *Pneumonia*, **10** (1), 10.
- [18] Yamasaki, K., Kawanami, T., Yatera, K., Fukuda, K., Noguchi, S., Nagata, S., et al. (2013) :Significance of Anaerobes and Oral Bacteria in Community-Acquired Pneumonia. *PLoS ONE*, **8** (5), e63103.
- [19] Sethuraman, N., Jeremiah, S.S., and Ryo, A. (2020) :Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA*, **323** (22), 2249.
- [20] Woodhead, M., Blasi, F., Ewig, S., Garau, J., Huchon, G., Ieven, M., et al. (2011) :Guidelines for the management of adult lower respiratory tract infections - Full version. *Clinical Microbiology and Infection*, **17**, E1–E59.
- [21] Singer, M., Deutschman, C.S., Seymour, C.W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., et al. (2016) :The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, **315** (8), 801.
- [22] Pan, B., Kusko, R., Xiao, W., Zheng, Y., Liu, Z., Xiao, C., et al. (2019) :Similarities and differences between variants called with human reference genome HG19 or HG38. *BMC Bioinformatics*, **20** (S2), 101.
- [23] Ge, S.X., Son, E.W., and Yao, R. (2018) :iDEP: an integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics*, **19** (1), 534.
- [24] Robinson, M.D., McCarthy, D.J., and Smyth, G.K. (2010) :edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **26** (1), 139–40.
- [25] Anders, S. and Huber, W. (2010) :Differential expression analysis for sequence count

- data. *Genome Biology*, 11 (10), R106.
- [26] Togami, Y., Matsumoto, H., Yoshimura, J., Matsubara, T., Ebihara, T., Matsuura, H., et al. (2022) :Significance of interferon signaling based on mRNA-microRNA integration and plasma protein analyses in critically ill COVID-19 patients. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 29, 343–353.
 - [27] Law, C.W., Chen, Y., Shi, W., and Smyth, G.K. (2014) voom: precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome biology*, 15(2), R29.
 - [28] Goedhart, J. and Luijsterburg, M.S. (2020) :VolcanoR is a web app for creating, exploring, labeling and sharing volcano plots. *Scientific Reports*, 10 (1), 20560.
 - [29] Krämer, A., Green, J., Pollard, J., and Tugendreich, S. (2014) :Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics*, 30 (4), 523–530.
 - [30] Thissen, D., Steinberg, L., and Kuang, D. (2002) :Quick and Easy Implementation of the Benjamini-Hochberg Procedure for Controlling the False Positive Rate in Multiple Comparisons. *Journal of Educational and Behavioral Statistics*, 27 (1), 77–83.
 - [31] Chaya, T., Maeda, Y., Sugimura, R., Okuzaki, D., Watanabe, S., Varner, L.R., et al. (2022) :Multiple knockout mouse and embryonic stem cell models reveal the role of miR-124a in neuronal maturation. *Journal of Biological Chemistry*, 298 (9), 102293.
 - [32] Khatri, P., Sirota, M., and Butte, A.J. (2012) :Ten Years of Pathway Analysis: Current Approaches and Outstanding Challenges. *PLoS Computational Biology*, 8 (2), e1002375.
 - [33] Metsalu, T. and Vilo, J. (2015) :ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Research*, 43 (W1), W566–W570.
 - [34] Ilg, A., Moskowitz, A., Konanki, V., Patel, P. V., Chase, M., Grossestreuer, A. V., et al. (2019) :Performance of the CURB-65 Score in Predicting Critical Care Interventions in Patients Admitted With Community-Acquired Pneumonia. *Annals of Emergency Medicine*, 74 (1), 60–68.
 - [35] Wilcoxon, F. (1945) :Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bulletin*, 1 (6), 80.
 - [36] Ito, D., Nojima, S., Nishide, M., Okuno, T., Takamatsu, H., Kang, S., et al. (2015) :mTOR Complex Signaling through the SEMA4A–Plexin B2 Axis Is Required for Optimal Activation and Differentiation of CD8⁺ T Cells. *The Journal of Immunology*, 195 (3), 934–943.
 - [37] Cretella, Digiacomo, Giovannetti, and Cavazzoni (2019) :PTEN Alterations as a

- Potential Mechanism for Tumor Cell Escape from PD-1/PD-L1 Inhibition. *Cancers*, 11 (9), 1318.
- [38] Kanhere, A., Hertweck, A., Bhatia, U., Gökmen, M.R., Perucha, E., Jackson, I., et al. (2012) :T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements. *Nature Communications*, 3 (1), 1268.
 - [39] Torres, L.K., Pickkers, P., and van der Poll, T. (2022) :Sepsis-Induced Immunosuppression. *Annual Review of Physiology*, 84 (1), 157–181.
 - [40] Vignali, D.A.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008) :How regulatory T cells work. *Nature Reviews. Immunology*, 8 (7), 523–32.
 - [41] Danielski, L.G., Giustina, A. Della, Bonfante, S., Barichello, T., and Petronilho, F. (2020) :The NLRP3 Inflammasome and Its Role in Sepsis Development. *Inflammation*, 43 (1), 24–31.
 - [42] Morita, C., Sumioka, R., Nakata, M., Okahashi, N., Wada, S., Yamashiro, T., et al. (2014) :Cell Wall-Anchored Nuclease of *Streptococcus sanguinis* Contributes to Escape from Neutrophil Extracellular Trap-Mediated Bacteriocidal Activity. *PLoS ONE*, 9 (8), e103125.
 - [43] Fang, Q., Stehr, A.M., Naschberger, E., Knopf, J., Herrmann, M., and Stürzl, M. (2022) :No NETs no TIME: Crosstalk between neutrophil extracellular traps and the tumor immune microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 13, 1075260.
 - [44] Ghosh, C., Luong, G., and Sun, Y. (2021) :A snapshot of the PD-1/PD-L1 pathway. *Journal of Cancer*, 12 (9), 2735–2746.
 - [45] Han, Y., Liu, D., and Li, L. (2020) :PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *American Journal of Cancer Research*, 10 (3), 727–742.
 - [46] Zhang, Y., Li, J., Lou, J., Zhou, Y., Bo, L., Zhu, J., et al. (2011) :Upregulation of programmed death-1 on T cells and programmed death ligand-1 on monocytes in septic shock patients. *Critical Care*, 15 (1), R70.
 - [47] Boomer, J.S., To, K., Chang, K.C., Takasu, O., Osborne, D.F., Walton, A.H., et al. (2011) :Immunosuppression in Patients Who Die of Sepsis and Multiple Organ Failure. *JAMA*, 306 (23), 2594.
 - [48] van der Poll, T., van de Veerdonk, F.L., Scicluna, B.P., and Netea, M.G. (2017) :The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nature Reviews Immunology*, 17 (7), 407–420.
 - [49] Nudel, R., Allesøe, R.L., Thompson, W.K., Werge, T., Rasmussen, S., and Benros, M.E. (2021) :A large-scale investigation into the role of classical HLA loci in multiple types of severe infections, with a focus on overlaps with autoimmune and mental disorders. *Journal of Translational Medicine*, 19 (1), 230.

- [50] Xu, J., Li, J., Xiao, K., Zou, S., Yan, P., Xie, X., et al. (2020) :Dynamic changes in human HLA-DRA gene expression and Th cell subsets in sepsis: Indications of immunosuppression and associated outcomes. *Scandinavian Journal of Immunology*, **91** (1), e12813.
- [51] Ahmadi, A., Khansarinejad, B., Hosseinkhani, S., Ghanei, M., and Mowla, S.J. (2017) :miR-199a-5p and miR-495 target GRP78 within UPR pathway of lung cancer. *Gene*, **620**, 15–22.
- [52] Jiang, X., Liu, J., Li, S., Jia, B., Huang, Z., Shen, J., et al. (2020) :CCL18-induced LINC00319 promotes proliferation and metastasis in oral squamous cell carcinoma via the miR-199a-5p/FZD4 axis. *Cell Death & Disease*, **11** (9), 777.
- [53] Yang, S., Wang, Y., Gao, H., and Wang, B. (2017) :MicroRNA-30a-3p overexpression improves sepsis-induced cell apoptosis *in vitro* and *in vivo* via the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **15** (2), 2081–2087.
- [54] Ren, F., Yao, Y., Cai, X., and Fang, G. (2021) :Emerging Role of MiR-192-5p in Human Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, **12**, 614068.
- [55] Manikandan, M., Deva Magendhra Rao, A.K., Rajkumar, K.S., Rajaraman, R., and Munirajan, A.K. (2015) :Altered levels of miR-21, miR-125b-2*, miR-138, miR-155, miR-184, and miR-205 in oral squamous cell carcinoma and association with clinicopathological characteristics. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, **44** (10), 792–800.
- [56] Zhao, T., Zheng, Y.L., Hao, D.Z., Jin, X., Luo, Q.Z., Guo, Y.T., et al. (2019) :Blood circRNAs as biomarkers for the diagnosis of community-acquired pneumonia. *Journal of Cellular Biochemistry*, **120** (10), 16483–16494.

