

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15196

研究課題名(和文)新規内因性低分子RNAによる大血管機能評価の臨床検査システム構築への挑戦

研究課題名(英文)Construction of the system of

研究代表者

山口 宗一 (Yamakuchi, Munekazu)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：20325814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮機能評価法は、脈波やFMDなど生理機能検査が主流で、血液生化学検査の客観的な評価がない。一酸化窒素(NO)が血管の伸縮性を規定しているため、NOの変化をもたらすmiRNAについて検討した。血管内皮細胞はinsulinやサイトカインの刺激でNOの産生を増加させる。一方、細菌感染により単核球のmiR-218が上昇し、このmiR-218は単核球の炎症性サイトカイン産生能を変化させることを明らかにした。この炎症性サイトカインは血管内皮細胞のNO産生能など内皮機能を制御すると考えられる。miRNAを介して、血管内皮機能は血管細胞および血球細胞の細胞間応答が規定していることが示された。

研究成果の概要(英文)：The evaluation of vascular endothelial function is mainly based on physiological function tests, such as ABI and FMD, which measure vasodilatation action. Since nitric oxide (NO) regulates the elasticity of blood vessels, we examined miRNAs that cause alteration of the level of NO. Vascular endothelial cells, HUVEC and HAEC, increase NO production by insulin and cytokines. Bacterial infection upregulates miR-218 level in monocytic cells. This increase of miR-218 suppresses the level of inflammatory cytokines in monocytic cells, suggesting that monocytic miRNA can indirectly regulate NO production in endothelial cells. We have shown the communication between monocytic cells to endothelial cells control vascular function mediated by mRNAs.

研究分野：分子血管学

キーワード：microRNA 血管内皮細胞 単核球

1. 研究開始当初の背景

【血管機能検査の限界】

2012年より臨床稼働した「血管内皮機能検査」は「血管機能の非侵襲的評価法に関するガイドライン」に基づいて運用されている。血管内皮機能は、心血管イベントの予測因子となるため、生理学的検査のFMD、脈波などが生活習慣病、動脈硬化の早期診断に積極的に使用されている。

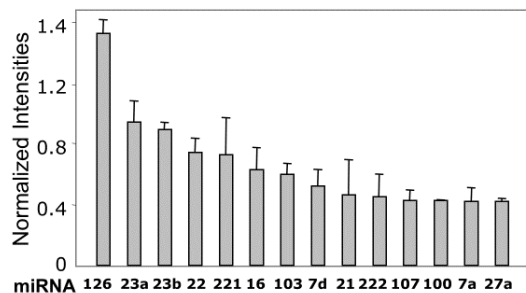
血管の伸展に関わる大きな因子は一酸化窒素(NO)であり、血管系では主に血管内皮細胞で合成、分泌される。NOガス自体の測定は困難であり、上記の生理検査がNOの産生、それによる血管の反応を反映する。

このNOの挙動を、簡便な検体検査項目として評価できないかが大きなテーマである。新しい検査項目の開発が求められている。

【マイクロRNA研究の発展】

マイクロRNA(microRNA)は、細胞内の蛋白質発現を抑制することで、その細胞機能を制御する。各々の細胞や組織によってその発現量が異なること、一つのmicroRNAが標的とする蛋白質が多岐にわたることから、microRNAの働きを一元化するの難しい。

我々は、血管内皮細胞におけるmicroRNAの発現について研究を重ね、下図のように血管内皮細胞にはmiR-126を始めとし特徴のあるmicroRNAが発現し、血管内皮細胞機能を制御していることを報告してきた。



miRNA expression profile in HUVEC. Total RNAs from HUVEC was harvested and hybridized on a microarray for miRNA in triplicate. Data represent highly expressed miRNAs in HUVEC. (n=3 ± S.D.) MIR-34a was expressed in HUVEC.

