

令和元年6月24日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09474

研究課題名(和文) miRNAの膠原病性肺動脈性肺高血圧症のバイオマーカーとしての有用性と役割の解明

研究課題名(英文) Comprehensive Searching for Circulating mircoRNAs as a Novel Biomarker for Pulmonary Arterial Hypertension

研究代表者

江口 正倫 (EGUCHI, Masamichi)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：70585405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肺動脈性肺高血圧症(PAH)は、昨今、新しい治療薬が開発されてはいるが、いまだ予後不良の疾患である。特に膠原病性肺動脈性肺高血圧症(CTD-PAH)の予後は非常に悪い。今回我々はCTD-PAH症例で上昇するmiRNAを数種類、特定する事が出来た。その一つであるmiRNA-4674はCTD-PAHの平均肺動脈圧と相関関係が認められた。また、肺動脈平滑筋細胞にmiRNA-4674を発現させると、増殖能が上昇し、抗アポトーシス能が増強された。今後miRNA-4674がCTD-PAHの新たな治療のターゲットとなり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺動脈性肺高血圧症(PAH)は、昨今、新しい治療薬が開発されてはいるが、いまだ予後不良の疾患である。特に膠原病性肺動脈性肺高血圧症(CTD-PAH)の予後は非常に悪い。本研究結果はCTD-PAHの早期発見が可能となり、予後の改善が可能となる、また、既存の治療薬とは異なる、新しいPAHの治療ターゲットとなり得る事が示唆され、CTD-PAHの患者の予後をさらに改善することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary arterial hypertension(PAH) is a frequent complication in connective tissue diseases (CTD) and is associated with a high degree of mortality. Micro RNAs (miRNAs) function in various cellular activities. However, the role of miRNA in connective tissue disease-pulmonary arterial hypertension (CTD-PAH) is not fully understood. We assessed the hypothesis that whether serum miRNA expression can serve as a novel biomarker of CTD-PAH and evaluates the possibility that miRNA is involved in the pathogenesis of CTD-PAH. The expression miR-4674 was increased in the patients with CTD-PAH. High miR-4674 expression correlated with mean PA pressure. Next, we investigated the gain and loss of miR-4674 function by analyzing the bioactivity of pulmonary arterial smooth muscle cells (hPASMC). miRNA-4674 increased cells proliferation and protect cells against apoptosis. Interference with this pathway may offer novel approaches to treating CTD-PAH.

研究分野：循環器内科

キーワード：肺動脈性肺高血圧症 バイオマーカー micro RNA

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

1. 研究開始当初の背景

我が国において強皮症(SSc)の罹患率は100万人に30-300人程度と報告されており、そのうち11.4%が肺動脈性肺高血圧症(PAH)を合併する。抗セントロメア抗体陽性の全身性強皮症にPAHが多いといわれているが、日本人ではその発生頻度は2%以下と稀であり、それだけが病因とは言い難い。特にPAHを合併したSScは無治療の場合の5年生存率が40%未満であり、PAHは予後規定因子の筆頭である。また、エンドセリン受容体拮抗薬などの新しい薬剤が開発、投与されているが、依然予後は不良であり、膠原病におけるPAHの病態解明と早期に適切な治療介入が必要である。昨今、PAHモデル動物の肺には骨髄から遊走してきた細胞が認められており、難治性の強皮症では骨髄細胞移植療法が行われ、皮膚所見の改善を認める報告がある。このことから膠原病性肺動脈性肺高血圧症(CTD-PAH)の病因に骨髄細胞が関与していることが推察されるが、膠原病症例がPAHを起こす病因は未だ解明されていない。