表 1 研究デザイン

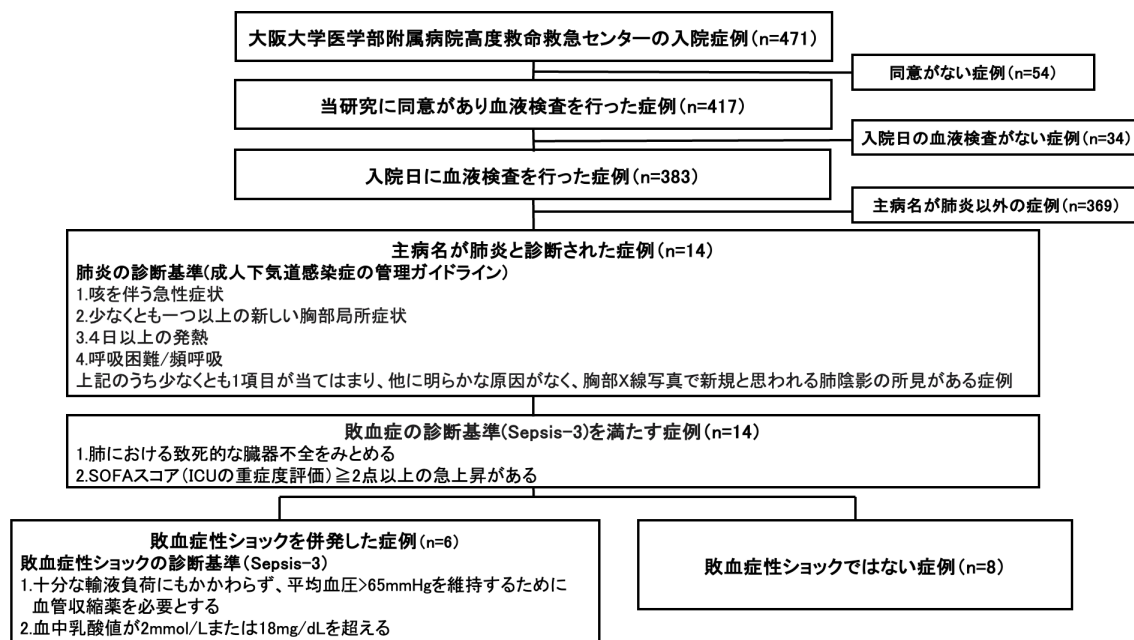
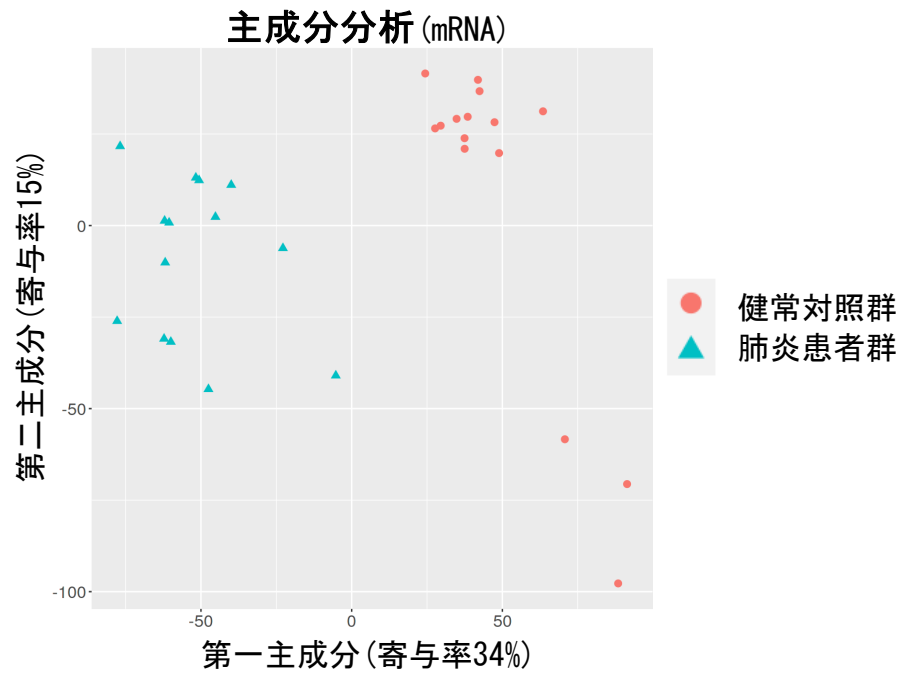


表 2 患者背景

患者背景			
背景	健常対照群 (n=15)	肺炎患者群 (n=14)	p value
年齢、中央値、四分位範囲	55(27-72)	78(59-96)	<.001
性別、男性 (%)	8(53.3)	10(71.4)	0.33
BMI、中央値、四分位範囲	21.7(18.8-29.4)	21.8(18.8-28.7)	0.911
併存疾患			
糖尿病	1(6.3)	2(14.3)	
高血圧症	2(12.5)	4(28.6)	
高脂血症	6(37.5)	1(7.1)	
高尿酸血症	1(6.3)	0(0)	
慢性心疾患	1(6.3)	1(7.1)	
慢性肺疾患	0(0)	1(7.1)	
悪性新生物	0(0)	5(35.7)	
死亡率	0(0)	0(0)	
人工呼吸器使用率、n(%)		11(78.6)	
SOFA スコア、中央値、四分位範囲		5(3-9)	
BMI,body mass index; SOFA,Sequential Organ Failure Assessment;			

A



B

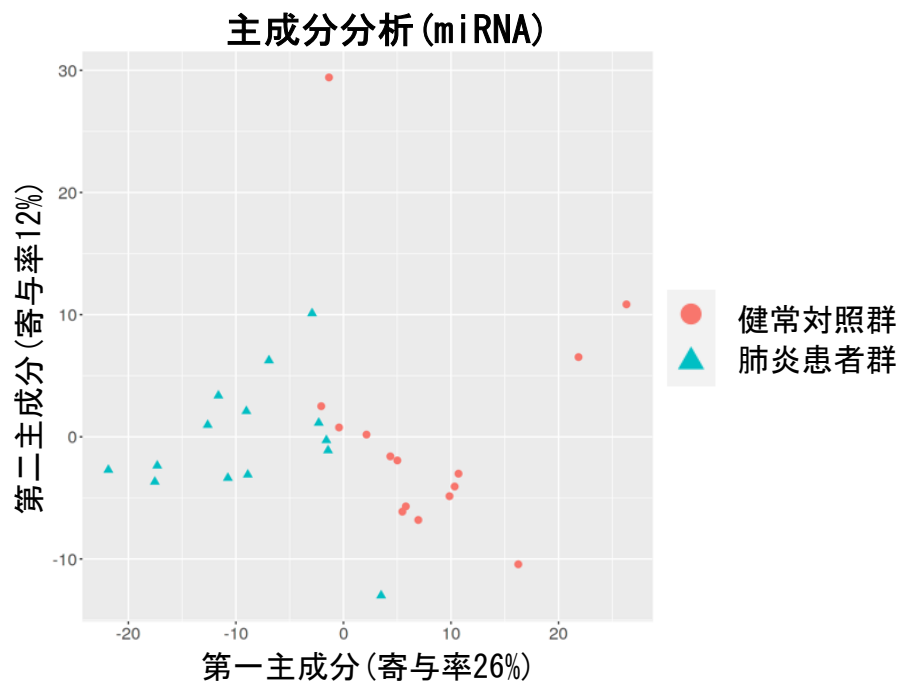
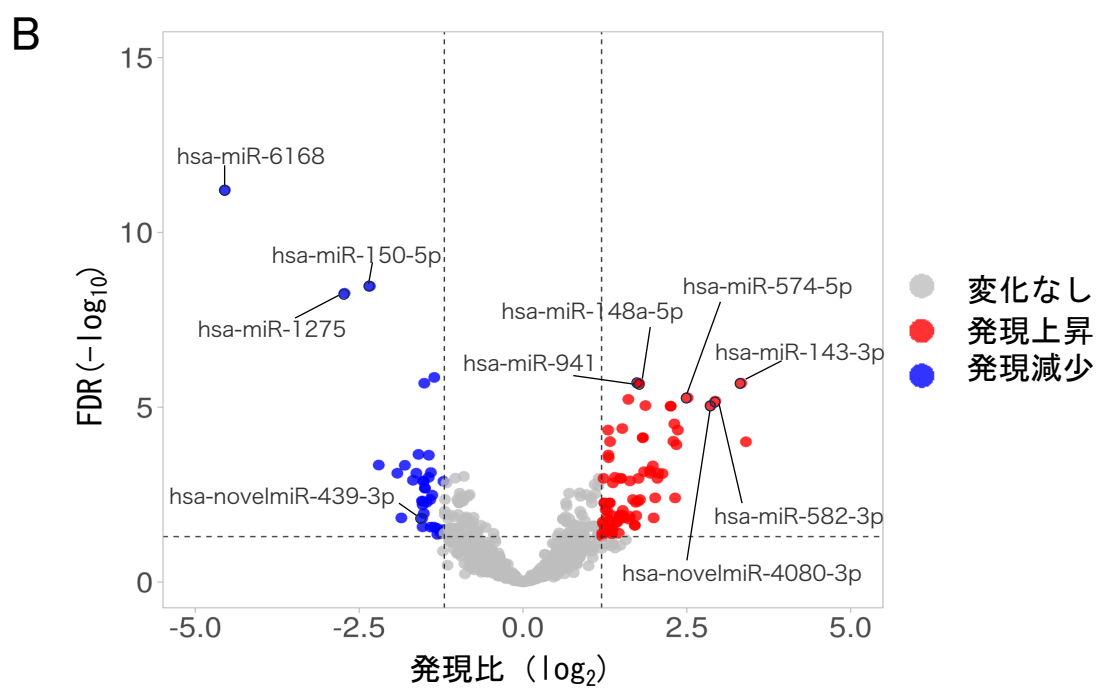
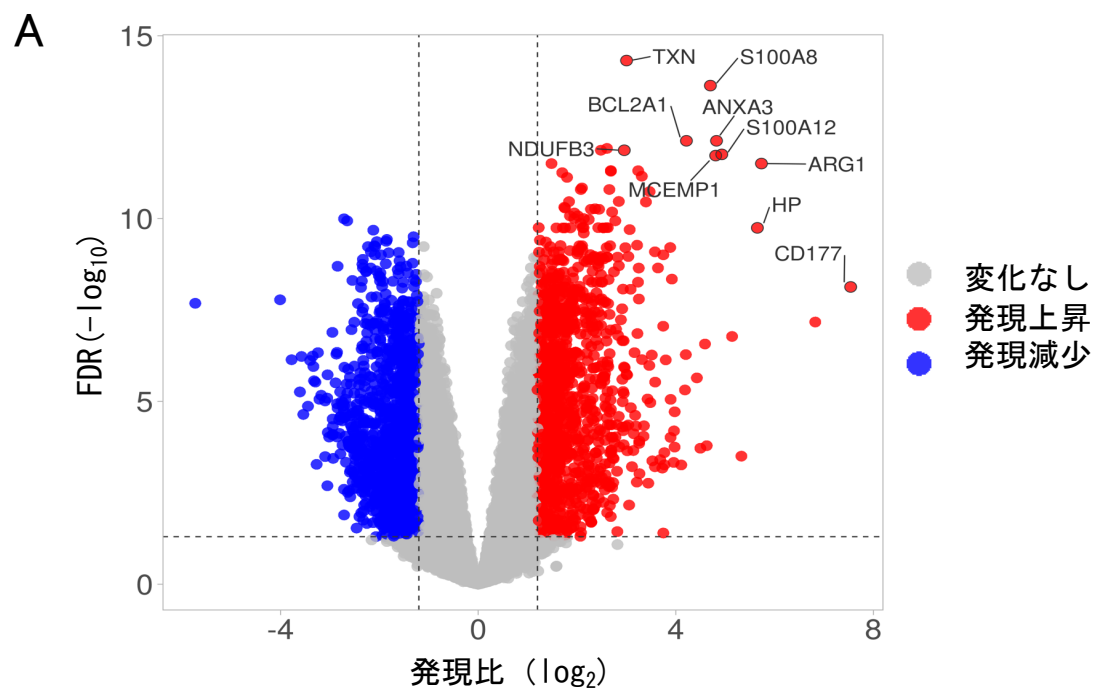