【血中の microRNA】

「microRNAは血中でも検出可能である」というcirculating microRNAの概念が提唱され、実際の疾患、病態での血中microRNA動態の報告が蓄積されてきた。microRNAは、血中では、担体となる一連の蛋白質群と結合することにより、また、細胞外小胞(extracellular vesicle: EV)に内在されることにより、酵素による分解から免れている。

各疾患において、特有のmicroRNAが観察されることから、所謂バイオマーカーとしての有用性が議論の的になっている。また、近年、EVの中でも能動的に分泌されるexosomeという概念が確立され、exosome内のmicroRNAに注目が集まっている。

2. 研究目的

血管内皮機能評価法は、主に血管内皮細胞由来の一酸化窒素(NO)による血管拡張作用、伸展性を測定する脈波が中心で、未だ安定した血液生化学検査の客観的評価項目がない。したがって、血管の機能を規定するmicroRNAを同定し、測定項目となり得るかを検討した。

次に、血中に存在するmicroRNAについて、臨床レベルでの診断的価値、基礎研究レベルでの機能性の解明について検討した。

さらには、バイオマーカー「低分子RNA」の概念の確立を目指し、血中の低分子RNAの全貌を解析、体系化による血管領域のRNAomeの構築を目指す。

3. 研究の方法

【培養細胞】血管内皮細胞として培養血管内皮細胞のHUVEC(ヒト臍帯静脈内皮細胞)、HAEC(ヒト大動脈内皮細胞)、HPAEC(ヒト肺動脈内皮細胞)を各々のメディアム(Lonza社)により培養して適宜実験に用いた。単球系の細胞はTHP-1、U937(培地はRPMI1640に10%FBSを添加)を用いた。EVを用いる実験に関しては、EVフリーのFBSを使用した。

【細胞の低酸素刺激、サイトカイン刺激】細胞の低酸素刺激は1%の低酸素をhypoxia chamber内に注入して、細胞を培養した。LPS(Enzo社)刺激は通常培養の条件下で行った。

【miRNA発現の半定量】miRNAの発現は細胞もしくは培養上清、分泌小胞などよりRNAをカラム法(キアゲン社)にて抽出し、Taqman microRNA assayでqPCRを行った。

【一酸化窒素関連の測定】

NOの測定は、Cayman社のキットを用いて行った。NOSの定量(eNOS)は、ウエスタンブロット法を用いて行った。

【microRNAの細胞への導入】

HUVECに、precursor-miRNA(前駆miRNA)又はantisense-miRNA(Life Technologiesより購入)をlipofectamine2000で導入した。各蛋白質の発現とリン酸化の検出は、培養細胞溶解液を使用してウエスタンブロット法にて検出した。抗体はCST社、Bioscience社、サンタクルーズ社より適宜購入して使用した。

【細胞外小胞の抽出】細胞培養液中のエクソゾームの回収は、段階的な超遠心を用いて分離した。低速にて細胞のdebrisを除去した後、さらに10,000 x g、20分の遠心を加え、超遠心機で100,000 x g、90分にて得られたペレットをPBSに懸濁したものをエクソソームとして使用した。

4. 研究成果

以下の3事象について、一定の成果を得ることができた。

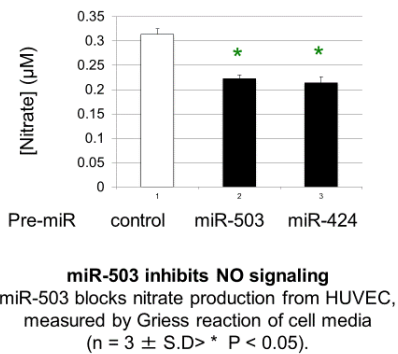
(1) miRNAによる一酸化窒素の生成制御

血管内皮細胞に発現するいくつかの miRNA が NO の産生を抑制することを確認できた。

我々は miR-34a が血管内細胞において細胞の老化を司ることを報告し、その標的蛋白質として老化抑制遺伝子である SIRT1 を見つけてきたが、miR-34a が NO 産生に関わっていることが確認できた。

NO 合成酵素 (NOS) は SIRT1 分子による制御を受けているので、おそらく miR-34a は SIRT1 を介して NOS をコントロールしているものと考えられる。

また、低酸素刺激は多くの microRNA の発現を変化させるが、その中でも miR-503 は低酸素刺激によりその発現が有意に上昇する。この miR-503 が NO の産生を抑制することを見出した (下図: NO の産生が miR-503 の強発現により抑制されている)。現在はその機序の詳細な検討を行っているところである。

