

令和元年6月16日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08649

研究課題名(和文) 機能から形態異常への進展でのmicroRNAの関与と機序：喫煙の動脈硬化での検討

研究課題名(英文) Micro RNA in the development of smoking-induced atherosclerosis

研究代表者

竹本 恭彦 (Takemoto, Yasuhiko)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20364002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：喫煙者において、血管機能評価を行い、動脈硬化の進展に伴うmiRNAの発現の差異を検討した。採取した血液よりmiRNA抽出を実施した。その後、非喫煙群で血管障害を生じていない群と、喫煙群で血管障害を生じている群で、miRNAプロファイリング解析を実施した。その結果、miR-27、miR-455、miR-1、miR-133、miR-136、miR-142、miR-337、miR-369、miR-370、miR-409、miR-411、miR-431、miR-432、miR-493、miR-584、に発現差異を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喫煙による早期血管障害である血管内皮機能障害の評価は、近年の診断機器の進歩で、比較的簡便に行えるようになったが、いまだ時間と人手を要する。喫煙による血管内皮機能障害に関与するmicroRNAを明らかにし、より簡便に迅速に喫煙による早期血管障害の発生を検出できる指標を開発することは、健康寿命延伸を阻害する喫煙による血管障害を早期に検出し、生涯現役を貫けるよう支援することにつながり、社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the vascular endothelial functions and examined the expressions of microRNAs in smokers. We extracted microRNA from serum samples and performed microRNA profiling in non-smokers with normal vascular endothelial functions and in smokers with vascular endothelial dysfunctions. We found the statistically significant differences in the expressions of miR-27, miR-455, miR-1, miR-133, miR-136, miR-142, miR-337, miR-369, miR-370, miR-409, miR-411, miR-431, miR-432, miR-493, and miR-584 between non-smokers with normal vascular endothelial functions and smokers with vascular endothelial dysfunctions. It has not been fully determined which microRNA is crucial, whether one microRNA is essential or multiple microRNA are prerequisite, in vascular endothelial dysfunctions by smoking. Further examinations are warranted to clarify these issues.

研究分野：血管内皮機能

キーワード：老化 喫煙 早期血管障害 血管内皮機能 遺伝子検査学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管は、長年にわたり物理的または化学的刺激を受け続けた結果、血管内皮細胞機能障害を端緒として、内膜中膜複合体の肥厚を生じる。すなわち、機能障害から始まり形態異常へと進展し、粥状動脈硬化症の発症に至る。

2008年にMicro RNA (miR)が血中でも安定して存在することが報告され、ニコチン負荷で、血中だけでなく血管を構成する各細胞において、miR21が存在し、動脈硬化の進展に関与することが示された (Sci Transl Med 2012 4:122ra22)。

喫煙者における血管障害も、機能障害から始まり形態異常へと進展し、その過程には多数の因子、機序が関与する。そのため、miR21の関与が示されているが、miR21以外のmiRの発現も報告されており、複数のmiRが同時並列で相互に関与しあう可能性がある。また、動脈硬化早期の機能障害のみの病態と動脈硬化後期の形態異常を生じた病態との間には、miR発現に相違がある可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、喫煙者における血管機能障害から血管形態異常への動脈硬化の進展におけるmiRの果たす役割を明らかにすることである。喫煙者、非喫煙者において、血管機能形態同時評価を通じて動脈硬化重症度の判断をおこない、miR発現の相違を検討する。

3. 研究の方法

24時間前より激しい身体活動中止、12時間前より絶食、6時間前よりたばこ、アルコール飲料、カフェイン含有物、ビタミンC含有物の中止、6時間以上の睡眠、22-25度の室温、検査前30分間の仰臥位安静、午前7-12時の間に実施、の条件下で、血管形態評価、血管機能評価、を実施した。

血管形態評価は、高解像度超音波装置を用い、上腕動脈を描出する。血管機能評価のための各負荷を実施する前に、超音波装置からみて遠位側の上腕動脈内膜中膜複合体厚を測定した。

血管機能評価は、高解像度超音波装置を用い、駆血による血流増加刺激前の上腕動脈の血管径と血流を測定した。次に収縮期血圧より高い圧で一定時間駆血したのちに開放し血流増加に伴い拡張した上腕動脈血管径を計測し、血管径の変化率を算出し、血管内皮依存性血管拡張反応評価を行った。

喫煙者、非喫煙者において、禁煙治療開始前に末梢血採取を行い、血清分離を行った。血清よりRNAを抽出した。アダプター処理でバーコードラベル化し、cDNAへ逆転写を行い、ライブラリーを作成した。次に、miRに対応する145-160塩基対のcDNAフラグメントを切り出した。シーケンサー (MiSeq, Illumina) にて、50塩基対ごとの解読を行い、miR解読と解析を実施し、miRDeep2とmiRDeep*を用いmiRの発現プロファイルを確立し、表現系との対応を行なった。

4. 研究成果

血管形態評価と血管機能評価の結果から、男性喫煙者におけるあらたな血管障害の指標を見出した。血管機能評価においては、血管駆血を5分間実施したあとの血管拡張反応を観察することが一般的に行われているが、喫煙者においては、以前より、5分間の血管駆血を実施している際に血管収縮反応が生じることが報告されている。本研究では、喫煙者を対象に血管形態評価と血管機能評価を実施しており、同時に血管収縮反応を観察することが可能であり、血管収縮反応を同時に評価した。その結果、男性喫煙者において、血管駆血時に生じる血管収縮反応が生じるのは、より若年であり、より肥満指標 (body mass index: BMI) が小さく、より安静時血管径が小さい、すなわちより血管障害がすくない場合であることが判明した。逆に、この血管収縮反応が生じない場合には血管障害がより強いことを見出した。その知見をまとめた結果の論文を投稿し、atherosclerosisに採択され、掲載された。

採取した血液よりのmiR抽出を実施した。その後、非喫煙群で血管障害を生じていない群と、喫煙群で血管障害を生じている群で、miRプロファイリング解析を実施した。抽出検体が適正であることを確認したのちに、得られた結果の両群間での差異につき、解析を実施した。その結果、miR-27、miR-455、miR-1、miR-133、miR-136、miR-142、miR-337、miR-369、miR-370、miR-409、miR-411、miR-431、miR-432、miR-493、miR-584、に発現差異を認めたと (表)。

Group	microRNA
1	miR-27
1	miR-455-5p
2	miR-1
2	miR-133a-3p
2	miR-136-5p
2	miR-142-3p
2	miR-337-5p
2	miR-369-3p
2	miR-370-3p
2	miR-409-3p
2	miR-411-5p
2	miR-431-5p
2	miR-432-5p
2	miR-493-5p
2	miR-584-5p

表.

Group1: 平均発現量が、喫煙群において非喫煙群より 2 倍以上であった microRNA

Group2: 平均発現量が、喫煙群において非喫煙群より 0.5 倍以下であった microRNA

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1) DOI:org/10.1016/j.ijcard.2018.06.017

Atsushi Tanaka, Atsushi Kawaguchi, Hirofumi Tomiyama, Yukihiro Higashi, Shinichiro Ueda, Kazuomi Kario, Teruo Inoue, Yasuhiko Takemoto, Takuzo Hano, Masataka Sata, Yutaka Ishibashi, Koichi Node

Cross-sectional and longitudinal associations between serum uric acid and endothelial function in subjects with treated hypertension.

International Journal of Cardiology, 2018, 272, 308-313 査読有, オープンアクセスではない

2) DOI:org/10.1161/JAHA.118.008588

Tatsuya Maruhashi, Junko Soga, Kazuomi Kario, Hirofumi Tomiyama, Teruo Inoue, Yasuhiko Takemoto, Takuzo Hano, Masataka Sata, Yutaka Ishibashi, Koichi Node, Akira Yamashina, Yukihiro Higashi.

Endothelial Dysfunction, Increased Arterial Stiffness, and Cardiovascular Risk Prediction in Patients With Coronary Artery Disease: FMD J (Flow Mediated Dilation Japan) Study A.

Journal of the American Heart Association, 2018, 7, e008588-e008588

査読有, オープンアクセスではない

3) DOI:org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.11.022

Tatsuya Maruhashi, Junko Soga, Hirofumi Tomiyama, Kazuomi Kario, Teruo Inoue, Yasuhiko Takemoto, Takuzo Hano, Masataka Sata, Akira Yamashina, Yukihiro Higashi

Brachial artery diameter as a marker for cardiovascular risk assessment: FMD-J study Atherosclerosis 2018, 268, 92-98 査読有, オープンアクセスではない

4) DOI:org/10.1016/j.jacc.2017.12.037

Sano S, Oshima K, Wang Y, MacLaughlan S, Katanasaka Y, Sano M, Zuriaga MA, Yoshiyama M, Goukassian D, Cooper MA, Fuster JJ, Walsh K.

Tet2-Mediated Clonal Hematopoiesis Accelerates Heart Failure Through a Mechanism Involving the IL-1 /NLRP3 Inflammasome.

Journal of the American College of Cardiology, 2018, 71, 875-886, 査読有,

オープンアクセスではない

5) DOI:org/10.1016/j.ijcard.2017.11.022

- Tomiya Hirofumi, Ishizu Tomoko, Higashi Yukihito, Ueda Shinichiro, Takemoto Yasuhiko, Hano Takuzo, Sata Masataka, Node Koichi.
 Longitudinal association among endothelial function, arterial stiffness and subclinical organ damage in hypertension
 International Journal of Cardiology, 2018,253,161-166. 査読有,オープンアクセスではない
- 6) DOI:org/10.1253/circj.cj-17-0211
 Tokushige Akihiro, Ueda Shinichiro, Tomiyama Hirofumi, Takemoto Yasuhiko, Hano Takuzo, Sata Masataka, Ishibashi Yutaka, Node Koichi, Ito Hiroshi, Yamashina Akira.
 Association Between Waist-to-Height Ratio and Endothelial Dysfunction in Patients With Morbidity A Report From the FMD-J Study
 Circulation Journal 2017,81,1911-1918, 査読有,オープンアクセスではない
- 7) DOI:org/10.1161/hypertensionaha.117.09612
 Maruhashi Tatsuya, Soga Junko, Fujimura Noritaka, Takemoto Yasuhiko, Sata Masataka, Node Koichi, Higashi Yukihito
 Endothelial Function Is Impaired in Patients Receiving Antihypertensive Drug Treatment Regardless of Blood Pressure Level Hypertension 2017, 70, 79-797, 査読有,オープンアクセスではない
- 8) DOI:org/10.1007/s00380-015-0756-z
 Naoki Norioka, Shinichi Iwata, Shiro Yanagi, Hideshi Ishii, Kenichi Sugioka, Kimio Kamimori, Takahiro Ota, Marco R. Di Tullio, Shunichi Homma, Minoru Yoshiyama.
 Higher visit-to-visit intra-dialytic blood pressure is associated with the progression of aortic valve stenosis in chronic hemodialysis patients.
 Heart and Vessels 2016, 31, 1491-1496, 査読有,オープンアクセスではない
- 9) DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2016.06.022
 Norioka N, Takemoto Y, Kobayashi M, Makuuchi A, Yoshikawa J, Yamazaki Y, Kamiyama Y, Shuto T, Yoshiyama M.
 Low-flow mediated constriction incorporated indices as indicators of cardiovascular risk in smokers. Atherosclerosis 2016,251,132-138 査読有,オープンアクセスではない
- 10) DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2015.04.807
 Shinichi Iwata, Kenichi Sugioka, Suwako Fujita, Asahiro Ito, Yoshiki Matsumura, Akihisa Hanatani, Masahiko Takagi, Marco R. Di Tullio, Shunichi Homma, Minoru Yoshiyama.
 Aortic arch atherosclerosis in patients with severe aortic stenosis can be argued by greater day-by-day blood pressure variability.
 Atherosclerosis 2015,241,42-47 査読有 オープンアクセスではない
- 11) DOI:なし
 Kobayashi M, Takemoto Y, Norioka N, Iguchi T, Shimada K, Maeda M, Morimura M, Fujio Y, Azuma J, Yoshiyama M, Hirohashi K, Shuto T.
 Vascular Functional and Morphological Alterations in Smokers during Varenicline Therapy. Osaka City Med J,2015,61,19-30. 査読有,オープンアクセスではない
- 12) DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2015.08.001
 Tomiyama, H., Kohro, T., Higashi, Y., Takase, B., Suzuki, T., Takemoto, Y., Hano, T., Sata, M., Ishibashi, Y., Node, K. Maemura, K., Ohya, Y., Furukawa, T., Ito, H., Ikeda, H., Yamashina, A.
 Reliability of measurement of endothelial function across multiple institutions and establishment of reference values in Japanese. Atherosclerosis, 2015,242,433-442.
 査読有,オープンアクセスではない

〔学会発表〕(計7件)

- 1) 竹本 恭彦
 Increase in EPA/AA Ratio Predicts Improvement in Endothelial Function in Purified Eicosapentaenoic Acid-Treated Patients,日本循環器学会学術集会 2018年~2019年
- 2) 吉川淳一、竹本 恭彦
 「実証例から学ぶ生理機能検査結果と病態との関係」-バレニクリンによる禁煙治療が血管機能、形態に及ぼす効果について-, 日本動脈硬化学会総会・学術集会 2018
- 3) 竹本 恭彦、首藤 太一
 血管内皮依存性血管拡張反応(FMD): 簡単な原理の中に意外な新たな魅力
 日本超音波医学会学術集会 2018
- 4) 竹本 恭彦
 生活習慣病のアセスメント: 血管評価のための身体所見を中心に
 日本心臓病学会学術集会 2017年
- 5) 則岡 直樹、竹本 恭彦、葭山 稔

血流低下による血管収縮反応を考慮した血管内皮機能は喫煙者における心血管リスクの予測に有用である, 日本血管不全学会学術集会・総会 2017

6) Norioka, N, Takemoto, Y, Yoshiyama, M.

Low-flow mediated constriction incorporated indices as indicators of cardiovascular risk in smokers, 欧州動脈硬化学会 2016

7) 則岡 直樹、竹本 恭彦

バレニクリンによる禁煙治療が血管機能形態に与える影響
日本血管不全学会 2016

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：村上 善基

ローマ字氏名：(MURAKAMI, Yoshiki)

所属研究機関名：大阪市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：00397556

研究分担者氏名：首藤 太一

ローマ字氏名：(SHUTO, Taichi)

所属研究機関名：大阪市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：20295687

研究分担者氏名：葭山 稔

ローマ字氏名 (YOSHIYAMA, Minoru)

所属研究機関名：大阪市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：30240956