図 1 主成分分析

A: mRNA の主成分分析。0を基準とし、横軸は最も発現変動した第一主成分を表し、縦軸は次に大きく変動した第二主成分を表す。青い△が肺炎患者、赤い○が健常者であり、1つのプロットが1症例を表す。肺炎患者群と健常対照群で mRNA 発現に異なる傾向があることが示された。

B: miRNA の主成分分析。Aと同様に表示しており、肺炎患者群と健常対照群で miRNA 発現に異なる傾向があることが示された。



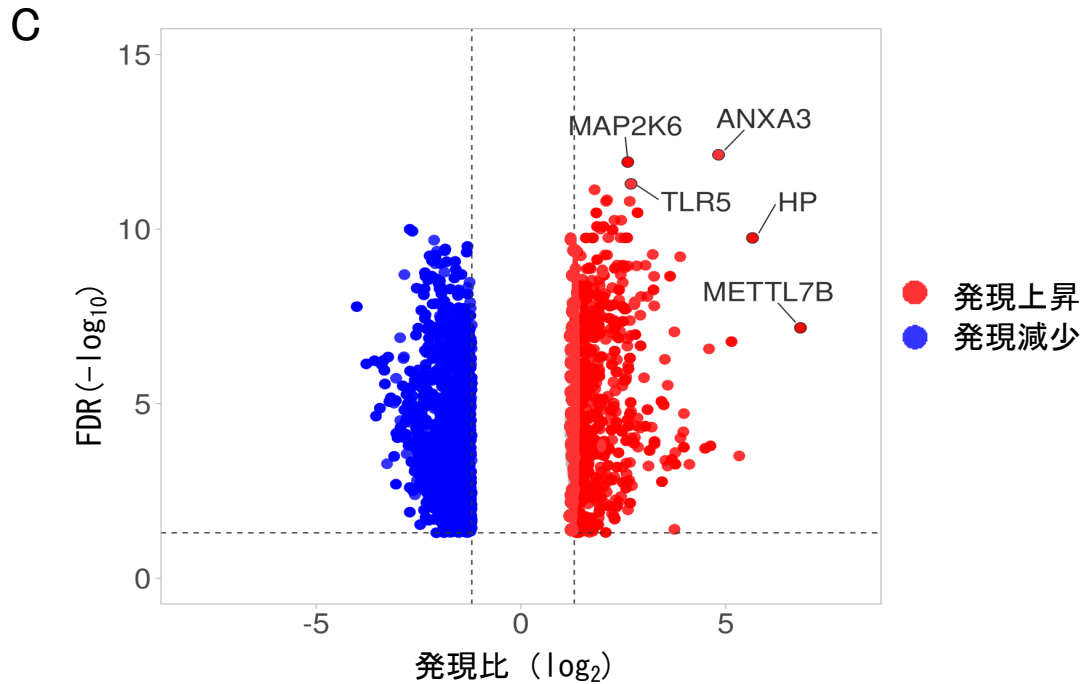


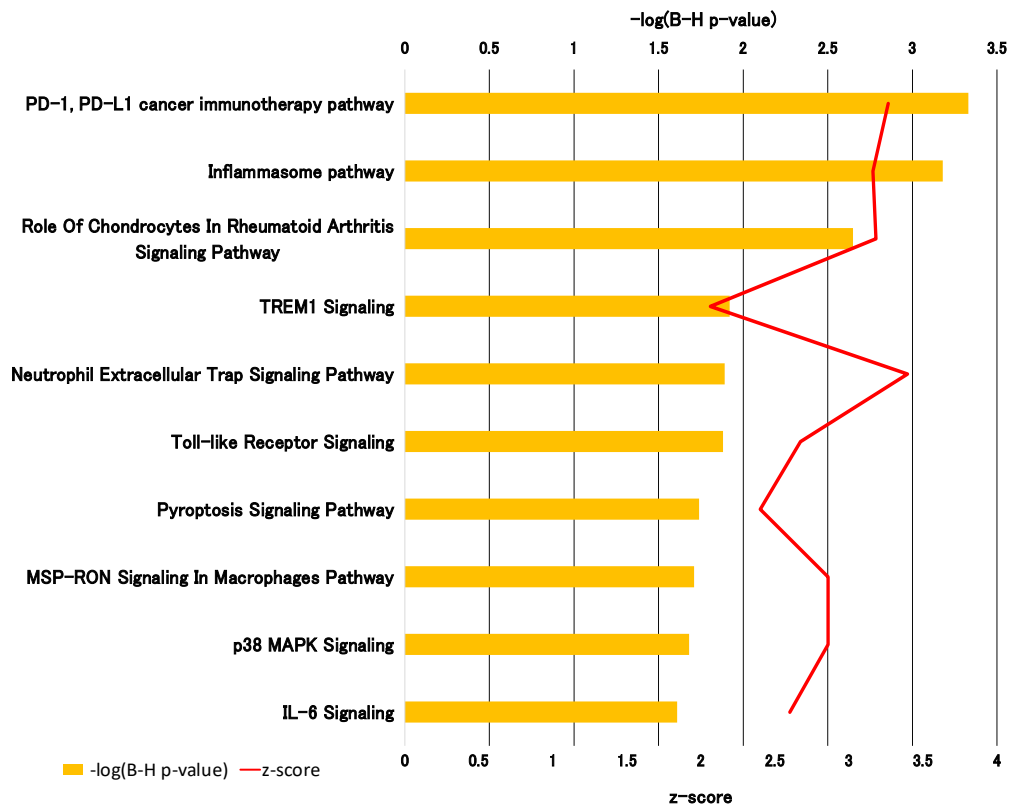
図2 発現変動解析

A: mRNA の火山型分布図。健常対照群と比較し、肺炎患者群で有意な発現差のある DEGs を解析した。縦の点線は $|\log_2 \text{fold change}| > 1.2$ を表す。横の点線は $\text{FDR} < 0.05$ の閾値を表す。○がそれぞれの mRNA を表し、赤色は発現が上昇した mRNA、青色は発現が減少した mRNA を示す。灰色はカットオフ値の範囲外のため除外されたものである。また原点(0,0)からのデータのマンハッタン距離($|\Delta X| + |\Delta Y|$)[24]が大きな遺伝子を上位 10 個まで図示した。

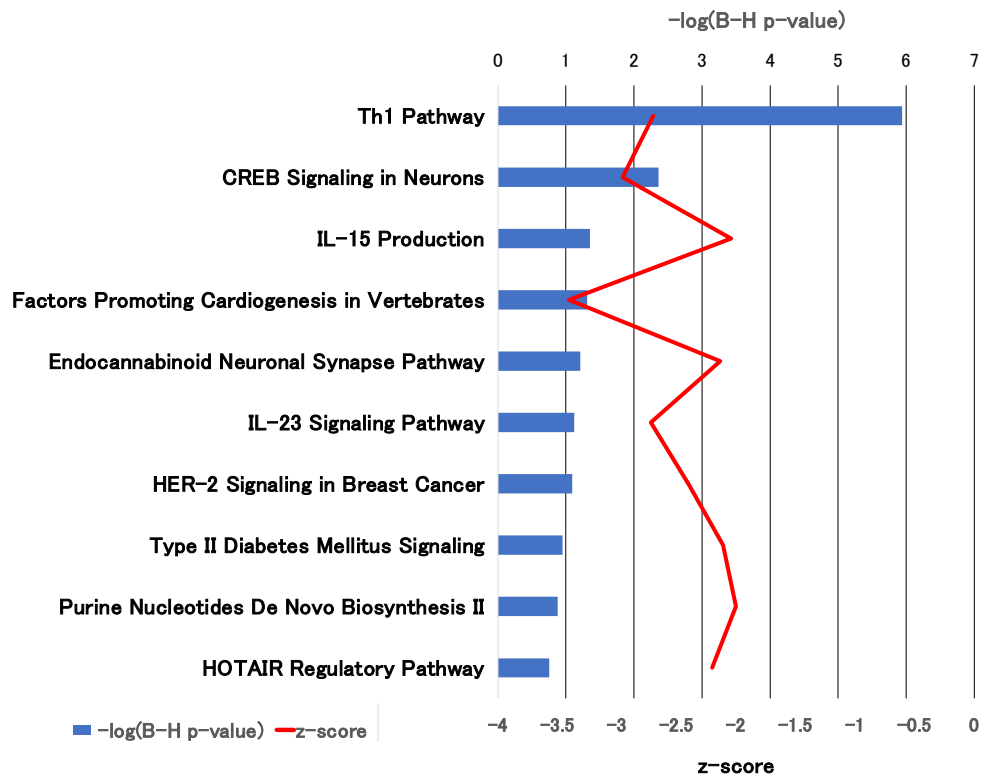
B: miRNA の火山型分布図。A と同条件で解析し、マンハッタン距離が大きな遺伝子を上位 10 個まで図示した。

C: miRNA-targeted mRNA の火山型分布図。A、B と同条件で解析した。マンハッタン距離が大きな遺伝子を上位 5 個まで図示した。

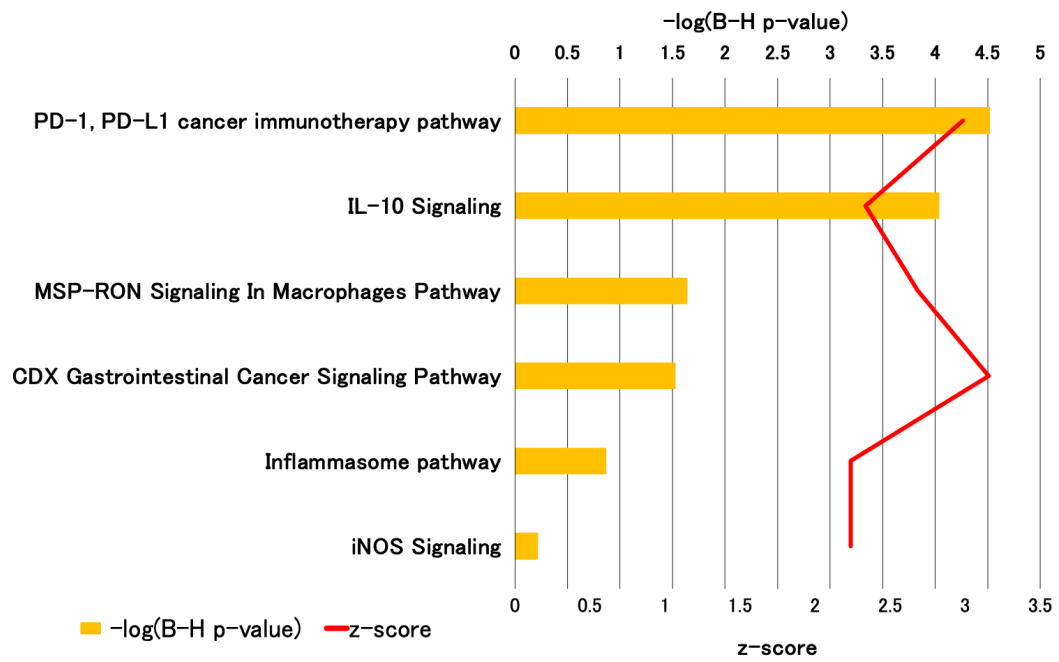
A



B



C



D

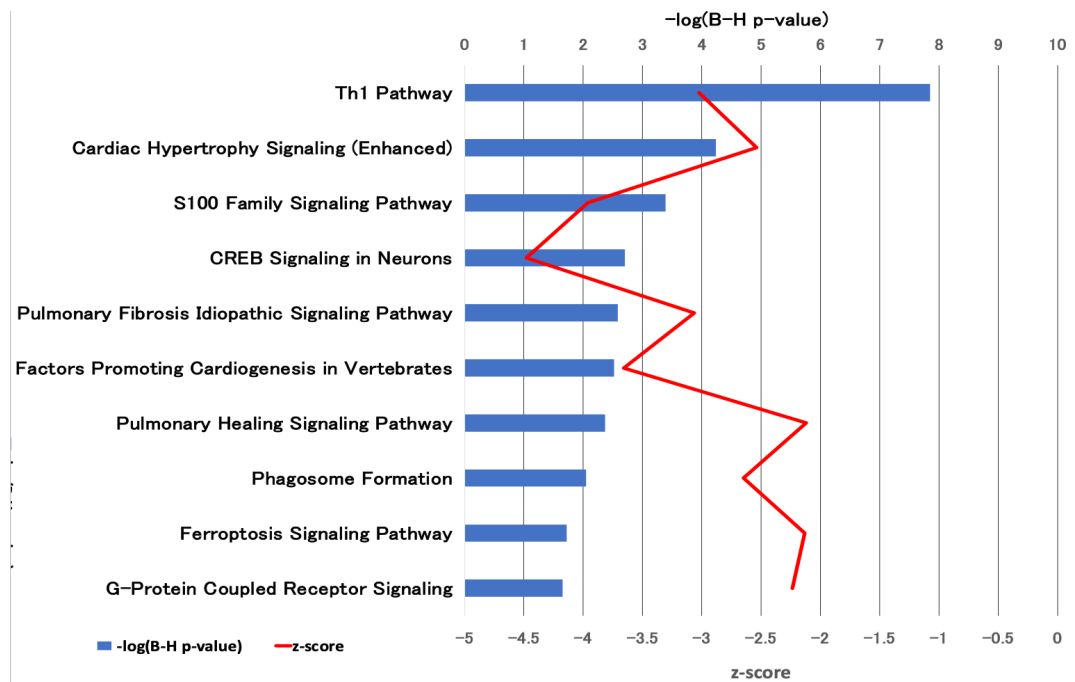


図 3 パスウェイ解析

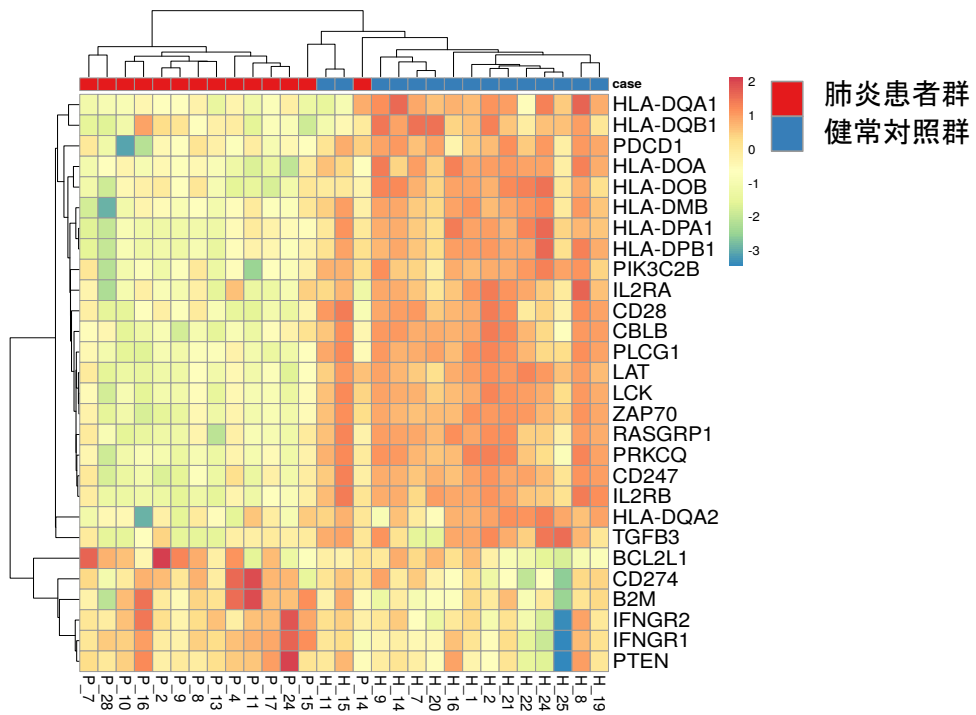
A:mRNA のパスウェイ解析のうち、発現が上昇した上位 10 個のシグナル。棒グラフで各細胞シグナルの発現比を常用対数で表示し、折れ線グラフで z スコアの値を表示した。PD-1、PD-L1 cancer immunotherapy シグナルの変動が最も大きく、他に Inflammasome シグナル、TREM1 シグナル、NETs シグナルなどの免疫応答に関わるシグナルの上昇が確認された。