microRNA(miRNA)は、ゲノム上にコードされ、20から25塩基長の微小RNAからなる機能的な核酸である、この鎖長の短いmiRNAは、機能的なnon-coding RNAに分類されており、ほかの遺伝子の発現を調節するという、生命現象において重要な役割を担っている。またmiRNAはmicrovesicle内に封入後、細胞外に放出され、細胞、組織間の相互作用に重要な役割を担っている。Peinadoらは、皮膚癌細胞から放出されるmicrovesicleにより誘導された骨髄細胞は、全身に分布し、癌の転移しやすい環境を作り、癌転移を促進することを報告している(Nat Med.2012)。また、Shahooらは心筋梗塞発症後、miRNAを含んだmicrovesicleが骨髄と虚血心筋細胞間の連絡を担い、骨髄から前駆細胞を誘導し、虚血心筋の保護や再生を行うことを報告している(Cir Res 2014)。これらのことは障害臓器と骨髄との情報交換でmiRNAが重要な役割を果たしていることを示している。PAH症例の血液中(C Wei, PLOS 2013) また、膠原病の血液中、幾つかのmiRNAが増減していることが報告されている。しかし、これからのmiRNAがPAHや膠原病の病因と関係しているかは、いまだ不明である。

2. 研究の目的

研究代表者は、膠原病性肺動脈性肺高血圧症(CTD-PAH)の血中に特異的に増加する

microRNA(miRNA)を探索

する。miRNAは血中にも存在し、組織-組織間の連絡物質としての役割も担っている。膠原病にPAHを合併する機序は不明であり、骨髄細胞が関与している可能性がある。本研究ではmiRNAを足がかりに膠原病症例でPAHを発症するメカニズムに骨髄

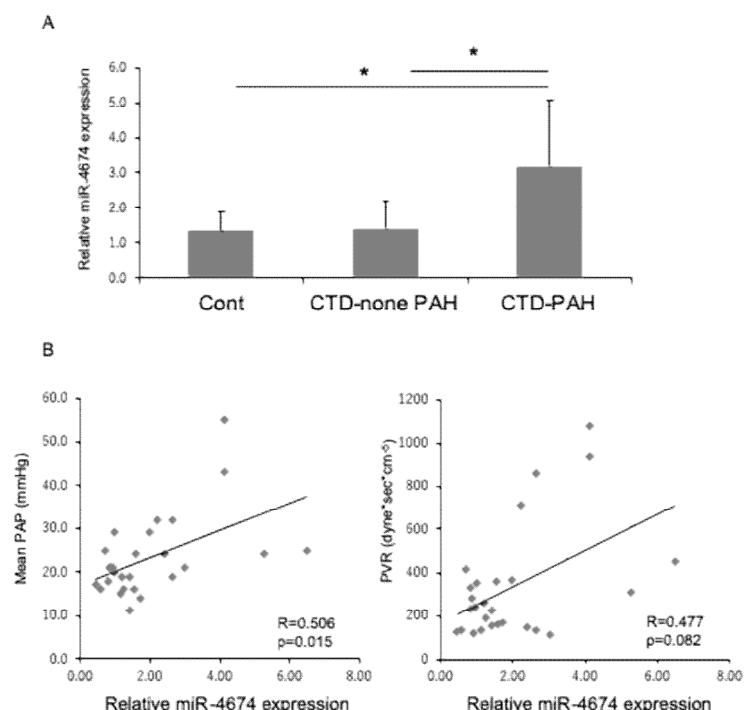


図1 血液中のmiR-4764とCTD-PAHの関連性 A, miRNA-4764はCTD-PAHの血中で有意に高値であった。B, mPAPとmiR-4764の血液中濃度には正の相関関係が認められた。

細胞の関与していることを解明し、早期診断や、治療薬への臨床応用に展開するための基盤となる研究を行う。計画している具体的な研究項目は(1)CTD-PAHで上昇、かつ肺循環で増加し、疾患のバイオマーカーや治療の標的になりうる miRNA の働きを解明する。(2)CTD-PAHで上昇、体循環(骨髄)で増加する PAH の増悪因子となりうる miRNA の働きを解明し、骨髄細胞が肺組織に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、まず、

- (1) CTD-PAH の血中で高く、肺循環で上昇した miRNA-A について検討。(CTD-PAH 症例の肺組織で上昇し、血液中に分泌された miRNA)。miRNA-A が PAH のバイオマーカーとしての有用性の検討する。

臨床検体で CTD-PAH で特異的に上昇する miRNA-A を検討する。

肺動脈平滑筋細胞(PASMC)に miRNA-A を導入して、その生物学的活性を評価する。

miRNA-A の標的遺伝子をルシフェラーゼアッセイを用いて、探求する。

PAH の増悪因子と考えられる、Endothelin-1 や platelet-derived growth factor(PDGF)、低酸素などの負荷を行い、PASMC で miRNA-A が上昇する増悪因子を特定する。

- (2) CTD-PAH の血清で高く、体循環で増加する miRNA-B について検討。

(CTD-PAH 症例の体循環(骨髄)で上昇し肺組織に取り込まれ PAH に影響を及ぼした miRNA)

これまでの micro array の結果、約 10 個の候補となる miRNA が認められた。

10 個の候補の中から miRNA-B を特定する。

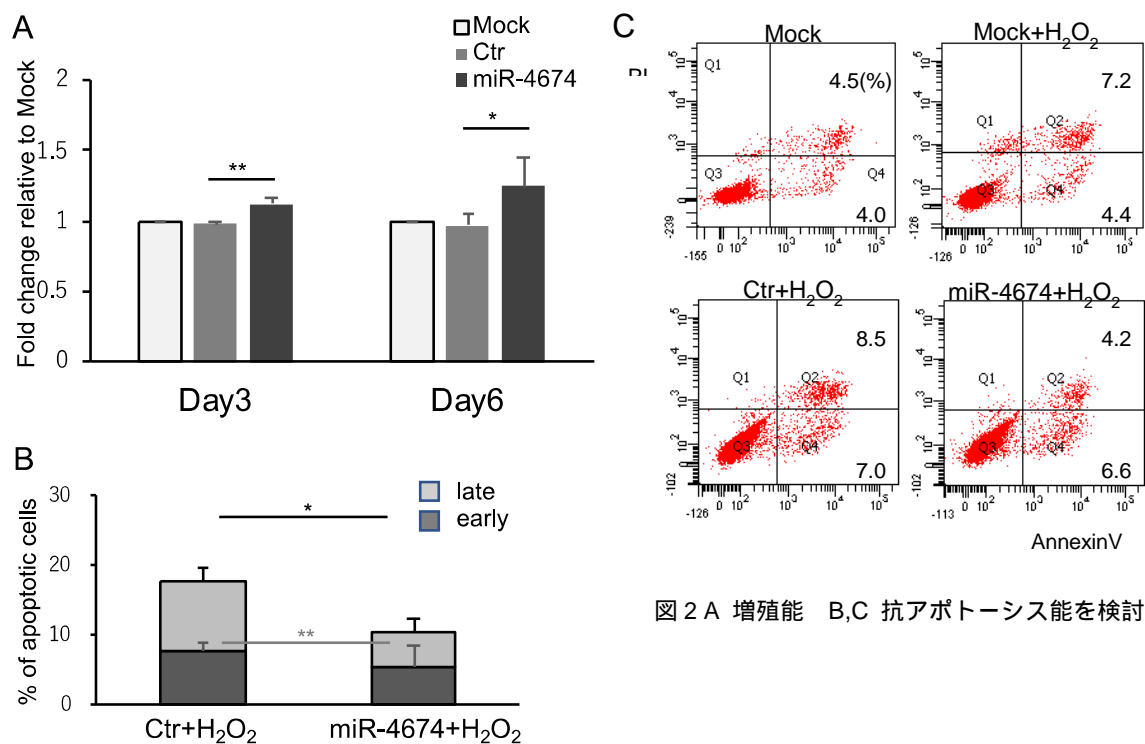


図 2 A 増殖能 B,C 抗アポトーシス能を検討

4 . 研究成果

我々は、CTD-PAH に特異的に上昇する miRNA を網羅的に検索した。Micro array を用いて、CTD-PAH 症例の肺動脈血と左心室血から肺循環で特異的に上昇する miRNA を数種類、特定する事が出来た。その一つである miRNA-4674 は CTD-PAH の血液中で高値(図 1A)であり、平均肺動脈圧と正の相関関係が認められた(図 1B)。

また、ヒトの PASMC に miRNA-4674 を強制導入させ、生物学的活性を評価した。miR-4674 を導入された PASMC では、増殖能が上昇し(図 2A)、抗アポトーシス能が増強された(図 2B,C)。

そのメカニズム解明のため、標的となる messengerRNA(mRNA) の解析を行った。まず、Target Scan で miR-4674 の標的となる mRNA をリスト化し、miR-4674 を導入された PASMC で低下、miR-4674 阻害剤を含む PASMC で増減のない mRNA を探索、アポトーシス促進作用がある BCL2 antagonist/killer 1(BAK-1) に着目した。BAK-1 mRNA の 3`UTR を導入し、ルシフェラーゼアッセイで検証した結果、miR-4674 は BAK-1 mRNA 3`UTR に結合し、BAK-1 の合成を阻害していることが証明された。

次に、PAH の増悪因子である、Endothelin-1 や PDGF、低酸素培養で PASMC を刺激して miR-4674 の発現を検証した。その結果、低酸素で刺激した群で miR-4674 の発現は有意に増加した(図 3)。

また、CTD-PAH で上昇、体循環(骨髄) で増加する PAH の増悪因子となりうる miRNA-B の同定を行ったが、条件を満たすような miRNA は見出すことが出来なかった。

miRNA-4674 は CTD-PAH の血液中で有意に増加しており、miRNA-4674 が肺動脈平滑筋細胞で上昇し、その増殖や抗アポトーシスに関与している事を見出した。今後 miRNA-4674 が CTD-PAH の新たな治療のターゲットとなり得ることが示唆された。

引用文献

Peinado H, Nat Med. 2012 Jun;18(6):883-91
Sahoo S Circ Res. 2014 Jan 17;114(2):333-44
Wei C, PLoS One. 2013 May 23;8(5):e64396

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

Masamichi Eguchi, Satoshi Ikeda, Takayuki Isagawa, Hiroaki Kawano, Yuji Koide, Koji Maemura Comprehensive Searching for Circulating microRNAs as a Novel Biomarker for Pulmonary Arterial Hypertension、AHA scientific sessions 2018、2018

江口正倫、池田聡司、砂河孝之、前村浩二 MicroRNA の膠原病性肺動脈性肺高血圧症のバイオマーカーとしての可能性、第 47 回日本心脈管作動物質学会年会、2018

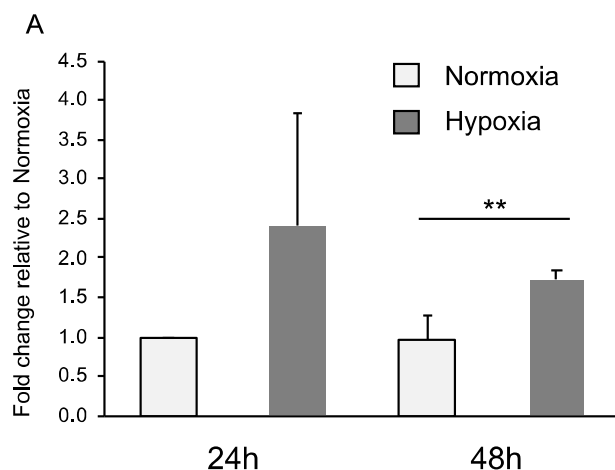


図3 低酸素刺激でのmiR-4674の発現

Masamichi Eguchi, Satoshi Ikeda, Miyuki Miura, Daisuke Sato, Seiji Koga, Toshiro Katayama, Yuji Koide, Hiroaki Kawano, Koji Maemura Comprehensive Searching for Circulating mircoRNAs as a Novel Biomarker for CTD-PAH、BCVR 2018(第1回 日本循環器学会基礎研究フォーラム) 2018

江口正倫、池田聡司、砂河孝之、前村浩二 膠原病性肺動脈性肺高血圧症の関連する MicroRNA の網羅的解析、第2回 日本肺高血圧・肺循環学会学術集会、2017

江口正倫、池田聡司、砂河孝之、前村浩二 膠原病性肺動脈性肺高血圧症(CTD-PAH)のバイオマーカーとしてのマイクロ RNA の網羅的な探索、日本臨床分子医学会、2017

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名： 前村 浩二

ローマ字氏名： MAEMURA, Koji

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科(医学系)

職名：教授

研究者番号(8桁)：90282649

研究分担者氏名： 池田 聡司

ローマ字氏名： IKEDA, Satoshi

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科(医学系)

職名：准教授

研究者番号(8桁)：10336159

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。