

平成22年3月31日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790531
 研究課題名（和文） 動脈硬化症におけるマイクロRNAおよび遺伝子ネットワークの解明
 研究課題名（英文） Role of microRNA in the development of atherosclerosis
 研究代表者
 三好 亨（MIYOSHI TORU）
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：70444651

研究成果の概要（和文）：動脈硬化の進展に関わる分子メカニズムは未だ不明な点が多い。動脈硬化に重要なLDLコレステロールの中でも、特に促進的に働くと考えられている酸化LDLでマクロファージを刺激し、マイクロRNAという遺伝子発現の制御に重要な特殊な小さいサイズのRNAの発現パターンを調べ、刺激の有無で8種類のマイクロRNAに変化があることを発見した。これらの制御が、動脈硬化病変の進展抑制につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The precise mechanisms of atherosclerosis remain unknown. We investigate the role of microRNAs, which is new regulator of the gene expression, in the macrophage. We found that the treatment of oxidized LDL resulted in the change in expression of eight microRNAs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：循環器内科
 科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学
 キーワード：マイクロRNA、動脈硬化

1. 研究開始当初の背景
 近年、急速な高齢化と食生活の欧米化に伴い、
 動脈硬化関連疾患（心筋梗塞、脳梗塞など）

が急増している。動脈硬化症は高脂血症・高血
 圧症・糖尿病などの危険因子をもとにして、長

期間かけて形成される多因子疾患であるが、既知の危険因子をコントロールしても、発症に個人差があることは周知の事実である。これはひとえに遺伝的（体質）差に依存している。これまでの研究では、疾患発症に関与するゲノム要因として、遺伝子の翻訳領域、調節領域、スプライス部位などにおけるゲノム多型性などが疾患発症の要因として注目されていた。さらに近年、マイクロRNAに代表されるように、機能性分子の存在がゲノム全域に存在することが示されてきており、遺伝子領域だけでなく、このようなマイクロRNAなど遺伝子領域外に存在する機能エレメントについても疾患発症要因が注目されている。

2. 研究の目的

動脈硬化症におけるmicroRNAの発現制御機構や発現異常、マイクロRNAの標的遺伝子を解明すること。さらに、messenger RNAの発現と合わせ、遺伝子ネットワークを解析することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 動脈硬化感受性 (C57/BL6) のapoE欠損マウス (C57/BL6. apoE^{-/-}) と抵抗性 (C3H/HeJ) のapoE欠損マウス (C3H/HeJ. apoE^{-/-}) を用い、高脂肪食負荷数週間後の大動脈におけるマイクロRNAおよびメッセンジャーRNAの発現プロファイルを比較検討。(図3)

(2) マイクロRNAアレイの結果をもとに、クラスター解析を行いマイクロRNAにより制御される遺伝子ネットワークを解明する。

(3) 発現量の変化が大きいマイクロRNAを過剰発現または、阻害 (RNA干渉法) し、動脈硬化進展に対する影響をin vitro、in vivo 両方にて検討する。また、ターゲットとなる遺伝子についても同様な検討を行う。

4. 研究成果

1) 酸化LDLによるマクロファージの刺激

酸化LDLによる刺激を行い、baseline、6時間、12時間、24時間の時点でRNAを抽出し、マクロファージの泡沫化に関する分子のメッセンジャーRNAの発現を検討した。30種類以上についてプライマーを設定し、その発現を定性的に評価した。数種類のものについて、有意な変化を認めたため、それとマイクロRNAの関係を検討することにした。

2) 酸化LDL刺激によるマイクロRNA変化

酸化LDLでマクロファージを刺激し、24時間後に全RNAを抽出し、マイクロRNAアレイを行った。刺激の有無で比較すると、8種類のマイクロRNAが刺激後に統計学的に有意に低下していた。それら8種類のマイクロRNAについて、それぞれ、データベースから、ターゲットのなるメッセンジャーRNAを推測した。予測には、MICROOSM、TARGETSCANを用い、両方に重なるものを候補メッセンジャーRNAとした。