B:mRNA のパスウェイ解析のうち、発現が減少した上位 10 個のシグナル。棒グラフで各細胞シグナルの発現比を常用対数で表示し、折れ線グラフで z スコアの値を表示した。Th1 シグナルが最も減少しており、細胞増殖などに関わる CREB (cAMP response element binding protein) のシグナルも減少していた。

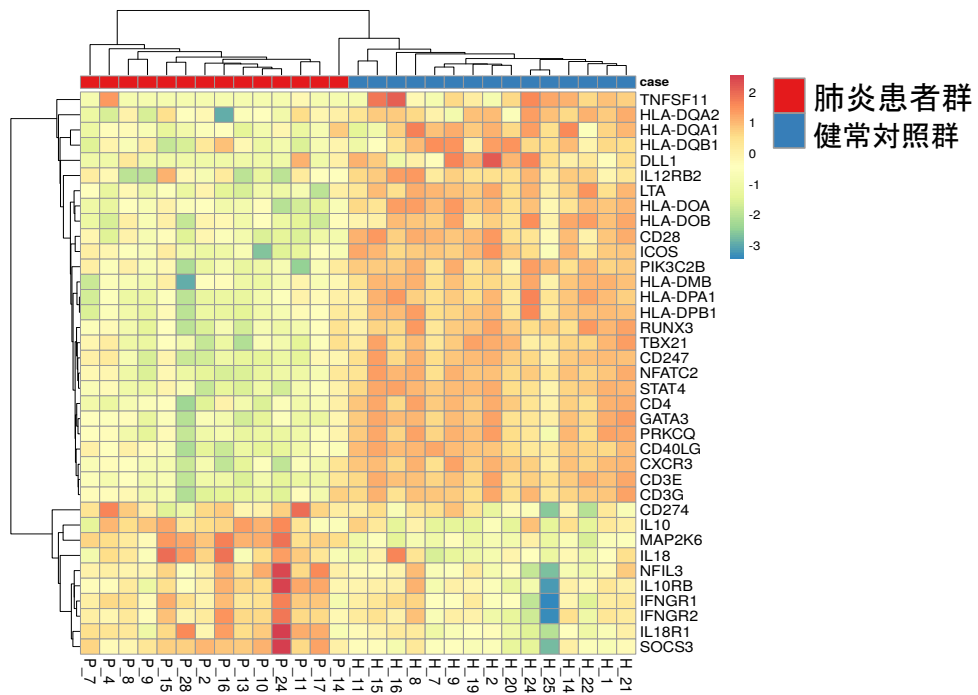
C:miRNA-targeted mRNA のパスウェイ解析のうち、発現が上昇した上位 6 個のシグナル。棒グラフで各細胞シグナルの発現比を常用対数で表示し、折れ線グラフで z スコアの値を表示した。PD-1、PD-L1 cancer immunotherapy シグナルの変動が最も大きく、他に Inflammasome シグナルなどの上昇が確認された。

D:miRNA-targeted mRNA のパスウェイ解析のうち、発現が減少した上位 10 個のシグナル。棒グラフで各細胞シグナルの発現比を常用対数で表示し、折れ線グラフで z スコアの値を表示した。Th1 シグナルが最も減少しているほか、CREB シグナルなども減少していた。

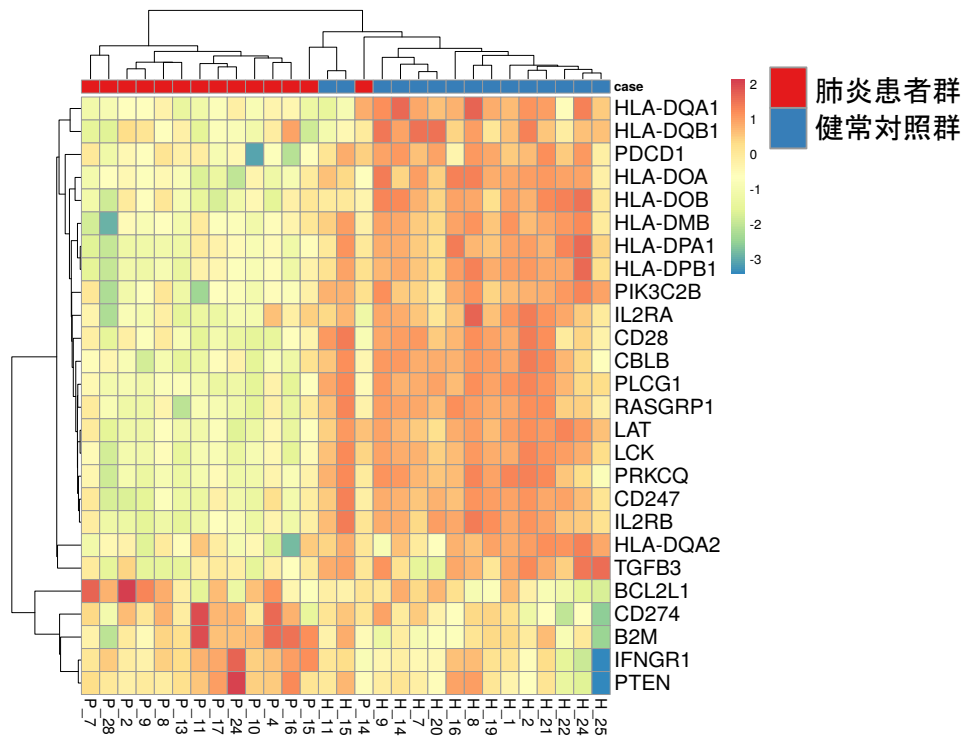
A



B



C



D

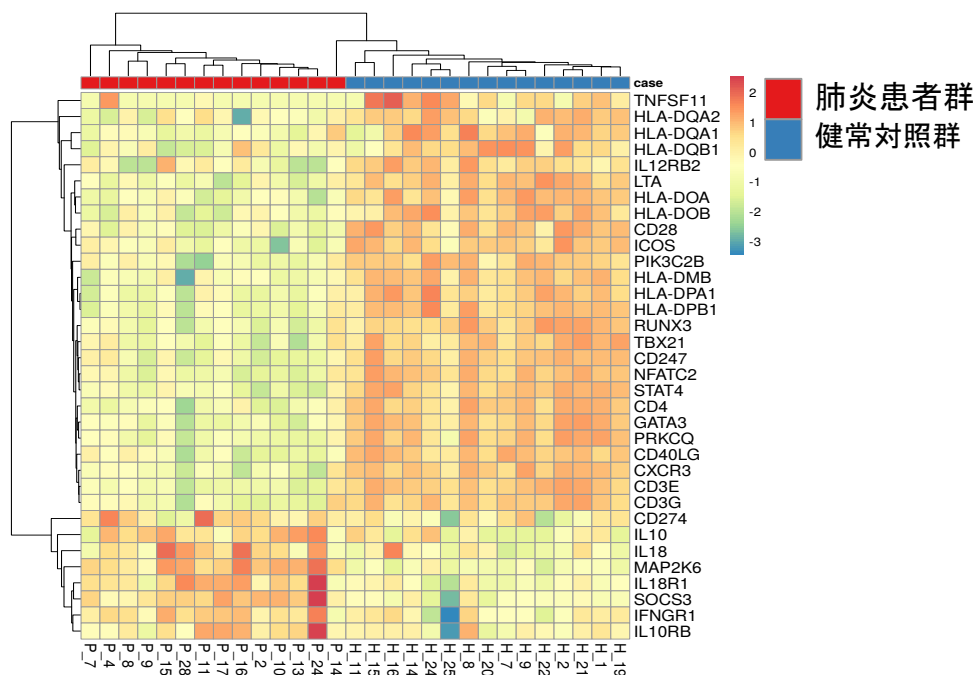


図 4 ヒートマップ解析

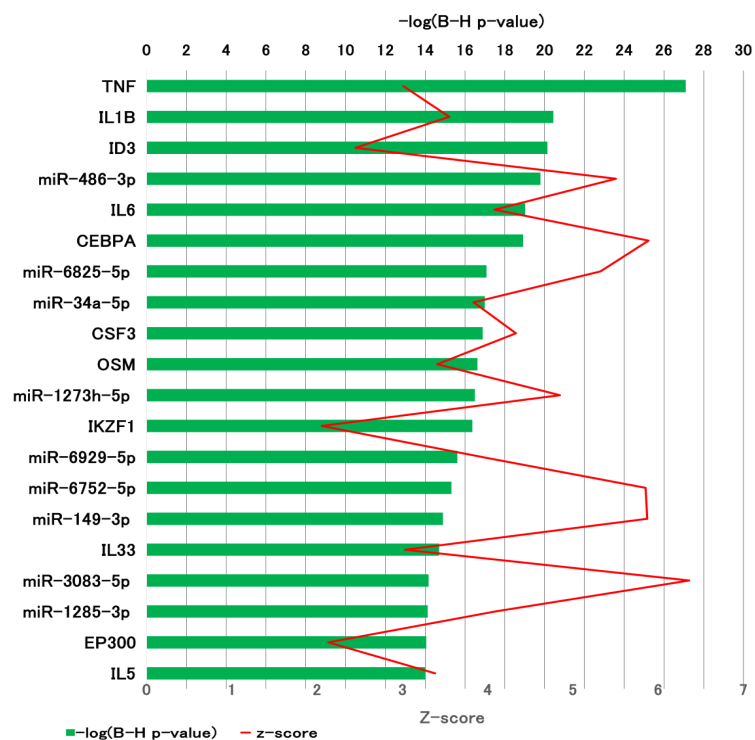
A:mRNA における PD-1、PD-L1 cancer immunotherapy シグナルに対するヒートマップ解析。肺炎患者群は赤色、健常対照群は青色で階層クラスタリングを行った。横軸は各症例を、縦軸は IPA から抽出したシグナルに關与する構成因子をそれぞれ示す。またヒートマップでは構成因子の中で高発現のものを赤色、低発現のものを青色で示した。各因子が全体的に発現変動しており、その変動が肺炎患者群と健常対照群で概ね分かれていた。

B:mRNA における Th1 シグナルに対するヒートマップ解析。IPA よりシグナルの構成因子を抽出し、A と同様に解析を行った。各因子が全体的に発現変動しており、その変動が肺炎患者群と健常対照群で概ね分かれていた。

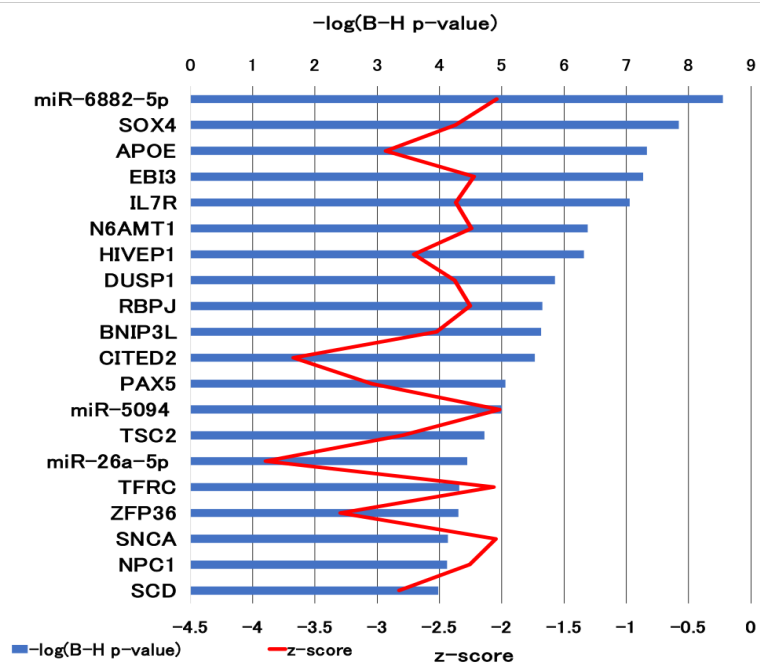
C:miRNA-targeted mRNA における PD-1、PD-L1 cancer immunotherapy シグナルに対するヒートマップ解析。A、B と同様に解析を行った。各因子が全体的に発現変動しており、その変動が肺炎患者群と健常対照群で概ね分かれていた。

D:miRNA-targeted mRNA における Th1 シグナルに対するヒートマップ解析。A、B、C と同様に解析を行った。各因子が全体的に発現変動しており、その変動が肺炎患者群と健常対照群で概ね分かれていた。

