

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：13201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23940

研究課題名(和文) microRNAに着目した川崎病冠動脈瘤における血管微小粒子の役割解明と新薬開発

研究課題名(英文) MicroRNA-145-5p and microRNA-320a encapsulated in endothelial microparticles contribute to the progression of vasculitis in acute Kawasaki Disease

研究代表者

仲岡 英幸 (Nakaoka, Hideyuki)

富山大学・附属病院・診療助手

研究者番号：30725784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病の病態が全身の血管炎であることから、血管内皮細胞傷害で遊離される血管微小粒子(Endothelial microparticles (EMPs))に着目し、EMPsが川崎病罹患後に冠動脈が拡張する患者を予測する鋭敏なバイオマーカーとなり、川崎病罹患後の冠動脈病変を有する患者において急上昇するEMPsに内在する2種類の特異的なmicroRNA(microRNA-145-5p, microRNA-320a)を同定した。さらに、in silico解析および単球/マクロファージの細胞実験において、この2種類のmicroRNAが川崎病急性期の冠動脈病変の形成に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国内外での研究動向は、川崎病急性期に血小板由来のMPsが上昇することを明らかにした論文も散見されるが、川崎病の病態となる全身性の中小動脈血管炎との関連は示されておらず、未だにCAL形成の病因/病態を明らかにするまでには至っていない。そこで我々は、川崎病急性期における血管内皮細胞傷害という側面から、我々が同定したCAL症例のEMPsに内在する特異的な2種類のmicroRNAを用い、この特異的な2種類のmicroRNAの局在と機能を解明し、CAL形成に関わるカスケードの解明およびCAL症例の早期診断かつ新たな治療法を開発することは極めて有意義であり、臨床応用に大いに期待できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Endothelial microparticles (EMPs) modulate vasculitis during the acute phase of Kawasaki Disease (KD). KD is an acute inflammatory disease that takes the form of systemic vasculitis. EMPs are vesicles formed by cell membranes after endothelial activation. My research was to elucidate whether EMPs are involved in vasculitis in acute KD. In the KD patients with coronary artery lesions (CAL), EMPs rapidly increased after the initial treatment and was significantly higher compared with the Non-CAL ( $P<0.001$ ). In the CAL, we identified 2 specific miRNAs, which were encapsulated in EMPs; hsa-miR-145-5p and hsa-miR-320a. In silico analysis revealed that they may regulate gene expression of inflammatory cytokines in monocytes and macrophages. EMPs are sensitive markers for the severity of endothelial dysfunction and vasculitis in the acute phase of KD. Hsa-miR-145-5p and hsa-miR-320a, encapsulated in EMPs, contribute to the progression of vascular inflammation in KD.

研究分野：小児循環器

キーワード：川崎病冠動脈瘤 血管微小粒子(EMP) microRNA

## 1. 研究開始当初の背景

川崎病は小児期における中小動脈を中心とする全身性血管炎症候群であり、特に冠動脈の血管内皮障害をきたし、冠動脈病変(Coronary artery lesion : CAL)を形成する症例が存在する。近年、血管内皮細胞傷害により血管内皮細胞表面から遊離される血管微小粒子(Endothelial microparticles : EMPs)が、心血管合併症を有する患者において増加することが報告され、EMPsは細胞間でのコミュニケーションツールとして、microRNAなどの核酸物質を運搬する重要な役割があることが見直されている。これまで我々の研究室では、難治性川崎病患者において血管新生因子(Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF)が血清/血漿中に有意に上昇し、血管内皮細胞への免疫染色法で強発現することを報告してきた。さらに川崎病急性期において単核球内のmicroRNA-93がこのVEGF遺伝子発現を抑制することを発見した。また、電子顕微鏡でマウスの血管炎モデルにおいてEMPsが血管内皮細胞から多量に遊離/放出されることを確認している。そこで川崎病の病態が全身の血管炎であることから血管内皮細胞傷害時に遊離されるEMPsとの関連性に着目し、EMPs内に内在する遺伝子発現を調整するmicroRNAが他の細胞間での情報伝達を担い、川崎病急性期における血管炎に重要な役割を果たしているのではないかとこの着想に至った。川崎病の病態が全身の血管炎であることからEMPとの関連性が示唆され、EMPsが細胞間での情報伝達を担い、血管炎に重要な役割を果たしているのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、CAL症例から抽出した特異的なmicroRNAの機能と局在について解明し、CAL症例の早期診断かつ新たな治療法の確立を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1)ヒト単球/マクロファージ細胞を用い、CAL症例に特異的なmicroRNAがターゲットする遺伝子群の発現実験を行い、CAL形成に関わる機序を明らかにし、(2)この特異的なmicroRNAの川崎病急性期における冠動脈病変内での局在を同定し、川崎病急性期におけるCAL形成の病因を解明した。

## 4. 研究成果

我々は川崎病急性期の血管微小粒子(Endothelial microparticles : EMPs)が有熱性疾患と比較して有意に上昇し( $p < 0.0001$ ) (図1)、CAL形成患者(CAL群)のEMPsが治療後も上昇し続けること( $p < 0.001$ ) (図2)を見出した。

図1. 川崎病とコントロール群でのEMPsの比較

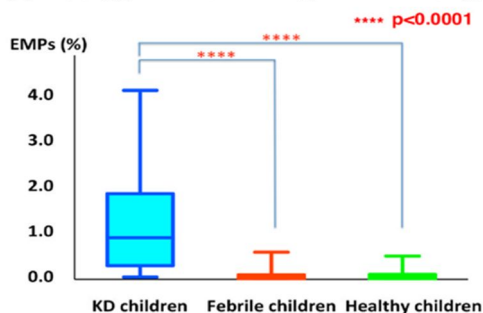
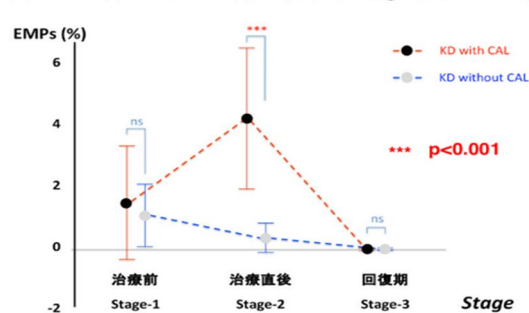


図2. CAL群とNon-CAL群におけるStage毎のEMPsの変化



さらに CAL 群と Non-CAL 群の 2 群において治療前/後/回復期の EMPs から RNA を抽出し、Affymetrix® GeneChip® miRNA 4.0 による microarray を施行し、*in silico* 解析を加え TNF と IL-6 に関する CAL 群に特異的な 2 種類の microRNA (microRNA-145-5p, microRNA-320a) を同定し (図 3)、実際に THP-1 細胞を用い microRNA のトランスフェクション実験にて最終的に microRNA-320a が TNF- $\alpha$  を microRNA-145-5p が IL-6 を有意に上昇させること ( $p < 0.05$ ) を証明した (図 4)。

図3. *in silico* 解析

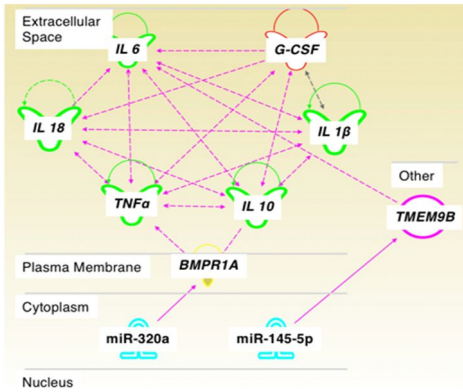
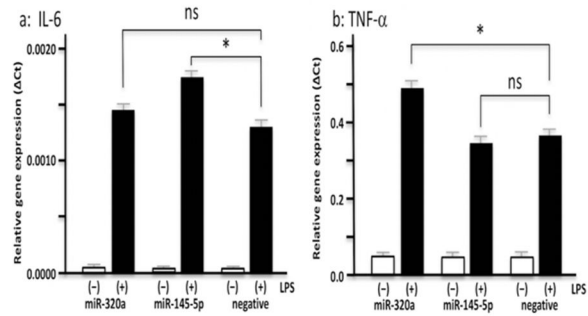


図4. THP-1細胞へのトランスフェクション実験



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 1件）

1. 発表者名 仲岡英幸
2. 発表標題 MicroRNA-145-5p and microRNA-320a encapsulated in endothelial microparticles contribute to the progression of vasculitis in acute Kawasaki Disease.
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Session 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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