3) マイクロRNAのマクロファージでの働き

マイクロRNAの低下が認められた8種類について、それぞれを合成し、細胞への過剰導入後の影響を検討した。ラミンのSiRNAをコントロールとして、まず、8種類全部を強制導入して、1) で検討した分子のメッセンジャーRNAの発現変化を調べた。現時点でマイクロRNAと候補のメッセンジャーRNAとの関係について有意なものは見つかっておらず、検討を続けている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計6件)

すべて査読あり。

- 1) Impact of olmesartan on progression of coronary atherosclerosis a serial volumetric intravascular ultrasound analysis from the OLIVUS (impact of Olmesarten on progression of coronary atherosclerosis: evaluation by intravascular ultrasound) trial. Hirohata A, Yamamoto K, Miyoshi T, Hatanaka K, Hirohata S, Yamawaki H, Komatsubara I, Murakami M, Hirose E, Sato S, Ohkawa K, Ishizawa M, Yamaji H, Kawamura H, Kusachi S, Murakami T, Hina K, Ohe T. J Am Coll Cardiol. 2010, 55(10):976-82.
 - 2) Serum adipocyte fatty acid-binding protein is independently associated with coronary atherosclerotic burden measured by intravascular ultrasound. Miyoshi T, Onoue G, Hirohata A, Hirohata S, Usui S, Hina K, Kawamura H, Doi M, Kusano KF, Kusachi S, Ninomiya Y. Atherosclerosis. 2010, in press
 - 3) Cardio-ankle vascular index is independently associated with the severity of coronary atherosclerosis and left ventricular function in patients with ischemic heart disease. Miyoshi T, Doi M, Hirohata S, Sakane K, Kamikawa S, Kitawaki T, Kaji Y, Kusano KF, Ninomiya Y, Kusachi S. J Atheroscler Thromb. 2010, 17(3):249-58.
 - 4) Augmentation index is associated with B-type natriuretic peptide in patients with paroxysmal atrial fibrillation. Kaji Y, Miyoshi T, Doi M, Hirohata S, Kamikawa S, Sakane K, Kitawaki T, Kusachi S, Kusano KF, Ito H. Hypertens Res. 2009, 32(7):611-6.
 - 5) ADAMTS1 is a unique hypoxic early response gene expressed by endothelial cells. Hatipoglu OF, Hirohata S, Cilek MZ, Ogawa H, Miyoshi T, Obika M, Demircan K, Shinohata R, Kusachi S, Ninomiya Y. J Biol Chem. 2009, 284(24):16325-33.
 - 6) Increased augmentation index of the radial pressure waveform in patients with paroxysmal atrial fibrillation. Doi M, Miyoshi T, Hirohata S, Iwabu A, Tominaga Y, Kaji Y, Kamikawa S, Sakane K, Kitawaki T, Kusano KF, Kusachi S. Cardiology. 2009;113(2):138-45.
- [学会発表] (計 7 件)
- 1) 三好 亨他, ADAMTS-1 is an endothelial cell-specific hypoxia-inducible gene, 第 82 回米国心臓協会学術集会、2009、11 月、米国、オランダ
 - 2) 三好 亨他, A novel cationic protein reduced infarcted size and protected myocytes from oxidative stress through modification of Akt signaling, 第 82 回米国心臓協会学術集会 2009、11 月、米国、オランダ
 - 3) 三好 亨他, Combination therapy of angiotensin II receptor blockers plus a calcium channel blocker, but not a diuretic, improve late systolic pressure augmentation in elderly patients with essential hypertension, 欧州心臓学会議 2009、9 月 スペイン、バルセロナ
 - 4) 三好 亨他, The association of serum adipocyte fatty acid binding protein with coronary atherosclerotic burden measured by intravascular ultrasound, 欧州心臓学会議 2009、9 月 スペイン、バルセロナ

- 5) 三好 亨 他、Arterial stiffness is an independent determinant of B-type natriuretic peptide in patients with paroxysmal atrial fibrillation、欧州心臓学会議 2009、9月 スペイン、バルセロナ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 亨 (MIYOSHI TORU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70444651