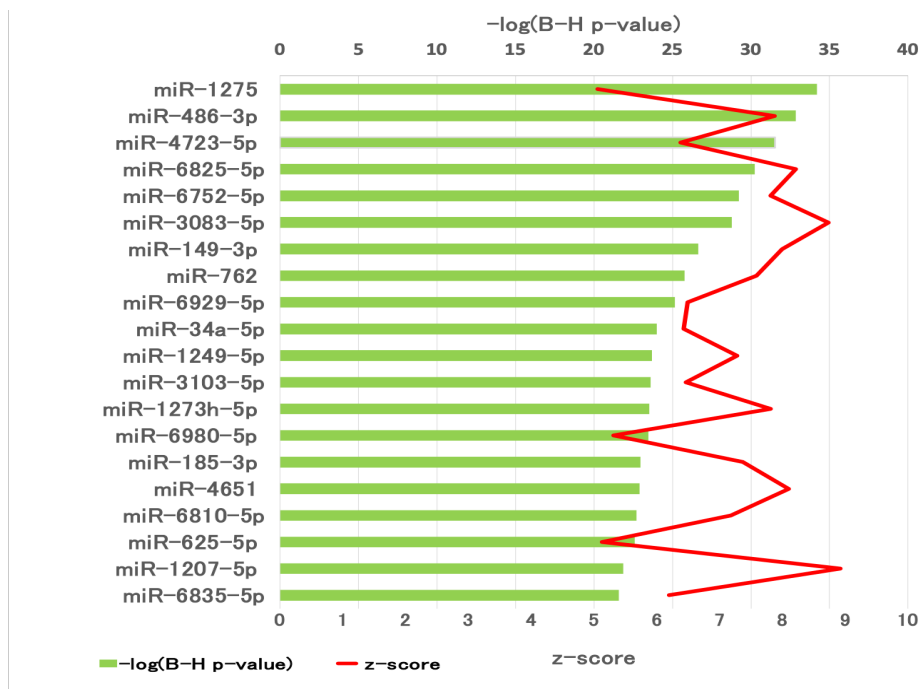
A



B



C



D

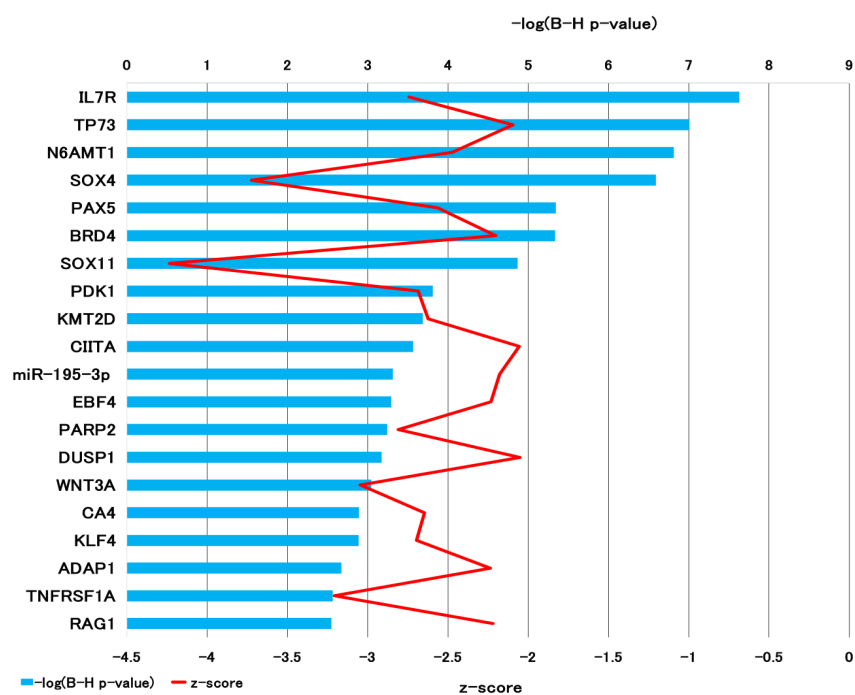


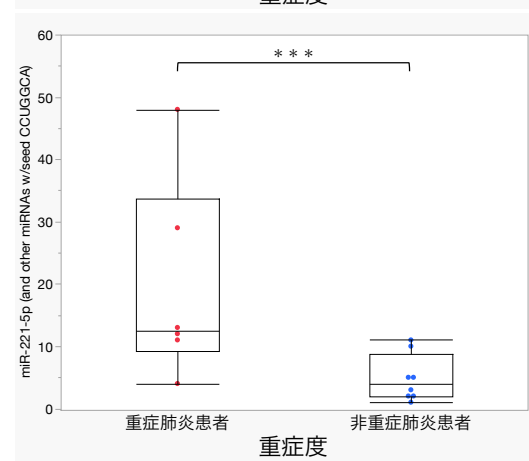
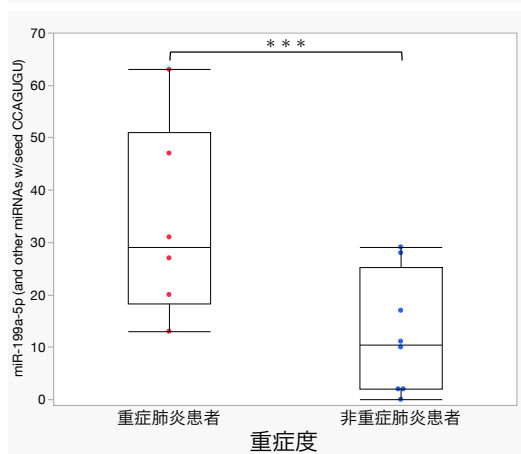
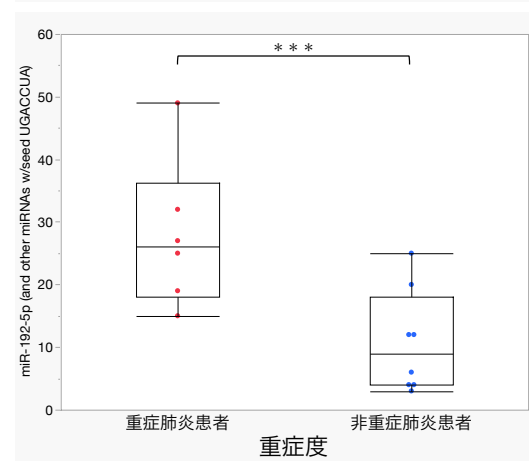
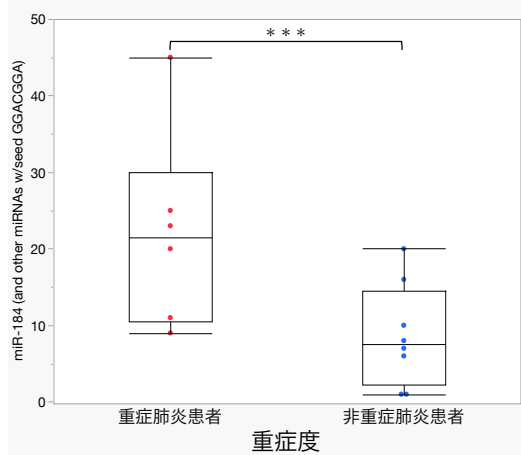
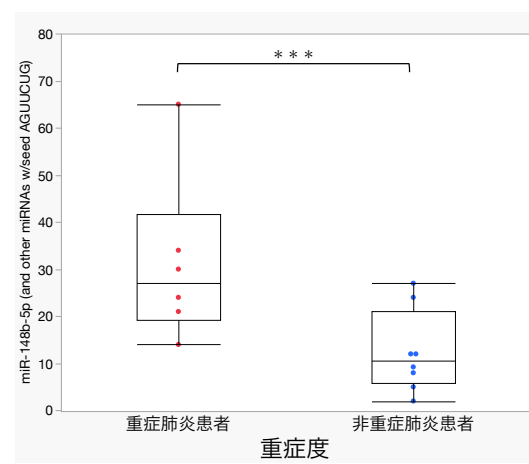
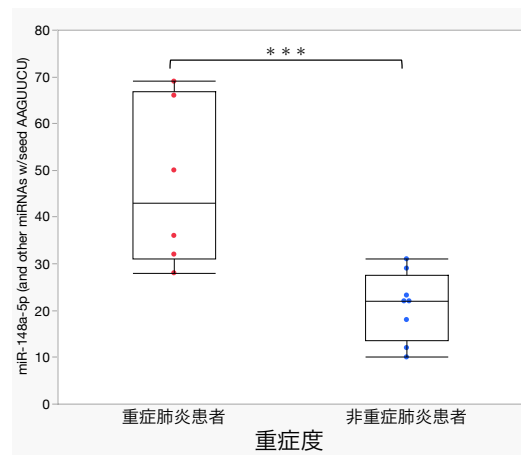
図 5 上流解析

A:mRNA の上流解析において発現上昇が予測された上流制御因子。IPA を用いて既存のデータベースから予測されたデータを抽出し、上位 20 個の因子を図示した。TNF や INF-1 β などの上流制御因子を縦軸に示した。横軸は棒グラフで各因子の発現比を対数関数、折れ線グラフで z スコアをそれぞれ示した。

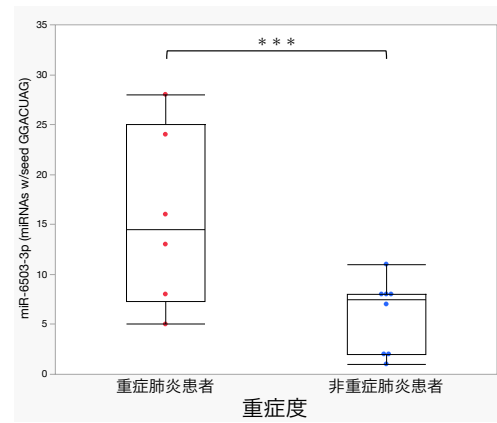
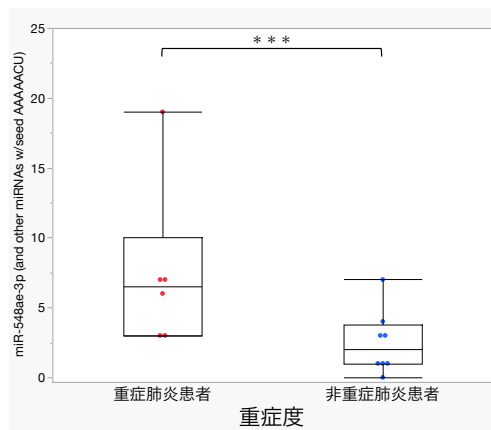
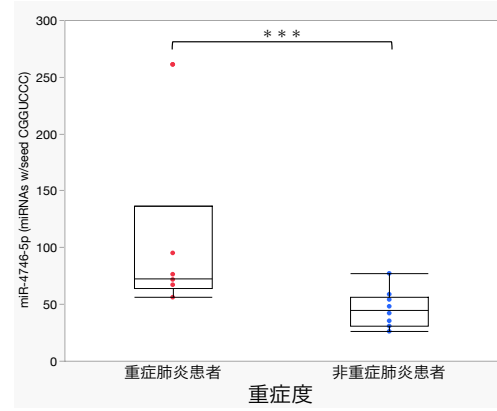
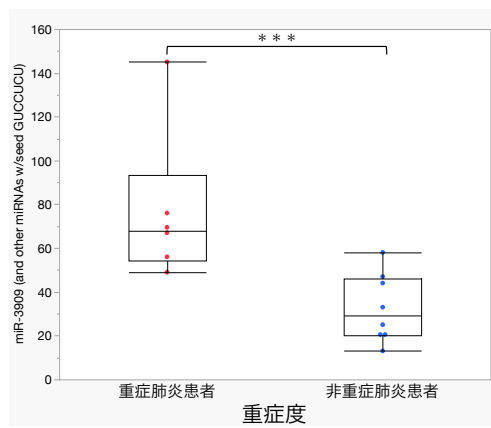
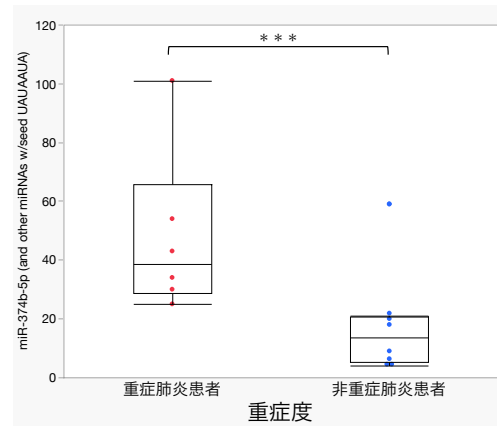
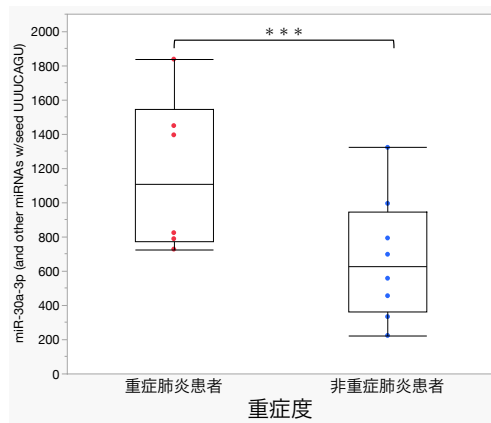
B:mRNA の上流解析において発現減少が予測された上流制御因子。A と同様にデータ抽出し図示した。縦軸に miR-6882-5p、SOX4 などの上流制御因子を示した。

C:miRNA-targeted mRNA の上流解析において発現上昇が予測された上流制御因子。A、B と同様にデータ抽出し図示した。縦軸に miR-1275、miR-486-3p などの上流制御因子を示した。

D:miRNA-targeted mRNA の上流解析において発現減少が予測された上流制御因子。A-C と同様にデータ抽出し図示した。縦軸に IL-7R、TP73 などの上流制御因子を示した。



***: $p < .001$



***: $p < .001$

図 6 miRNA の発現量を比較する解析

解析 3 で肺炎患者群 14 例は、敗血症性ショックの有無により重症肺炎患者群 6 例と非重症肺炎患者群 8 例に分けられた。解析 2 パスウェイ解析で用いた miRNA に 72 個に対して重症肺炎患者群と非重症肺炎患者群の 2 群間でウィルコクソンの順位和検定を行い、有意差を認めた miRNA について箱ひげ図を示した ($***: p < .001$)。miR-148a-5p、miR-148b-5p、miR-184、miR-192-5p、miR-199a-5p、miR-221-5p、miR-30a-3p、miR-374b-5p、miR-3909、miR-4746-5p、miR-548ae-3p、miR-6503-3p の 12 個に有意差を認めた。縦軸に miRNA とその発現量、横軸に重症肺炎患者群と非重症肺炎患者群での発現の違いを示した。