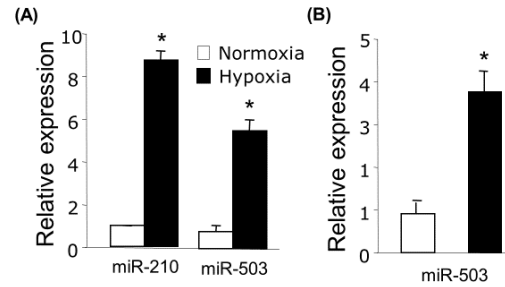


(2) microRNA の細胞外分泌に関する知見

microRNA は細胞外に分泌される。血管内皮細胞の培養系 (HUVEC) からの microRNA の分泌について検討を重ねた。HUVEC 細胞培養液から RNA を抽出、miRNA の qPCR を行うと、miR-126 や miR-223 など細胞内に多く発現している microRNA の一群は検出可能であった。一方、miR-34a や miR-503 は、通常の細胞培養条件では、培養液からの検出は非常に発現が低かった (右上図の A)。

miR-503 は低酸素刺激を加えると、発現量が5倍以上になることが確認できていたので、低酸素条件下で、その培養液中の発現を検討すると、無刺激状態に比べて5倍近くの増加を認めた (右上図の B)。

分泌される microRNA は、細胞からの分泌小胞に内包されているものも多数存在する。培養上清から、細胞外小胞 EV を段階的な超遠心法を用いて抽出した。この EV から RNA を抽出して、microRNA の定量を行うと、先に示した低酸素状態での miR-503 の増加を確認できた。



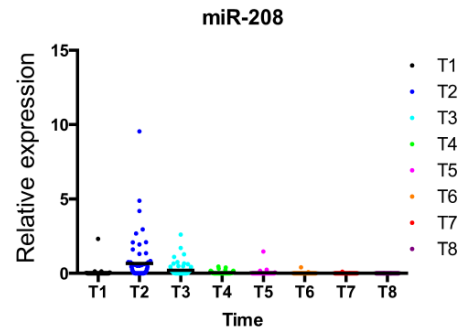
Hypoxia increases miR-503 expression in culture media
(A) Hypoxia increases miR-503 expression in HAEC as measured by qPCR (n = 3 ± S.D>* P < 0.05).
(B) Hypoxia also accumulates miR-503 in media of HAEC.

また、単球系培養細胞を用いて、培養液中への microRNA の放出を検討した。THP-1 細胞、U937 細胞において、LPS 刺激により EV が放出されることを、EV のマーカー CD81、CD9 の発現で確認した。この超遠心で得られた EV について microRNA の定量も試みた。

特に、miR-218 は U937 細胞を LPS などで刺激すると産生亢進が見られ、興味深い細胞機能制御を示す結果が得られている。このプロジェクトは現在進行中である。

(3) 血清、血漿中の miRNA 測定検討

培養細胞からの microRNA の放出は確認できたので、次に、実際のヒト血中での microRNA の検出を検討した。検体は、心臓の冠動脈手術症例で、いずれもインフォームド consent は得られている。当大学倫理委員会承認されたプロトコルに従って、術前日から継続的 (T1 術前、T2 術直後、以下 T3 ~ T8 は順に術後 1, 3, 7, 14, 21, 28 日後) に、血清を採取した。血清より RNA を抽出して、qPCR で microRNA を半定量した。



Cardiac Surgery increases miR-208 in serum
miR-208 expression in patients' sera was measured by qPCR

様々な種類の microRNA を検出できたが、心筋に特異的に発現する miR-208 は、心臓手術直後に高値を示す例が多く、時間とともに血中での検出量は低下していく傾向が見られた (上図)。

このデータは、単に血中の microRNA 測定が可能であることを示しただけではなく、心筋の傷害など特有の病態をかなりの確に捉えることが可能であることを示した。

【今後の展望】

血中の microRNA を介して、血管内皮細胞と血球細胞の細胞間応答が行われること、血中の microRNA は血管内皮機能が制御する大きな因子であることを、今後も引き続き検証していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Panta S, Yamakuchi M, Shimizu T, Takenouchi K, Oyama Y, Koriyama T, Kojo T, Hashiguchi T. Low grade inflammation inhibits VEGF induced HUVECs migration in p53 dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Feb 5;483(2):803-809. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.096. (査読有)

