

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H02184

研究課題名(和文) マイクロRNAに着眼した虚血性心疾患でのJapanese paradoxの解明

研究課題名(英文) Clarification of the mechanism for Japanese paradox regarding ischemic heart disease by using microRNA

研究代表者

若林 一郎 (Ichiro, Wakabayashi)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：70220829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：わが国では欧米先進国に比べて虚血性心疾患による死亡率は著明に低い。この原因解明の目的で、血中マイクロRNA (miRNA)のレベルを網羅的に解析し、日本人とオーストリア人の男性で比較検討した。両国間で372種類のmiRNAに有意差を認め、これらの標的分子として、血管平滑筋細胞のコラーゲンおよび泡沫細胞のサイトカイン(IL-1、IL-6、IL-8、TNF)とMMP(3,9)が示唆された。また、虚血性心疾患と関連することが報告されている12種類のmiRNAの血中レベルに両国間で有意差を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本では欧米に比べて心筋梗塞などの虚血性心疾患の死亡率が低い、その理由は不明である。そこで、蛋白質の転写発現を調節するマイクロRNA (miRNA)の違いを検討した。日本人とオーストリア人の血中のすべてのマイクロRNAレベルを調べたところ、372種類のmiRNAに差が認められ、これらのmiRNAは動脈硬化の進行に関連する動脈壁の複数の蛋白質の発現を調節していることが判明した。日本人で虚血性心疾患が少ない理由にmiRNAが関係している可能性を、本研究は世界で初めて示唆した。

研究成果の概要(英文)：The mortality from ischemic heart disease is much lower in Japan than in Western countries. In order to elucidate the reason for this difference, expression levels of microRNAs in the blood were totally analyzed and compared in Austrians and Japanese. The levels of 372 miRNAs showed significant difference between the countries, and the targeting molecules of these miRNAs were suggested to be collagen in vascular smooth muscle cells and IL-1, IL-6, IL-8, TNF, MMP-3 and MMP-9 in foam cells. There were 12 miRNAs that showed significant difference in their expression levels in the blood of Austrian and Japanese men and were reported to be associated with ischemic heart disease.

研究分野：衛生学

キーワード：マイクロRNA 虚血性心疾患 人種差 血管平滑筋細胞 血小板 赤血球

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国では欧米先進国に比べて喫煙率や高血圧有病率が高いにもかかわらず、これらがリスク要因となる虚血性心疾患による死亡率は著明に低い (文献 1)。この Japanese paradox と呼ばれる現象の原因は不明である。虚血性心疾患の最も重要なリスク要因は高 LDL コレステロール血症である。わが国では 1960 年代後半から脂肪摂取量が急速に上昇し、これに伴い血中コレステロール値も上昇した結果、日本人と欧米人との血清総コレステロール値には大きな差はなくなっている。また、虚血性心疾患の発症については、以前から家族歴がリスク要因の一つと見なされており、すなわち遺伝因子の関与が疑われている (文献 2)。しかし、わが国と欧米諸国との虚血性心疾患による死亡率の差を説明する遺伝子は未だ見つかっていない (文献 3)。

2. 研究の目的

近年、虚血性心疾患の基礎的病態となる動脈硬化や血管新生に関連するマイクロ RNA (miRNA) が同定されている。miRNA は細胞から分泌され血中にも安定して存在し、新たな疾患バイオマーカーとして注目されている。そこで、本研究では、機能性 RNA として最近注目されている miRNA に焦点を当て、日本人と白人の血中 miRNA レベルを網羅的に比較解析した。そして人種差を示した miRNA と虚血性心疾患との関連性を検討するとともに、miRNA による新たな血管機能の制御について探索した。

3. 研究の方法

1) 対象者

日本人とオーストリア人の健常男性を対象者とした。対象者の平均年齢(歳)は、日本人 48.7 ± 6.4、オーストリア人 49.9 ± 6.3 であった。全ての対象者は非喫煙者で、治療中の疾患はなく、定期的な薬物の服用歴もなかった。各対象者から早朝空腹時に採血し、血清を分離した。

