

令和元年6月20日現在

機関番号：24701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15380

研究課題名(和文) 遺伝子発現制御システムの機能解析に基づいた新規予防医学的バイオマーカー開発

研究課題名(英文) Studies for preventive biomarkers based on genotypes and gene expression regulation system

研究代表者

牟礼 佳苗 (Mure, Kanae)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90268491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：加齢に伴う疾患の共通発症基盤である血管内皮機能障害や酸化ストレスを標的とし、発症に至る初期段階での検出には、遺伝子レベルでの評価が重要と考え、遺伝子型の解析に加え、エクソソーム内包miRNAの発症予知マーカーとしての可能性に着目し、検討した。PPARG遺伝子の125 C/G多型(rs1801282)、PON1遺伝子の672 A/G多型(rs662)、PLA2G7遺伝子の994 A/C多型(rs76863441)などの遺伝子多型と動脈硬化指標とに関連が見られた。また、血中および尿中エクソソーム内包miR-126やmiR-21が、動脈硬化指標や酸化ストレス指標と関連を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、疾患診断治療領域において精力的に機構解明研究が行われているmRNAを標的とした遺伝子発現制御機構であるマイクロRNA(miRNA)について、一般住民を対象とした大規模健診において、加齢に伴う疾患の共通発症基盤と考えられる血管内皮機能障害や酸化ストレスの鋭敏な指標となるかについて、遺伝子型の影響も含めて検討した。

本研究より、血中および尿中エクソソーム内包miRNAが血中コレステロールや酸化ストレス指標と関連することが明らかとなった。解析対象者を増やし、遺伝子型との関連についても総合的に解析することで、鋭敏なバイオマーカーになり得るかについて検討する基盤となる成果が得られたと考える。

研究成果の概要(英文)：In the present study, the genotypes and exosomal miRNA associated with the endothelial dysfunction and oxidative stresses have analyzed as preventive markers that can predict the onset of diseases related to aging. As for the genotypes, PPARG 125 C/G polymorphism rs1801282, the PON1 672 A/G polymorphism (rs662) and PLA2G7 994 A/C polymorphism (rs76863441) have shown significant relationships between arteriosclerosis indices. Soluble oxidized LDL receptor and urinary 8-iso-prostaglandin F2 were also associated with those indices. Furthermore, exosomal miR-126 and miR-21 showed significant association with arteriosclerosis indices. Taken together these results, it is suggested that the genotype analyzed in this study and miRNA in blood and urine exosomes could be preventive markers.

研究分野：分子予防医学

キーワード：動脈硬化 遺伝子型 miRNA

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

1. 研究開始当初の背景

超高齢化が急速に進展する近年、加齢に伴う疾患の予防には、発症の初期段階を早期に予知できる鋭敏なバイオマーカーの開発が喫緊の課題である。疾患診断治療領域では、mRNAを標的とした遺伝子発現制御機構である22ヌクレオチド以下の一本鎖マイクロRNA (miRNA) について、診断のための発現プロファイリングや、遺伝子治療を目的とした機構解明が精力的にされている。しかしながら、一般住民を対象とした大規模健診において、発症に至る初期段階を検出する予防医学的バイオマーカーとしての解析を行っている研究は、まだ例が少ない。一方、近年、血液や尿など体液中の膜小胞エクソソーム内包miRNAの単離法が開発されたことにより、miRNA研究は著しく活発化している。

申請者は、動脈硬化症・糖尿病・認知症等、加齢に伴う疾患の個別化予防法確立を目的とし、共通発症基盤である血管内皮機能障害を標的に研究を行っている。発症に至る初期段階での検出には、遺伝子レベルでの評価が重要と考え、遺伝子型の解析に加え、エクソソーム内包miRNAの発症予知マーカーとしての可能性に着目し、検討している。個別化予防法確立を目的とした予防医学的バイオマーカーに応用するには、より詳細な体内動態解析、さらに、血管内皮機能に関する遺伝子多型との相互作用を考慮した機能解析が重要であると考えた。

