

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790156

研究課題名（和文） 動脈硬化発症の初期病変を効率的に評価可能なバイオマーカーの探索

研究課題名（英文） Exploration of novel biomarker for diagnosis of early stage of arteriosclerosis

研究代表者

岩城 壮一郎（IWAKI SOICHIRO）

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：60399962

研究成果の概要（和文）：我々は、動脈硬化症モデルマウスの組織由来 RNA を用いて miRNA アレイを行い、動脈硬化症モデルマウスにおいて特異的に発現が変動する miRNA 群を得た。また我々は、名古屋市立大学病院循環器内科を受診した冠動脈疾患を有する患者を対象として血漿中 miRNA の発現を検討し、特定の miRNA の発現が有為に変動することを見いだした。これらの結果から、miRNA が動脈硬化症の状態を反映したバイオマーカーとして利用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： We performed a comprehensive analysis of miRNA expression in the aorta of wild-type and ApoE^{-/-} mice using miRNA expression microarrays, total of 12 miRNAs were identified to be differentially expressed. We also demonstrated here that miR-126 levels in plasma are altered in the coronary artery disease patients. These results suggest that miRNAs are available as a novel biomarker to assess the early stage of arteriosclerosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：動脈硬化症、バイオマーカー、miRNA、PAI-1、スフィンゴシン 1-リン酸

1. 研究開始当初の背景

肥満や高血圧、糖尿病、脂質異常症などの疾患が重複して発症したメタボリックシンドロームは、動脈硬化発症の重要な危険因子である。動脈硬化が進行すると血管が閉塞し、全世界の死因において大きな割合を占める脳梗塞や心筋梗塞等の心血管イベントの発症につながる。動脈硬化の発症・進展の予防

法はまだ明らかではなく、またその病変は進展すると退縮し難いため、発症の早期発見が重要である。しかしながら、動脈硬化は遺伝的素因に対して種々の環境因子が複雑に関与するため、それぞれの危険因子の寄与度や治療に対する応答は患者により異なる。そのため、個々の患者の症状を正確に評価することが必要とされている。

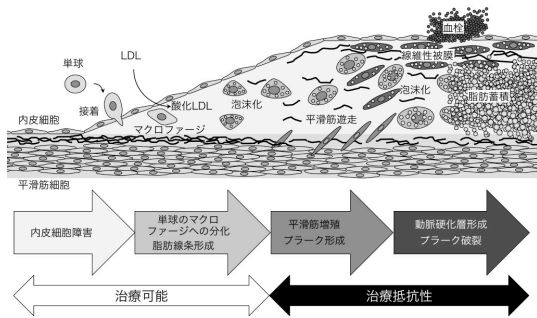


図 1. 動脈硬化は早期発見・早期治療が重要である

バイオマーカーは生理的状态や病態の変動、治療への応答等と関連した血液や尿、組織等の生体試料から得られる客観的な指標である。近年、病態の診断や予防、治療への反応性や効果などを予測することを目的としたバイオマーカーの開発が注目されており、疾病の予防やオーダーメイド医療への応用が期待されている。

近年、タンパク質をコードしない noncoding RNA の役割が注目を集めている。なかでも、進化的に保存された 18~25 塩基からなる microRNA (miRNA) の機能解析が進んでおり、複数のタンパク質と複合体を形成した miRNA が標的となる mRNA に結合し、その翻訳を制御することが明らかとなってきた。最近、ある種の miRNA は血液細胞の分化、インスリン分泌、脂肪細胞の分化等を制御することでメタボリックシンドロームの発症過程において重要であることが示されている。しかしながら、動脈硬化の発症に関与する miRNA の存在はまだ明らかではなく、miRNA が動脈硬化発症における新規のバイオマーカーとなり得る可能性がある。

2. 研究の目的

本申請課題では、動脈硬化発症の早期に特異的に発現変動する miRNA に焦点を当てて解析を行うことにより、動脈硬化発症の早期診断が可能な新規バイオマーカーを同定することを目的とした。具体的な項目は以下の通りである。

- (1) 動脈硬化症発症初期に発現が変動する miRNA の単離およびクローニング
- (2) miRNA アレイを用いた動脈硬化症発症に伴い特異的に発現が変動する miRNA の探索
- (3) 冠動脈疾患の既往歴を有する患者を対象とした血漿中 miRNA 発現の解析