2) miRNA に関する網羅的解析

各血清検体から RNA を抽出し、3D-Gene miRNA Oligo chip を用いて 2565 種類の miRNA を網羅的に解析した。各個人での miRNA レベルの分布パターンを分析し、両国間で発現レベルが異なる miRNA を決定した。そして、それらの血中レベルの相関を分析した。

3) 赤血球および血小板由来の miRNA に関する相関分析

日本人の血中のそれぞれの miRNA 発現レベルの関係について順位相関係数を用いて検討した。

4) 虚血性心疾患のリスク要因の評価

身長、体重、収縮期および拡張期血圧を測定した。血中の中性脂肪、LDL コレステロール、HDL コレステロール、血糖の濃度をそれぞれ酵素法によるキットを用いて測定した。

5) ヒト冠動脈平滑筋細胞における収縮蛋白の発現の検討

ヒト冠動脈平滑筋細胞を培養し、各蛋白の発現をウェスタンブロットにより評価した。

6) ヒト冠動脈平滑筋細胞内への miRNA の導入

miRNA の類似分子または阻害分子をエレクトロポレーション法により冠動脈平滑筋細胞内に導入した。

4. 研究成果

1) 日欧の対象者の背景

虚血性心疾患のリスク要因について、日欧両群間で比較した。年齢は両群間で差はなく、身長、体重、BMI はいずれも日本人に比べてオーストリア人で有意に高かった。収縮期血圧、拡張期血圧、脈圧には両群間で有意な差はなかった。空腹時血糖は日本人に比べてオーストリア人で有意に低かった。日本人に比べてオーストリア人では HDL コレステロールは有意に低く、LDL コレステロールは有意に高かった。中性脂肪値には両群間で有意な差を認めなかった。中性脂肪/HDL コレステロール比と CMI (cardiometabolic index) はいずれも動脈硬化のリスクを総合的に反映する指標であるが (文献 4,5)、これらの指数には日欧両群間で有意な差は認められなかった。

2) 日欧の対象者での血中 miRNA 発現レベルの相違 (文献 6)

2565 種類の miRNA の中で、直接の比較に十分な発現レベルを示した miRNA は 821 種類であった。そのうち、372 種類の miRNA に両国間で有意差を認め、さらに 12 種類については、これまでその血中レベルが虚血性心疾患と関連することが報告されていた。このうち、miR-106a-5p, 135a-3p, 150-3p, 16-5p, 17-5p, 191-5p, 320b, 451a, 486-5p, 663b, 92a-3p の各レベルは日本人に比べてオーストリア人で有意に高く、逆に miR-2861 のレベルはオーストリア人で有意に

低かった (図 1)。一方、血中レベルが虚血性心疾患と関連することが報告されている他の 9 種類の miRNA (miR-1254, 197-3p, 221-3p, 223-3p, 23a-3p, 26a-5p, 30d-5p, 3135b, 328-3p) の血中レベルについては、日本人とオーストリア人の間で有意な差は認められなかった。

3) 日欧間で有意差を認めた血中 miRNA レベルの相互の関連性 (文献 6)

日欧間で有意差を認めた miRNA の中で、miR-2861 を除く 11 種類の miRNA については、それぞれ有意な正相関を示した。特に、5 ペア (miR-106a-5p と miR-17-5p, miR-150-3p と miR-663b, miR-16-5p と miR-17-5p, miR-16-5p と miR-451a, miR-106a486-5p と miR-92a-3p) については、相関係数が 0.9 以上の強い相関を認めた。一方、オーストリア人では、miR-2861 は miR-106a-5p, 150-3p, 17-5p, 486-5p, 663b, 92a-3p と有意な正相関を認めたが、この関係は日本人では認められなかった。

| miRNA | 強度(log2 変換) | 倍率変化 (A/J) | q 値 | 既報での関連性 |
|---------|------------------------------------|------------|---------|---------|
| 106a-5p | A: 5.70 ± 0.92 J: 5.06 ± 0.64 | 1.55 | 0.014 | 負 |
| 135a-3p | A: 7.48 ± 0.87 J: 6.48 ± 0.54 | 1.99 | < 0.001 | 正 |
| 150-3p | A: 4.75 ± 0.39 J: 4.29 ± 0.25 | 1.65 | < 0.001 | 正 |
| 16-5p | A: 8.04 ± 1.16 J: 6.61 ± 0.69 | 2.69 | < 0.001 | 負 |
| 17-5p | A: 5.96 ± 0.90 J: 5.24 ± 0.60 | 1.63 | 0.005 | 正または負 |
| 191-5p | A: 5.11 ± 0.63 J: 4.28 ± 0.54 | 1.77 | < 0.001 | 正または負 |
| 2861 | A: 12.63 ± 0.48 J: 12.89 ± 2.72 | -1.21 | 0.002 | 正 |
| 320b | A: 5.32 ± 0.60 J: 4.96 ± 0.31 | 1.28 | 0.004 | 負 |
| 451a | A: 11.13 ± 1.25 J: 9.53 ± 0.80 | 3.03 | < 0.001 | 正 |
| 486-5p | A: 8.65 ± 1.05 J: 7.40 ± 0.55 | 2.38 | < 0.001 | 正 |
| 663b | A: 8.07 ± 0.41 J: 7.48 ± 0.30 | 1.50 | < 0.001 | 正 |
| 92a-3p | A: 8.00 ± 0.94 J: 7.01 ± 0.48 | 1.98 | < 0.001 | 正または負 |

4) 日欧間で有意差を認めた 12 種類の miRNA についての主成分分析 (文献 6)

miR-106a-5p, miR-16-5p, miR-17-5p, miR-191-5p, miR-451a, miR-92a-3p が第 1 主成分を構成し、これらの血中発現レベルの間には強い相関関係を認めた。第 2 主成分を構成する miRNA は miR-135a-3p, miR-150-3p, miR-320b, miR-663b であった。miR-2861 はオーストリア人のみを対象とした分析では第 2 主成分に含まれたが、日本人を対象とした分析では単独で第 3 主成分を構成した。

5) IPA によるパスウェイ解析 (文献 6)

上記 12 種類の miRNA を用いた解析では、虚血性心疾患の基礎病変である動脈硬化のパスウェイ上の分子で有意な関連を示すものは見当たらなかった。

図 1. 虚血性心疾患と関連する血中 miRNAs レベルのオーストリア人 (A) と日本人 (J) との比較

一方、両国間で有意差を示した 372 種類の miRNA を用いてパスウェイ解析を行ったところ、血管平滑筋細胞のコラーゲンおよび泡沫細胞のサイトカイン (IL-1, IL-6, IL-8, TNF) と MMP (3, 9) が miRNA の標的分子として有意な関連を示した (図 2)。

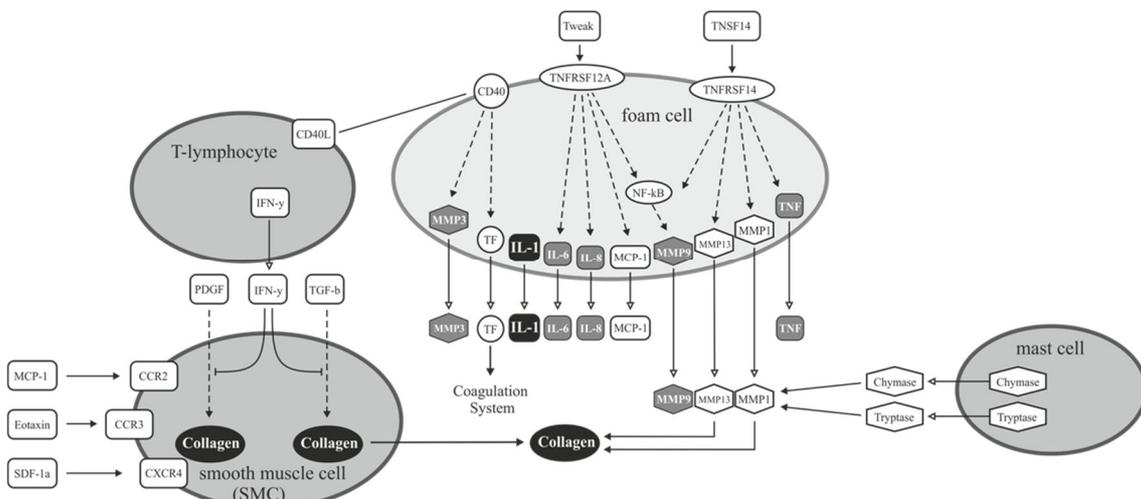


図 2. IPA によるパスウェイ解析. 動脈硬化のパスウェイ上の分子の中で、日欧間で有意差を示した 392 種類の miRNAs と関連する分子を白抜き文字で表示した。

6) 赤血球に高発現している 11 種類の miRNA レベルの相関分析 (文献 7)

赤血球に由来する 11 種類の miRNA の血中レベルの組合せによる全 55 ペアの中で、31 ペアに有意な相関を認め、主成分分析の結果、miR-16-5p、miR-451a、miR-486-5p、miR-92a-3p が第 1 主成分であることが判明した。このうち、特に miR-16-5p と miR-451a および miR-486-5p と miR-92a-3p の発現レベル間には非常に強い相関を認めた(それぞれのスピアマン順位相関係数: 0.920 と 0.863)。これらの結果から、虚血性心疾患など種々の疾患の血中バイオマーカーとして赤血球由来の miRNA を候補とする場合、赤血球の変化や異常の影響を十分に考慮すべきと考えられる。事実、上記の第一主成分である miR-16-5p、miR-451a、miR-486-5p、miR-92a-3p はいずれも日欧間で有意差を示した虚血性心疾患に関連する 12 種類の miRNA に含まれていた (図 1)。

7) 血小板に高発現している 11 種類の miRNA についての相関分析 (文献 8)

血小板の活性化は動脈硬化や血栓症の病態に深く関与する。血小板に由来することが知られている 11 種類の miRNA の中で、7 つの miRNA の血中レベルのペアで強い相関を認めた。さらに主成分分析を行った結果、let-7b-5p、miR-16-5p、miR-17-5p、miR-107、miR-126-3p、miR-191-5p が第 1 主成分であることが判明した。これらの miRNA の中で、miR-16-5p、miR-17-5p、miR-191-5p の血中レベルに日欧間で有意差を認めた。したがって、これら 3 種類の血小板由来 miRNA の血中レベルは虚血性心疾患の有用なバイオマーカーとなる可能性が示唆された。ただし、上記の通り miR-16-5p は赤血球にも由来する miRNA である。

8) 冠動脈平滑筋細胞の増殖能と miR-197 発現との関係

血管平滑筋細胞の収縮型から増殖型への形質転換は、動脈硬化の病態における重要なメカニズムである。miR-197 は動脈平滑筋細胞の形質転換の調節因子であることが報告されている(文献 9)。また、実際に血中 miR-197 レベルが高い人ほど将来の冠動脈疾患のリスクが高くなることが報告されている(文献 10)。培養ヒト冠動脈平滑筋細胞では miR-197-3p が発現していた。冠動脈平滑筋細胞内へ miR-197-3p の阻害分子を導入したが、細胞増殖能に影響はみられなかった。したがって、miR-197-3p は血管平滑筋細胞増殖の調節因子ではないことが示唆された。

9) 冠動脈平滑筋細胞の形質転換と miR-4800-3p 発現との関係

オーストリア人と日本人との血中 miRNA レベルの比較により、miR-4800-3p は日本人で約 3.7 倍の高発現を示した。また、バイオインフォマティクスにより miR-4800-3p は動脈硬化のイニシエーションに重要である細胞接着分子の配列と相同性があり、その発現を調節する可能性が考えられる。培養ヒト冠動脈平滑筋細胞では miR-4800-3p が発現していることを確認した。そして、miR-4800-3p の類似分子を細胞内に導入したが、カルボニン発現量を指標として評価した形質転換には影響がみられなかった。したがって、miR-4800-3p は冠動脈平滑筋細胞の形質転換調節因子ではないことが示唆された。

<引用文献>

1. Sekikawa A, Ueshima H, Zaky WR, et al. Much lower prevalence of coronary calcium detected by electron-beam computed tomography among men aged 40-49 in Japan than in the US, despite a less favorable profile of major risk factors. *Int J Epidemiol.* 2005; 34:173-179.
2. Myers RH, Kiely DK, Cupples LA, Kannel WB. Parental history is an independent risk factor for coronary artery disease: the Framingham Study. *Am Heart J.* 1990; 120: 963-969.
3. Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2007; 357: 443-453.
4. Wakabayashi I, Marumo M, Kubota Y, Higashiyama A, Miyamoto Y, Okamura T. Cardiometabolic index as a useful discriminator for the risk of increased arterial stiffness. *Clin Chim Acta.* 2018; 486:42-43.
5. Wakabayashi I, Daimon T. Comparison of discrimination for cardio-metabolic risk by different cut-off values of the ratio of triglycerides to HDL cholesterol. *Lipids Health Dis.* 2019; 18: 156.
6. Wakabayashi I, Eguchi R, Sotoda Y, von Lewinski D, Sourij H, Daimon T, Groschner K, Rainer PP. Blood levels of microRNAs associated with ischemic heart disease differ between Austrians and Japanese: a pilot study. *Sci Rep.* 2020; 10(1): 13628.
7. Wakabayashi I, Sotoda Y, Eguchi R. Relationships among erythrocyte-derived microRNAs in serum of healthy donors. *Clin Chim Acta.* 2020; 507:7-10.
8. Wakabayashi I, Sotoda Y, Eguchi R. Contribution of platelet-derived microRNAs to serum microRNAs in healthy men. *Platelets.* 2021 (in press).
9. Musri MM, Coll-Bonfill N, Maron BA, et al. MicroRNA dysregulation in pulmonary arteries from chronic obstructive pulmonary disease. Relationships with vascular remodeling. *J Respir Cell Mol Biol.* 2018; 59: 490-499.
10. Schulte C, Molz S, Appelbaum S, et al. miRNA-197 and miRNA-223 predict cardiovascular death in a cohort of patients with symptomatic coronary artery disease. *PLoS One.* 2015; 10(12): e0145930.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Wakabayashi I, Marumo M, Kubota Y, Higashiyama A, Miyamoto Y, Okamura T. | 4. 巻 486 |
| 2. 論文標題 Cardiometabolic index as a useful discriminator for the risk of increased arterial stiffness | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Clinica Chimica Acta | 6. 最初と最後の頁 42-43 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cca.2018.07.017 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Wakabayashi I, Daimon T. | 4. 巻 18 |
| 2. 論文標題 Comparison of discrimination for cardio-metabolic risk by different cut-off values of the ratio of triglycerides to HDL cholesterol | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Lipids in Health and Disease | 6. 最初と最後の頁 156 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12944-019-1098-0 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Wakabayashi I, Eguchi R, Sotoda Y, von Lewinski D, Sourij H, Daimon T, Groschner K, Rainer PP | 4. 巻 10(1) |
| 2. 論文標題 Blood levels of microRNAs associated with ischemic heart disease differ between Austrians and Japanese: a pilot study | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 13628 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-69332-0 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Wakabayashi I, Sotoda Y, Eguchi R | 4. 巻 507 |
| 2. 論文標題 Relationships among erythrocyte-derived microRNAs in serum of healthy donors | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Clinica Chimica Acta | 6. 最初と最後の頁 7-10 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cca.2020.03.034 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------|
| 1. 著者名 Wakabayashi I, Sotoda Y, Eguchi R | 4. 巻 印刷中 |
| 2. 論文標題 Contribution of platelet-derived microRNAs to serum microRNAs in healthy men | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Platelets | 6. 最初と最後の頁 印刷中 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09537104.2020.1810223 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 江口 良二 (Eguchi Ryoji) (00461088) | 兵庫医科大学・医学部・助教 (34519) | |
| 研究分担者 | 大門 貴志 (Daimon Takashi) (40372156) | 兵庫医科大学・医学部・教授 (34519) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 | | |
|---------|----------|--|--|
| オーストリア | グラーツ医科大学 | | |