2. Yoshihara N, Terasaki H, Shirasawa M, Kawano H, Sonoda S, Yamaguchi M, Hashiguchi T, Hisatomi T, Ishibashi T, Sakamoto T. PERMEABILITY AND ANTI-VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR EFFECTS OF BEVACIZUMAB, RANIBIZUMAB, AND AFLIBERCEPT IN POLARIZED RETINAL PIGMENT EPITHELIAL LAYER IN VITRO. *Retina*. 2017 Jan;37(1):179-190. doi:10.1097/IAE.0000000000001117. (査読有)

3. Shimizu T, Yamakuchi M, Biswas KK, Aryal B, Yamada S, Hashiguchi T, Maruyama I. HMGB1 is secreted by 3T3-L1 adipocytes through JNK signaling and the secretion is partially inhibited by adiponectin. *Obesity (Silver Spring)*. 2016 Sep;24(9):1913-21. doi: 10.1002/oby.21549. (査読有)

4. Aryal B, Shimizu T, Kadono J, Furoi A, Komokata T, Inoue M, Ikeda S, Fukukura Y, Nakamura M, Yamakuchi M, Hashiguchi T, Imoto Y. A Switch in the Dynamics of Intra-Platelet VEGF-A from Cancer to the Later Phase of Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Humans. *PLoS One*. 2016 Mar 11;11(3):e0150446. doi:10.1371/journal.pone.0150446. (査読有)

5. Zhu Q, Yamakuchi M, Lowenstein CJ. SNAP23 Regulates Endothelial Exocytosis of von Willebrand Factor. *PLoS One*. 2015 Aug 12;10(8):e0118737. doi:10.1371/journal.pone.0118737. (査読有)

[学会発表] (計 14 件)
(国内学会)

1. 山口宗一, 郡山豊泰, 向原公介, 重久喜

哉, 古城剛, 清水利昭, 竹之内和則, 大山陽子, 井本浩, 橋口照人: miRNA による自然免疫制御機構の解明 第 63 回日本臨床検査医学会学術集会 2016 年 9 月 1 日~9 月 4 日 神戸国際会議場 (シンポジウム) (兵庫県神戸市)

2. 大山陽子, 竹之内和則, 古城剛, 郡山豊泰, 福山竜子, 山口宗一, 橋口照人: 血液培養陽性データよりみる検出菌とその臨床背景 第 63 回日本臨床検査医学会学術集会 2016 年 9 月 1 日~9 月 4 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

3. 古城剛, 山口宗一, 吉村明子, 竹之内和則, 伊藤隆史, 清水利昭, 大山陽子, 郡山豊泰, Panta Sushil, 松下昌風, 丸山征郎, 高嶋博, 橋口照人: CalDAG-GEFI 分子異常により血小板機能異常を呈した一症例 第 63 回日本臨床検査医学会学術集会 2016 年 9 月 1 日~9 月 4 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

4. 竹中大喜, 山口宗一, 竹之内和則, 大山陽子, 清水利昭, 郡山豊泰, 古城剛, 橋口照人: miR-22 の血管内皮細胞での役割の検討 第 63 回日本臨床検査医学会学術集会 2016 年 9 月 1 日~9 月 4 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

5. 古城剛, 山口宗一, 吉村明子, 竹之内和則, 伊藤隆史, 清水利昭, 大山陽子, 郡山豊泰, Panta Sushil, 松下昌風, 丸山征郎, 高嶋博, 橋口照人: CalDAG-GEFI 分子異常により血小板機能異常を呈した一症例 第 38 回日本血栓止血学会学術集会 2016 年 6 月 16 日~18 日 奈良春日野国際フォーラム (奈良県奈良市)

6. 山口宗一, 郡山豊泰, 古城剛, 竹之内和則, 清水利昭, 大山陽子, 松下昌風, 橋口照人: *L. pneumophila* 感染マクロファージ系細胞における miRNA の役割 第 38 回日本血栓止血学会学術集会 2016 年 6 月 16 日~18 日 奈良春日野国際フォーラム (奈良県奈良市)