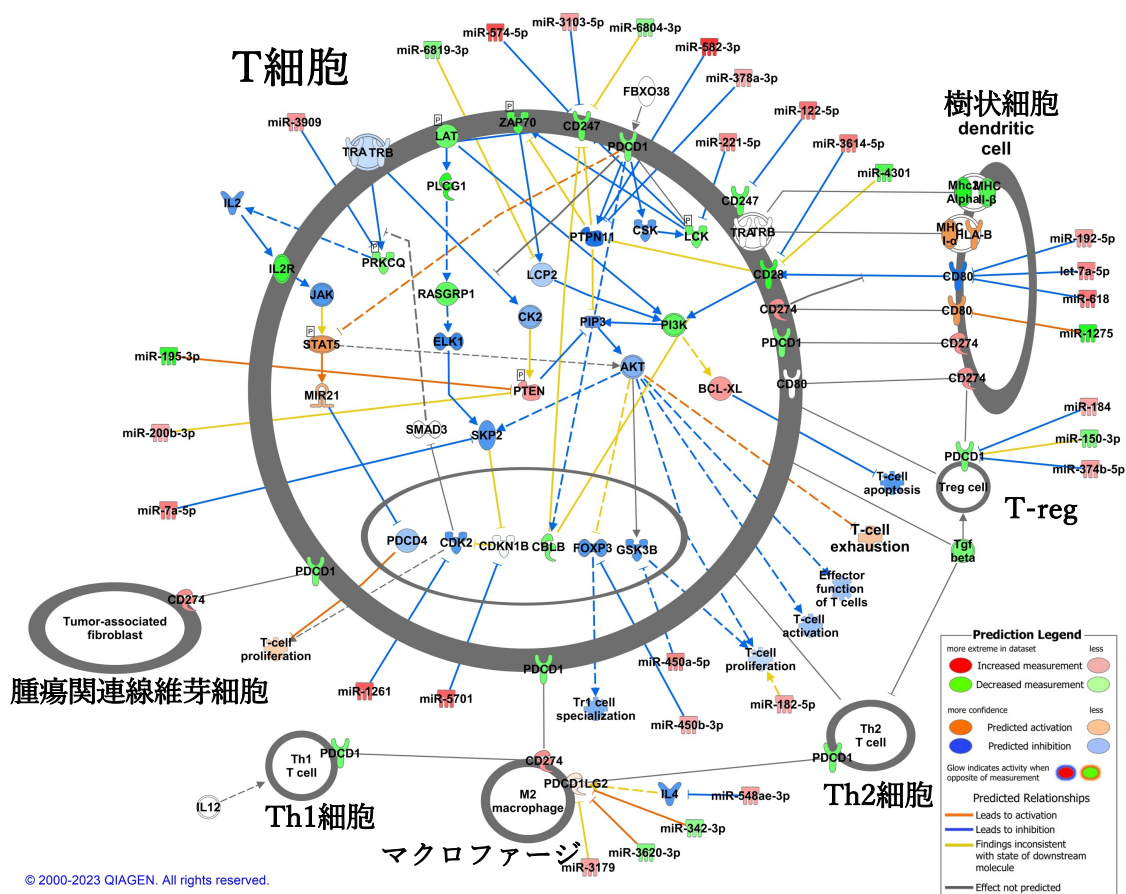


図 7 mRNA と miRNA の相互作用に関する解析:PD-1、PD-L1 cancer immunotherapy シグナル

IPA 2022 Fall 版を用いカットオフ値 $|\log_2 \text{Fold Change}| > 1.2$ 、 $\text{FDR} < 0.05$ の場合の設定で解析を行った。PD-1、PD-L1 cancer immunotherapy シグナルの中で T 細胞および T 細胞に連続した反応のみ図示した。赤色の因子は実測値で発現上昇し、緑色の因子は実測値で発現減少したものである。橙色の因子は発現上昇が予測されるもの、青色の因子は発現減少が予測されるものを示す。橙色の矢印は発現上昇の予測、青色の矢印は発現減少の予測、黄色の矢印はデータベースからの推測とは異なる状態について表現している。30 個の miRNA が描出されており、解析 2 miRNA-targeted mRNA の上流解析(発現上昇)における 2 個の miRNA(図 3C)と、解析 3(図 6)中で 9 個の miRNA がより影響を及ぼすことが示唆された。

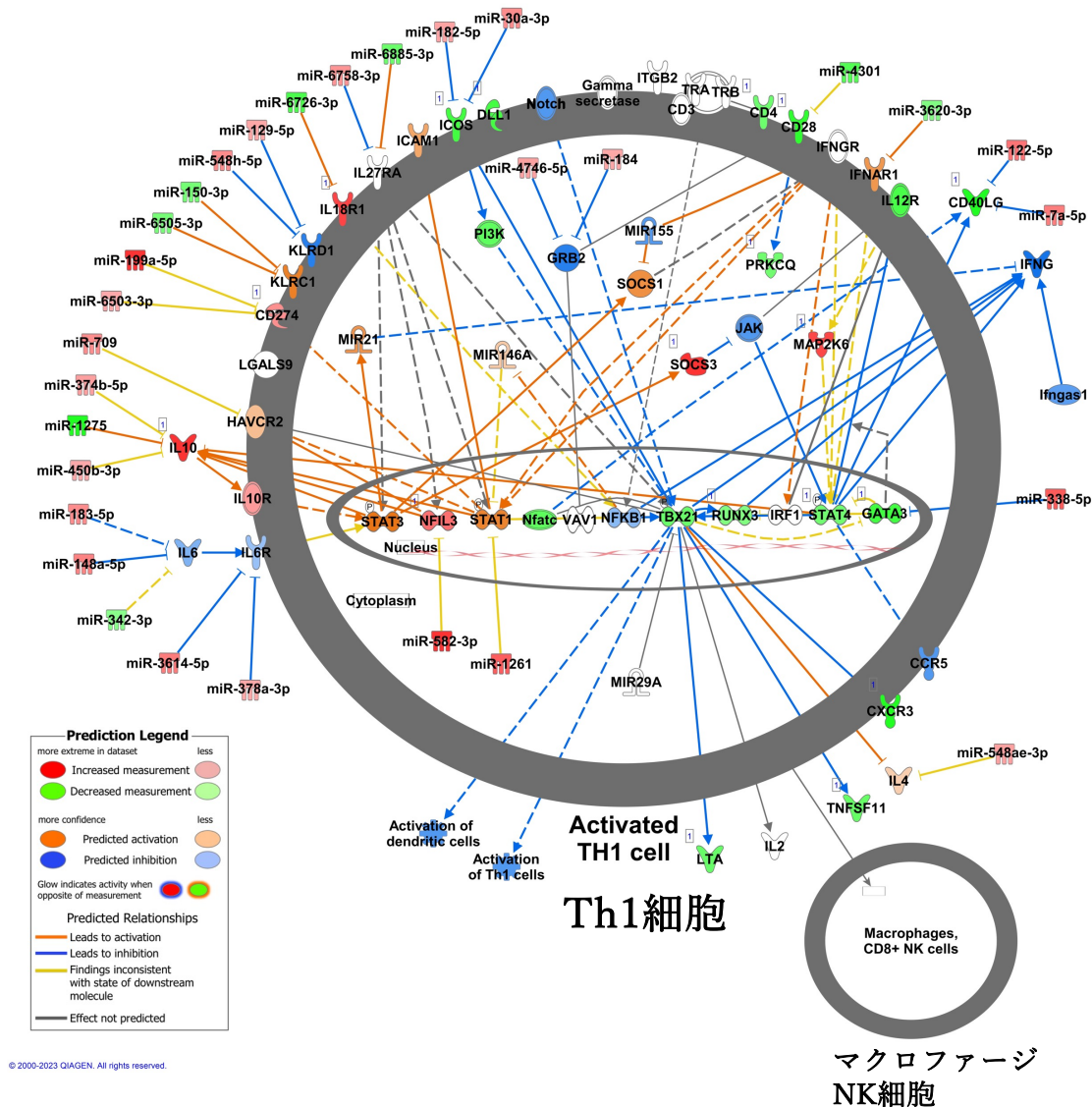


図 8 mRNA と miRNA の相互作用に関する解析:Th1 シグナル

IPA 2022 Fall 版を用いカットオフ値 $|\log_2 \text{Fold Change}| > 1.2$, $\text{FDR} < 0.05$ の場合の設定で解析を行った。図 8 では Th1 シグナルの中で Th1 細胞に直接関わる 30 個の miRNA を図示した。赤色の因子は実測値で発現上昇し、緑色の因子は実測値で発現減少したものである。橙色の因子は発現上昇が予測されるもの、青色の因子は発現減少が予測されるものを示す。橙色の矢印は発現上昇の予測、青色の矢印は発現減少の予測、黄色の矢印はデータベースからの推測とは異なる状態について表現している。解析 2 上流解析では該当がなかったが、解析 3 の 12 個全ての miRNA (図 6) が Th1 シグナル内でより影響を及ぼすことが示唆された。