

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K09563

研究課題名(和文)慢性腎臓病の石灰化冠動脈病変を標的とした新規microRNAsの探索

研究課題名(英文) Exploring microRNA targeting calcified coronary artery lesions in chronic kidney disease

研究代表者

赤尾 浩慶 (AKAO, Hironobu)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50398997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病(CKD)において心血管疾患は死亡原因の第1位である。CKD患者の50～60%は冠動脈病変を来し、高度の石灰化を高率に伴うことなどによって治療困難な場面が多い。本研究は、CKD患者の予後を規定する冠動脈硬化症に対する新たな治療戦略策定を目指し、動脈石灰化の発生と進展の機序解明を目的とする。具体的には、冠動脈rotablator治療後に冠循環から体循環に流出する動脈硬化血管壁由来分子を含む血液検体を用い、in vivoのアテローム性動脈硬化に関わるエクソソーム内microRNAを次世代シーケンサーを用いたRNA-seq法で同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の特色は動脈壁を切削前後に経時的に採取した血液検体サンプルを用いることである。動脈硬化巣における分子機構については、剖検例ならびに実験系における病理学的解析のみであり、臨床例を用いた解析は見当たらない。Rotablator施行後に、血管壁に存在する分子が体循環に流出し変動している事や、血液中の経時的なエクソソームmiRNAの挙動に着目して、証明した報告は国内外において前例がなく、血管壁内の動脈硬化巣にかかわるmiRNAを生体内で評価する革新的な研究である。さらに、進行した動脈硬化巣に存在するmiRNAの状態をヒト生体を対象に臨床的に評価することで治療法開発への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：Cardiovascular disease is the leading cause of death in chronic kidney disease (CKD) patients, and 50-60% of those suffer from coronary artery lesion, which is often difficult to treat because of its association with severe calcification. The purpose of this study is to elucidate the mechanisms underlying the development of arterial calcification with the aim of formulating new treatment strategies, which determine the prognosis of CKD patients. Specifically, we used blood samples containing molecules derived from atherosclerotic vessel walls that flow out to the body circulation after coronary artery rotablator therapy. This approach could identify microRNAs in exosomes involved in atherosclerosis in vivo by RNA-seq using a next-generation sequencer.

研究分野：循環器内科学

キーワード：石灰化冠動脈病変 慢性腎臓病 microRNA エクソソーム 次世代シーケンサ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

冠動脈硬化症は CKD 患者の死因の上位を占める。ステントの登場により冠動脈カテーテル治療 (percutaneous coronary intervention: PCI) は飛躍的に向上したが、CKD 患者では、(1)高度な石灰化などの進行病変が多い(2)びまん性病変が多い(3)血管解離などの合併症が多い(4)再狭窄率が高いなど未解決の問題が多く、アテローム性動脈硬化の成因解明や有効な予防法・治療法の開発は重要な社会課題である。

また、CKD 患者の血管石灰化は血液中のカルシウム、リンの過飽和に伴う石灰沈着が血管壁に析出することが主な原因と考えられていたが、最近では骨芽細胞の分化マーカーである osteopontin (OPN)、alkaline phosphatase (ALP)、core binding factor alpha-1 (cbfa-1)など骨形成に関わるタンパク質の発現が血管石灰化部分に確認され、なおかつ実際に石灰化能を有することも確認されている (Abedin M, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1161-70. Johnson RC, et al. *Circ Res* 2006;99:1044-59.)。このような血管壁の石灰化が fetuin-A、matrix Glaprotein (MGP)、osteoprotegerin (OPG)、bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) など様々な因子の調節を受けている報告もある。

Rotablator 治療は石灰化を含む進行した冠動脈硬化症に対する debulking device であり、動脈壁の成分を赤血球サイズ以下に粉碎して削り取る。よって本治療により血管壁構成成分が冠循環に流出し、体循環に一定時間停滞するとの仮説が成り立つ。申請者は、90 症例において治療前後で OPN と血管炎症マーカーであるペントラキシン 3 (PTX3) の血中レベルが特異的かつ有意に ($P < 0.0001$) 上昇し、それぞれの上昇幅は強い正相関を認めることを明らかにしてきた (平成 26 年欧州心臓病学会発表)。他の石灰化関連分子である OPG は治療前後での変化を認めない事より (平成 28 年日本循環器学会学術集会発表)、血管壁に存在する分子が体循環に流出するこの仮説の妥当性を強く支持している。一方において OPN は microRNA181a との相関が報告され、新しい分子マーカーとして注目されている (Remus EW et al. *Atherosclerosis* 2013)。

2. 研究の目的

MicroRNA (miRNA) は約 18 ~ 24 塩基の低分子ノンコーディング RNA で、細胞から分泌されるエクソソームに内包され、細胞間で伝達されて増殖や分化、細胞死など様々な細胞内プロセスを制御し、病態や疾患形成に関与することが明らかとなりつつある。本研究では、CKD 患者の石灰化冠動脈に対し Rotablator 治療によって体循環に流出する血管壁由来分子を含む血液検体を用いアテローム性動脈硬化に関わる miRNA をマイクロアレイ法で同定し、その miRNA の治療前後の動態ならびにその機能を解明することを目指したものである。特に冠動脈壁の切削により血管壁内に移行する miRNA や切削による体内の二次的な応答 miRNA も検討の対象とすることを旨とした。

3. 研究の方法

(1) Rotablator 治療前後の末梢血検体採取

CKD 患者の進行した冠動脈硬化症に対する治療として rotablator 治療を行った症例を対象とし、rotablator 施行前、施行直後、3 時間後、24 時間後に経静脈的に EDTA 採血を行い以下の検討を行った。

(2) miRNA の測定

血清からのエクソソーム由来 miRNA の抽出には、常法では超遠心法による精製が行われてきたが、作業効率が悪いいため、Fujifilm Wako pure chemical 社の MagCapture Isolation キットを用いて精製を行った。得られたエクソソーム分画からの miRNA 抽出には、Wako 社のマイクロ RNA エキストラクター SP キットを利用した。精製されたエクソソームの確認は、常法に従い透過型および走査型電子顕微鏡によって行った。動脈硬化、石灰化、CKD、OPN との関係が強い miRNA をサーモ社 Quant Studio 12K Flex リアルタイム PCR システムを利用し、TaqMan microRNA assays (Applied Biosystems)にて測定し、その経時的変化を解析した。

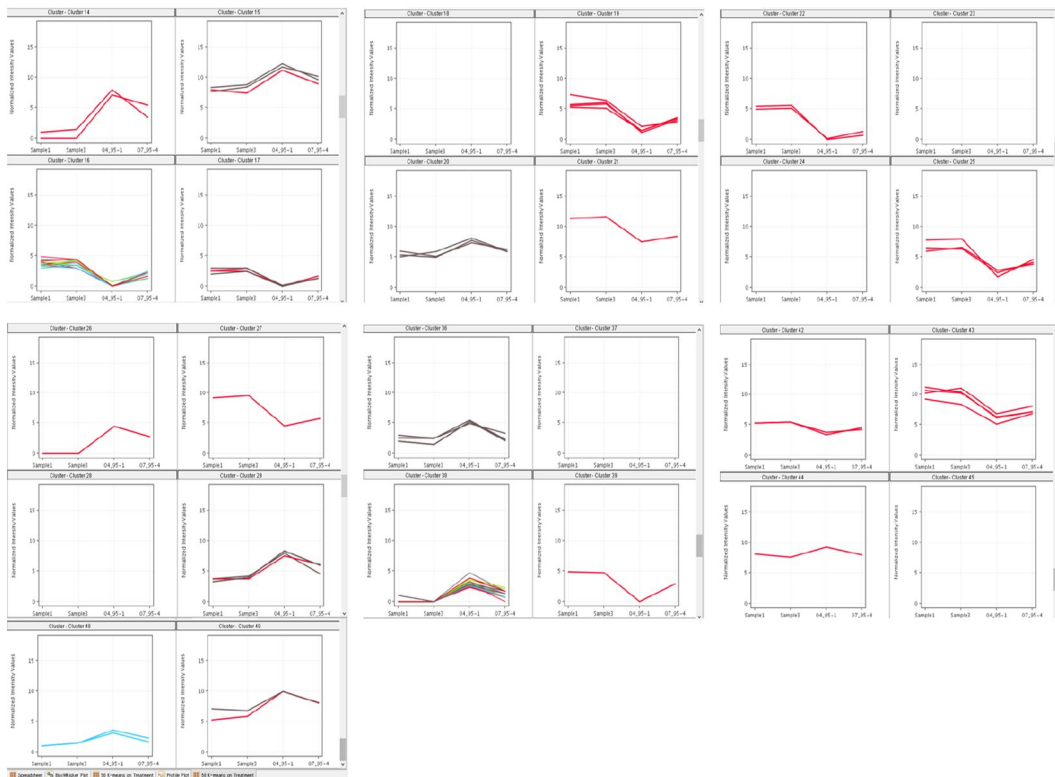
(3) 網羅的 miRNAs の測定

さらに典型的な症例を選別し、経時的採血検体を用いて miRNAs 発現について次世代型シーケンサー Illumina 社 MiSeq にて網羅的プロファイリングを行った。得られたデータの解析はアジレント社の GeneSpring14.5 およびパスウェイデータベースの Ingenuity Pathway Analysis を活用するとともに、miRBase、microRNA.org などの既存の miRNA データベースを併用して参照した。

4 . 研究成果

(1)発現変動 miRNA の同定に成功した。

下記の図に解析結果の一例を示した。4 つの検体を解析した。左から順に健常人(1)、別の健常人(2)、治療前(3)、治療後(4)での次世代シーケンサー解析を実施して RNA-seq を実施して、各 miRNA の発現量をシーケンスデータから定量化した。さらに変動遺伝子を抽出するためにクラスタリングを行い、(1)から(4)で変動のある発現パターンを抽出した。この結果から、14 番のクラスターのように治療前に健常人と異なる発現量を持ち、治療後に健常人のレベルに戻るような発現パターンなどが抽出された。このような解析から 76 個の miRNA を抽出することができた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hironobu Akao, Yasuhiko Saeki, Jun Sawaguchi, Minako Oda, Takaaki Takamura, Makoto Watanabe, Ryuhei Saito, Minoru Wakasa, Mizuho Iwadare, Ryouko Ishida, Nakaba Fujioka, Taketsugu Tsuchiya, Yasuyuki Kawai, Michihiko Kitayama, Kouji Kajinami
2. 発表標題 Local Interaction among Osteocalcin (OCN), Osteopontin (OPN) and Pentraxin 3 (PTX3) in Advanced Coronary Atherosclerosis: Coronary Rotational Atherectomy Study
3. 学会等名 第49回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

〔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
連携研究者	石垣 靖人 (ISHIGAKI Yasuhiro) (20232275)	金沢医科大学・総合医学研究所・教授 (33303)	
連携研究者	中村 有香 (NAKAMURA Yuka) (00565632)	金沢医科大学・総合医学研究所・助手 (33303)	

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
---------	---------