3. 研究の方法

(1) 動脈硬化症発症初期に発現が変動する miRNA の単離およびクローニング

4、8、12 週齢の野生型マウス (C57BL/6.NCr Slc、以下 WT と略す) (n=5、雄性) および ApoE 欠損による自然発症の脂質異常症によりアテローム性動脈硬化を発症する病態モデルマウス (C57BL/6.KOR/Stm Slc-ApoE^{shl}、以下 ApoE^{-/-} と略す) (n=5、雄性) を用いた。エーテル麻酔後、腹腔および胸部を開いて大動脈を摘出し、周囲の脂肪を取り除き、生理食塩水で洗浄した。テフロンホモジナイザーを用いて組織を破碎し、細胞溶解液を得た。さらに、抗 Ago2 抗体を用いた免疫沈降法により miRNA 画分を濃縮後、変性アクリルアミドゲル電気泳動法で精製した。得られた miRNA にアダプターをライゲーション後、逆転写反応を行い cDNA に変換した。これを T-ベクターに組み込み、大腸菌に形質転換して挿入 DNA を有するクローンを得た。さらに、プラスミドを抽出後、塩基配列の確認を行った。

(2) miRNA アレイを用いた動脈硬化症発症に伴い特異的に発現が変動する miRNA の探索

各 12 週齢の野生型マウス、および既に大動脈弓組織に軽度の脂肪沈着が認められる ApoE^{-/-}マウスから摘出した大動脈各 5 匹分を RNA 抽出用サンプルとした。TRIzol LS Reagent およびポッター型ホモジナイザーを用いてホモジナイズし、プロトコールに従い total RNA を抽出した。Agilent 2100 Bioanalyzer を用いた RNA の品質検査後、Agilent miRNA マイクロアレイを用いた miRNA 発現解析を行った。

(3) 冠動脈疾患の既往歴を有する患者を対象とした血漿中 miRNA 発現の解析

名古屋市立大学病院循環器内科を受診した、冠動脈疾患 (coronary artery disease; CAD) の疑いが有り冠動脈造影上 CAD を有する患者 36 名および CAD を有さない患者 31 名を対象としてインフォームドコンセントを得た後、名古屋市立大学医学研究科倫理審査委員会の承認のもと EDTA 法で採血を行った。遠心分離により血漿を得た後、total RNA を抽出した。定量 PCR は TaqMan

MicroRNA Assays および TaqMan Fast Advanced Master Mix を用いて行った。反応終了後、増幅曲線を確認し、 $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて相対定量を行った。

4. 研究成果

(1) 動脈硬化症発症初期に発現が変動する miRNA の単離およびクローニング

挿入 DNA を有するクローンからプラスミドを抽出後、塩基配列の確認を行った。解析結果を Sanger データベースと照合したところ、miRNA を含んだクローンが得られていた。しかしながら、得られた miRNA クローンの種類が少なく、発現量の多い miRNA に偏ってクローニングされている可能性が考えられた。そこで次に、より網羅的な発現の解析を目指し、miRNA アレイを用いた解析を行うことにした。

(2) miRNA アレイを用いた動脈硬化症発症に伴い特異的に発現が変動する miRNA の探索

野生型マウスおよび動脈硬化症モデルマウス間の動脈硬化好発部位（大動脈弓）における miRNA の発現を miRNA アレイにより比較した。発現解析の結果、両群間において2倍以上発現が変動した12種の miRNA を動脈硬化症発症に関わる miRNA の候補とした。現在我々は、得られた miRNA 候補のスクリーニングを進めている。

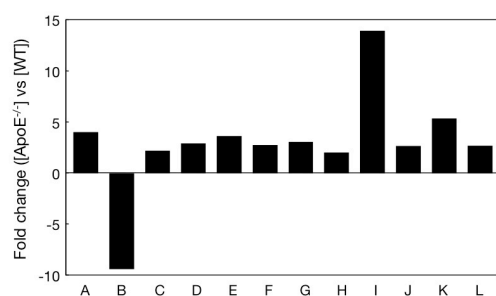


図 2. 動脈硬化モデルマウスで2倍以上発現変動したmiRNA

(3) 冠動脈疾患の既往歴を有する患者を対象とした血漿中 miRNA 発現の解析

名古屋市立大学病院循環器内科を受診した心血管疾患の既往歴を有する患者を対象として血漿中 miRNA の発現を検討し、特定の miRNA の発現が有為に変動することを見いだした。なかでも、miR-126 は血管内皮細胞に多く発現し、血中を循環することが知ら

れている。冠動脈疾患を持たない患者では LDL コレステロール (LDL-C) 値と血漿中 miR-126 発現量が正の相関を示すのに対し、冠動脈疾患を有する患者では LDL-C 値と血漿中 miR-126 発現量は負の相関を示した。このことから、血管内皮機能障害の程度や血中 LDL-C 量に応じた血中への miR-126 放出制御機構が存在する可能性が示唆された。即ち、血中 miR-126 量の測定は血管内皮細胞の状態を反映したバイオマーカーとして利用できる可能性がある。