2. 研究の目的

地域住民を対象に、動脈硬化症・糖尿病・認知症等、加齢に伴う疾患の個別化予防法確立を目的とし、共通発症基盤である血管内皮機能障害を標的にして、発症に至る初期段階での検出には、遺伝子レベルでの評価が重要と考え、遺伝子型の解析に加え、エクソソーム内包miRNAの発症予知マーカーとしての可能性に着目し、予防医学的バイオマーカーになり得るかについて検討することを目的とした。

3. 研究の方法

2014年から2017年度までに実施された動脈硬化健診受診者のうち、同意を得た約2,232人を対象とした。男性は1,017人(63.4±10.1歳)、女性は1,215人(63.8±9.5歳)であった。対象者には書面にて説明を行い、同意を得た。本研究は和歌山県立医科大学遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会の承認(承認番号:92)を得て実施した。

(1) 動脈硬化指標として、血圧、中性脂肪 (triglyceride: TG)、high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C)、low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C)、尿中アルブミンクレアチニン比 (UACR)、high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) などの他、非侵襲性動脈硬化指標とされる脈波伝播速度 (brachial ankle pulse wave velocity: baPWV) および頸動脈中膜内膜肥厚 (carotid intima media thickness: CIMT)、さらに空腹時血糖 (fasting plasma glucose: FPG)、ヘモグロビンA1c (HbA1c) などを測定した。

(2) 遺伝子多型として、peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARG) の125 C/G多型 (rs1801282)、paraoxonase 1 (PON1) の672 A/G多型 (rs662)、lipoprotein-associated phospholipase (PLA2G7) の994 A/C多型 (rs76863441) などの遺伝子型について、TaqMan法を用いてリアルタイムPCRにより判別した。

(3) また、250人の対象者について、血管内皮機能指標として、血清中の可溶性酸化LDL受容体であるsLOX-1量 (soluble lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1) をELISA法 (LOX-1.OLR Human Elisa Kit, #EHOLR1, Thermo Fisher Scientific社) により測定した。また、酸化ストレス指標として尿中8-iso-prostaglandin F₂ α (8-iso-PGF₂ α) を、ELISA法 (Urinary Isoprostane EIA Kit, #E85, Oxford Biomedical社) により測定した。

(4) さらに40人の対象者について、血中および尿中エクソソームを Total Exosome Isolation Kit from serum/urine (Thermo Fisher Scientific社) を用いて回収した。内包miRNAについては、Total Exosome RNA & Protein Isolation Kitによりtotal RNAを抽出し、さらにmirVana miRNA Isolation Kit (共にThermo Fisher Scientific社) を用いてsmall RNAを単離した。

動脈硬化に関連することが報告されているmiR-126、miR-133a、miR-221およびmiR-222、さらに炎症やアポトーシスに関連するとされるmiR-21、miR-22、miR-34a、miR-155、miR-449などについて、TaqMan miRNA Assayを使用してリアルタイムPCRにより発現量を定量解析した。

上記の動脈硬化指標、血管内皮機能指標と遺伝子型およびmiRNA発現量との相互関連を解析し、個別化予防法に応用できるかについて検討した。

統計解析は、すべてJMP Pro ver. 14 (SAS社) を使用した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子型と各指標との関連について、年齢、body mass index (BMI)、喫煙習慣、運動習慣、飲酒習慣、服薬状況 (降圧剤・血糖降下剤・抗コレステロール剤)、性別を共変量とした共分散分析を行った結果、PPARG 遺伝子 (125 C/G) 多型において、G アレル保有者が有意に拡張期血圧高値 ($P=0.004$) および baPWV 高値 ($P=0.044$) を示した。PON1 遺伝子 (672 A/G) 多型においては、G アレル保有者が有意に収縮期血圧および拡張期血圧高値を示し ($P=0.022$ 、 $P=0.018$)、また hsCRP 高値 ($P=0.041$) および HbA1c 高値 ($P<0.001$) を示した。PLA2G7 遺伝子 (994 A/C) 多型では、A アレル保有者が有意に baPWV 高値を示すなどの結果を得た ($P=0.006$)。

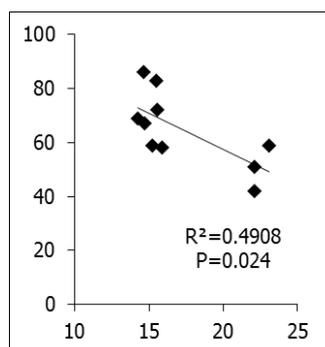
血管内皮機能および酸化ストレス指標として血中 sLOX-1 および尿中 8-iso-PGF2 α 濃度を一部の対象者において測定した結果を、年齢、BMI、喫煙習慣、運動習慣、飲酒習慣、服薬状況 (降圧剤・血糖降下剤・抗コレステロール剤)、性別を共変量とした重回帰分析により解析した。血中 sLOX-1 濃度は HDL-C と有意な負の関連 ($\beta=-0.09$ 、 $P=0.033$) を示した。一方、尿中 8-PGF2 α 濃度については、HDL-C と有意な正の関連 ($\beta=0.13$ 、 $P=0.007$)、baPWV と有意な正の関連を示した ($\beta=0.11$ 、 $P=0.008$)。

また、これらの指標に有意な影響を及ぼす遺伝子型は、今回の解析ではなかった。唯一 PPARG 遺伝子の 125C/G 多型において、G アレル保有者において sLOX-1 濃度が高い傾向が示されたが、有意ではなかった ($P=0.052$)。

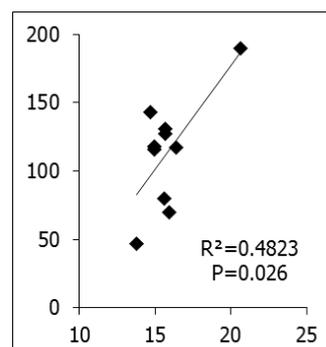
以上の結果から、本研究において解析した遺伝子型は、動脈硬化指標に関連を示すものの、その背景は必ずしも酸化 LDL や酸化ストレス指標で説明できるものではなく、ほかのシグナル経路が影響を及ぼしていることが示唆された。しかしながら、本研究で解析した遺伝子型およびその組み合わせは、個別化予防に応用できる可能性が示唆された。

(2) つぎに、血中および尿中エクソソーム内包 miRNA の発現量と、各指標との関連について検討した。

下図に示したように、血中 miR-126 は、HDL-C と負の関連を、尿中 miR-126 は LDL-C と正の関連を示した。



血中 miR-126 と HDL-C との関連



尿中 miR-126 と LDL-C との関連

この他、血中 miR-21 は LDL-C と有意な正の関連を ($P=0.041$) 示し、miR-155 も有意に性の関連を示した ($P=0.048$)。

また、血管内皮機能指標である sLOX-1 と関連を示した miRNA はなかったが、酸化ストレス指標である 8-iso-PGF2 α については、血中および尿中 miR-21 が有意な正の関連を示し ($P=0.044$ 、 $P=0.0430$)、また血中および尿中 miR-221 は有意な負の関連を示した ($P=0.044$ 、 $P=0.049$)。

本研究より、血中および尿中エクソソーム内包 miRNA が LDL-C および酸化ストレス指標と関連することが明らかとなったが、今後解析対象者を増やし、遺伝子型との関連についても総合的に解析することで、鋭敏なバイオマーカーになり得るかについて検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Shiotani A, Ishikawa H, Mutoh M, Takeshita T, Nakamura T, Morimoto K, Sakai T, Wakabayashi K, Matsuura N (2019) Impact of Diarrhea after Drinking on Colorectal Tumor Risk: A Case Control Study, *Asian Pac J Cancer Prev.* 20: 795-799.
DOI: 10.31557/APJCP.2019.20.3.795

大西 修平、宮井 信行、内海 みよ子、牟礼 佳苗、竹下 達也、志波 充、有田 幹雄 (2019) 肝疾患の治療歴のない高齢層の一般住民における肝の線維化と骨格筋量の減少との関連、*日衛誌.* 74: 1-10.
DOI: 10.1265/jjh.18031

牟礼 佳苗、石川 秀樹、アスピリンの大腸がん予防効果 (2017) *実験医学.* 35: 124-9.
Nagano S, Takahashi M, Miyai N, Oka M, Utsumi M, Shiba M, Mure K, Takeshita T, Arita M (2017) Association of serum uric acid with subsequent arterial stiffness and renal function in normotensive subjects, *Hypertens Res.* 40: 620-4.
DOI: 10.1038/hr.2017.10

Yamazaki H, Fujieda M, Shimizu M, Shimabukuro M, Mure K, Takeshita T, Ishikawa H (2017) Effects of meat intake frequency and polymorphic cytochrome P450 2A6 activity on individual colorectal tumour risk in Japanese cohort. *Int J Food Sci and Nutri.* 8: 645-652.
DOI: 10.4236/jct.2017.87055.

Takeshita T (2017) Prevention of alcohol-related health harm in the workplace. *Ind Health.* 55: 403-405.
DOI: 10.2486/indhealth.55-403

Oka M, Yamamoto M, Mure K, Takeshita T, Arita M. (2016) Relationships between Lifestyle, Living Environments, and Incidence of Hypertension in Japan (in Men): Based on Participant's Data from the Nationwide Medical Check-Up. *PLoS One.* 11: e0165313.
DOI: 10.1371/journal.pone.0165313. eCollection 2016

Hashimoto M, Miyai N, Hattori S, Iwahara A, Utsumi M, Arita M, Takeshita T. (2016) Age and gender differences in the influences of eNOS T-786C polymorphism on arteriosclerotic parameters in general population in Japan. *Environ Health Prev Med.* 21: 274-82.
DOI: 10.1007/s12199-016-0527-1

Hashimoto M, Watanabe M, Uematsu Y, Hattori S, Miyai N, Utsumi M, Oka M, Hayashida M, Kinoshita K, Arita M, Takeshita T. (2016) Relationships of alcohol dehydrogenase 1B (ADH1B) and aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) genotypes with alcohol sensitivity, drinking behavior and problem drinking in Japanese older men. *Environ Health Prev Med.* 21: 138-48.
DOI: 10.1007/s12199-016-0507-5

[学会発表](計 20 件)

上杉 弥優、牟礼 佳苗、服部 園美、宮井 信行、内海 みよ子、上松 右二、志波 充、有田 幹雄、竹下 達也、多価不飽和脂肪酸による尿酸の抑制は NOS3(rs1799983)および LRP2(rs2544390)多型に依存する、第 89 回日本衛生学会学術総会、2019.

海老 泰文、牟礼 佳苗、中 喬弘、上杉 弥優、服部 園美、宮井 信行、内海 みよ子、上松 右二、志波 充、有田 幹雄、竹下 達也、酸化 LDL 受容体遺伝子 OLR1 多型が血圧・糖代謝・血中脂質・炎症指標に与える影響は服薬状況により異なる、第 89 回日本衛生学会学術総会、2019.

中 喬弘、牟礼 佳苗、海老 泰文、上杉 弥優、服部 園美、宮井 信行、内海 みよ子、上松 右二、志波 充、有田 幹雄、竹下 達也、抗酸化酵素 PON1 遺伝子型が血圧・糖代謝・血中脂質・炎症指標に与える影響は服薬状況により異なる、第 89 回日本衛生学会学術総会、2019.

清水 万紀子、浦岡 未来、桑島 愛生、野口 みく、横山 悠香、牟礼 佳苗、山崎 浩史、日常生活下の動脈硬化症に対するチトクロム P450 2A6 遺伝子型診断活用の可能性、日本薬学会第 139 年会、2019.

Tateishi K, Mure K, Hayakawa H, Miyai N, Utsumi M, Uematsu Y, Takeshita T, Shiba M, Arita M, Association of novel risk factors of cardiovascular disease with baPWV in a large cohort of adults, 28th European meeting on Hypertension and Cardiovascular protection, 2018.

Fukui A, Mure K, Shimabukuro M, Miyai N, Utsumi M, Uematsu Y, Takeshita T, Shiba M, Arita M, Low density lipoprotein cholesterol level, pulse pressure and uric acid are associated with carotid intima-media thickness in Japanese general population, 28th European meeting on Hypertension and Cardiovascular protection, 2018.

宮井 信行、塩崎 万起、長友 奈央、寒川 友起子、島袋 美絵、牟礼 佳苗、竹下 達也、内

海 みよ子、宮下 和久、有田 幹雄、中年期の正常域血圧者における喫煙が運動負荷に伴う中心動脈圧波形の変化に及ぼす影響、第 41 回日本高血圧学会総会、2018.

日置 雄一郎、水越 正人、宮井 信行、竹下 達也、有田 幹雄、年齢別にみた緑茶摂取量と動脈スティフネスの関連、第 41 回日本高血圧学会総会、2018.

植田 京子、榎葉 歩、大植 知穂、小林 啓晋、牟礼 佳苗、竹下 達也、宮井 信行、内海 みよ子、有田 幹雄、高血圧チーム医療：農村地域における高血圧の予防と対策（保健師の立場から）、第 7 回臨床高血圧フォーラム、2018.

上杉 弥優、牟礼 佳苗、岸田 邦博、島袋 美絵、服部 園美、宮井 信行、内海 みよ子、竹下 達也、有田 幹雄、地域住民コホートにおける多価不飽和脂肪酸と血清中可溶性 LOX-1 濃度との関連、第 88 回日本衛生学会学術総会、2018.

島袋 美絵、牟礼 佳苗、竹下 達也、服部 園美、宮井 信行、内海 みよ子、上松 右二、志波 充、有田 幹雄、ADH1B 及び ALDH2 遺伝子多型が血中脂質、動脈硬化指標及び血圧に与える影響、第 88 回日本衛生学会学術総会、2018.

Nagatomo N, Miyai N, Okano Y, Morishita M, Uchikawa Y, Yamamoto M, Shimabukuro M, Mure K, Utsumi M, Takeshita T, Arita M, The effects of smoking on central blood pressure in middle-aged and elderly Japanese individuals, 27th European meeting on Hypertension and Cardiovascular protection, 2018.

Miyai N, Shinozaki M, Nagatomo N, Uchikawa Y, Terada K, Mure K, Utsumi M, Takeshita T, Miyashita K, Arita M, The impact of smoking on central aortic pressure to exercise in middle-aged normotensive individuals, 27th European meeting on Hypertension and Cardiovascular protection, 2018.

清水 万紀子、横山 悠香、野口 みく、星野 有沙、島袋 美絵、竹下 達也、宮井 信行、内海 みよ子、志波 充、有田 幹雄、牟礼 佳苗、山崎 浩史、生活習慣病に対するチトクロム P450 2A6 遺伝子型診断活用の可能性、日本薬学会第 138 年会、2018.

牟礼 佳苗、島袋 美絵、竹下 達也、岡 檀、服部 園美、宮井 信行、内海 みよ子、有田 幹雄、不飽和脂肪酸と動脈硬化指標との関連への PON1 Q192R 多型の影響 (Nutrigenetics) 研究、第 87 回日本衛生学会学術総会、2017.

島袋 美絵、牟礼 佳苗、竹下 達也、服部 園美、宮井 信行、内海 みよ子、上松 右二、有田 幹雄、PON1 Q192R 多型が血圧・動脈硬化指標に与える影響、第 87 回日本衛生学会学術総会、2017.

牟礼 佳苗、島袋 美絵、竹下 達也、OLR1 遺伝子多型 (rs1050286) が喫煙と動脈硬化指標との関連に与える影響、第 16 回日本分子予防環境医学研究会、2017.

島袋 美絵、竹下 達也、牟礼 佳苗、OLR1 遺伝子多型が PLA2G7 遺伝子多型と動脈硬化指標との関連に与える影響、第 16 回日本分子予防環境医学研究会、2017.

牟礼 佳苗、J-CAPP StudyII グループ、アスピリンによる大腸がん予防 (J-CAPP StudyII) - 個別化予防への挑戦 -、2017 がん予防学術大会、2017.

Mure K, Shimabukuro M, Takeshita T, Oka M, Miyai N, Arita M, Association of Lp-PLA2(PLA2G7)V279F genotypes with atherosclerotic markers in the general Japanese population, The 26th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, 2016.

〔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

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：竹下 達也

ローマ字氏名：Takeshita Tatsuya

所属研究機関名：和歌山県立医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：20150310

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。