7. 古城剛, 政元いづみ, 山崎家春, 山口宗一, 清水利昭, 大山陽子, 竹之内和則, 郡山豊泰, 松下昌風, 吉満誠, 石塚賢治, 橋口照人: AML 治療経過中に出現した細胞質内封入体様物質 第 27 回日本臨床化学会九州支部総会 (第 61 回日本臨床検査医学会九州地方会合同開催) 2016 年 3 月 19 日 長崎大学 (長崎県長崎市)

8. 郡山豊泰, 山口宗一, 竹之内和則, 大山陽子, 清水利昭, 松下昌風, 橋口照人: マクロファージ様感染細胞における miR-218 の役割 第 27 回日本臨床化学会九州支部総会 (第 61 回日本臨床検査医学会九州地方会合同開

催) 2016年3月19日 長崎大学(長崎県長崎市)

9. 郡山豊泰、山口宗一、竹之内和則、大山陽子、清水利昭、橋口照人: L. pneumophila 感染単核系細胞における miRNA 解析 第 62 回日本臨床検査医学会 2015 年 11 月 19 日~22 日長良川国際会議場・岐阜都ホテル(岐阜県岐阜市)

10. ビベック・アリアル, 清水利昭, 山口宗一, 門野潤, 菰方輝夫, 風呂井彰, 橋口照人, 井本: A bidirectional role of platelet sequestered VEGF-A in HCC and liver regeneration 第 62 回日本臨床検査医学会 2015 年 11 月 19 日~22 日 長良川国際会議場・岐阜都ホテル (岐阜県岐阜市)

11. 清水利昭, 山口宗一, 竹之内和則, 丸山征郎, 橋口照人: HMGB1 は大型脂肪細胞から分泌される炎症性のアディポサイトカインでありインスリン抵抗性を誘導する 第 55 回年次学術集会 2015 年 10 月 30 日~11 月 1 日 大阪大学コンベンションセンター(大阪府吹田市)

12. Toyoyasu Koriyama, Munekazu Yamakuchi, Tuyoshi Kojo, Ryuko Fukuyama, Masakaze Matsushita, Teruto Hashiguchi: The significance of miRNA measurement in Legionella pneumophila infection 第 64 回日本医学検査学会 2015 年 5 月 16 日~17 日 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

(国際学会)

1. Munekazu Yamakuchi: Integration of All Laboratory Data System for Supporting the Analysis of Target Pathological Conditions in the Hospital CBS2016 (The 10th international conference of clinical laboratory automation) 2016. 4. 20-22 Seoul, Korea GLAD Hotel Yeouido (韓国ソウル市)

2. Munekazu Yamakuchi, Toshiaki Shimizu, Kazunori Takenouchi, Yoko Oyama, and Teruto Hashiguchi Regulation of Tumor Development by microRNAs - Do microRNAs link to cancer-associated thrombosis? 第 37 回日本血栓止血学会学術集会 学術推進委員会 (SPC) シンポジウム 1 2015 年 5 月 21 日 甲府市総合市民会館(山梨県甲府市)

[図書](計 1 件)

1. 山口宗一 血管医学検査 基礎から臨床へ 血管病のマイクロ RNA: 血管医学 16 巻 3 号 297-303 2015 年

ホームページ

<http://www2.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~mdi>

[o/list/j/jl/index.html](http://www2.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~mdi/o/list/j/jl/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 宗一 (MUNEKAZU YAMAKUCHI)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授
研究者番号: 60709301

(2) 研究分担者

丸山 征郎 (IKURO MARUYAMA)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・
特任教授
研究者番号: 20082282

伊藤 隆史 (Takashi Ito)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・
特任講師
研究者番号: 20381171

橋口 照人 (HASHIGUCHI TERUTO)

鹿児島大学・医歯学域医学系・
教授
研究者番号: 70250917

清水 利昭 (SHIMIZU TOSHIAKI)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教
研究者番号 50468055

大山 陽子 (OYAMA YOKO)

鹿児島大学・附属病院・
特任助教
研究者番号: 20583470

竹之内 和則 (TAKENOUCHI KAZUNORI)

鹿児島大学・附属病院・
医員
研究者番号: 30646758