今後は、本研究によって得られた miRNA 候補の標的遺伝子の同定や培養細胞への導入を行うこと等により、miRNA による動脈硬化症の進行への影響を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Kouji Tanaka, Keiko Tamiya-Koizumi, Kazumi Hagiwara, Hiromi Ito, Akira Takagi, Tetsuhito Kojima, Motoshi Suzuki, Soichiro Iwaki, Satoshi Fujii, Mitsuhiro Nakamura, Yoshiko Banno, Reiji Kannagi, Tatsuya Tsurumi, Mamoru Kyogashima, Takashi Murate., Role of down-regulated neutral ceramidase during all-trans retinoic acid induced neuronal differentiation in SH-SY5Y neuroblastoma cells., *J. Biochem.*, 2012, in press. (査読有)
2. Tomonori Sugiura, Yasuaki Dohi, Sumiyo Yamashita, Nobuyuki Ohte, Shiori Ito, Soichiro Iwaki, Yuji Hirowatari, Ryunosuke Ohkawa, Yuko Mishima, Yutaka Yatomi, Genjiro Kimura, Satoshi Fujii., Analytical evaluation of plasma serotonin and sphingosine 1-phosphate and their clinical assessment in early atherosclerosis., *Coron. Artery Dis.*, 2012, **23**: 234-238. (査読有)
3. Naomi Nakayama, Tomomi Nakamura, Hiromi Okada, Soichiro Iwaki, Burton E. Sobel, Satoshi Fujii. Modulators of induction of plasminogen activator

- inhibitor type-1 in HepG2 cells by transforming growth factor- β . *Coron. Artery Dis.* 2011, **22**: 468-78. (査読有)
4. Takefumi Asakura*, Soichiro Iwaki*, Hiromi Okada, Burton E. Sobel, Satoshi Fujii (*equally contributed). Posttranscriptional regulation of expression of plasminogen activator inhibitor type-1 by cAMP in HepG2 liver cells. *J. Biochem.*, 2011, **150**: 687-694. (査読有)
 5. 宮川隆, 朝倉健文, 中村友美, 佐藤由樹, 岡田浩美, 岩城壮一郎, 藤井聡. HepG2 細胞におけるインスリンと酸化ストレスの PAI-1 産生に対する影響の解析:メタボリックシンドロームの易血栓性の病態解明を指向して. *心臓*, 2010 年 9 月号 (丸善), **42**: 1153-1158. (査読有)
 6. Ryu Miyagawa, Takefumi Asakura, Tomomi Nakamura, Hiromi Okada, Soichiro Iwaki, Burton E. Sobel, Satoshi Fujii. Increased expression of plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) in HepG2 cells induced by insulin mediated by the 3'-untranslated region of the PAI-1 gene and its pharmacologic implications. *Coron. Artery Dis.*, 2010, **21**: 144-150. (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

1. 山村 周平, 岩城 壮一郎, 真川 明将, 朝倉 健文, 藤井 聡. HepG2 細胞における S1P による PAI-1 転写後調節機構の解析. 日本薬学会第 132 回年会, 北海道大学, 2012 年 3 月 29 日.
2. 山村 周平, 真川 明将, 朝倉 健文, 岩城 壮一郎, 藤井 聡. S1P による PAI-1 発現調節機構に関する 3'-UTR 機能の解析. 第 84 回日本生化学会大会, 国立京都国際会館, 2011 年 9 月 23 日.
3. 朝倉 健文, 山村 周平, 乗本 裕明, 岡田 浩美, 岩城 壮一郎, 藤井 聡. HepG2 細胞における cAMP による PAI-1 転写後調節機構の解明. 日本薬学会第 131 回年会, ツインメッセ静岡, 2011 年 3 月 30 日.
4. 小池 慶子, 大垣 恵理華, 岩城 壮一郎, 大川 龍之介, 矢富 裕, 藤井 聡. 低酸素とスフィンゴ脂質は脂肪細胞 PAI-1 発現上昇を通じて肥満者の線溶不全に関与する. 第 8 回血液・血栓オルビス, 東京ドームホテル, 2010 年 8 月 21 日.
5. Soichiro Iwaki, Moyoko Asai, Daisuke Sakakibara, Satoshi Fujii. Sphingosine-1-phosphate increases hypoxia-induced up-regulation of plasminogen activator inhibitor-1. 第 27 回内藤コンファレンス 生体膜ダイナミクスと脂質生物学 [I], シャトレーゼガトーキングダムサッポロ, 2010 年 6 月 29 日-7 月 2 日.
6. 朝倉 健文, 岡田 浩美, 岩城 壮一郎, 藤井 聡. HepG2 細胞における PAI-1 発現機構の解析:インスリン、cAMP、シロスタゾールの影響. 第 19 回日本病院薬剤師会東海ブロック学術大会・平成 21 年度日本薬学会東海支部例会, 四日市市文化会館, 2009 年 11 月 23 日.
7. 浅井 萌子, 榊原 大輔, 岩城 壮一郎, 藤井 聡. スフィンゴシン 1-リン酸は低酸素下における HIF-1 α を介した PAI-1 発現を増加させる. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸国際会議場, 2009 年 10 月 23 日.

[その他]

ホームページ等

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/szg/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩城 壮一郎 (IWAKI SOICHIRO)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号: 60399962

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし