

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08033

研究課題名(和文) 肺動脈性肺高血圧における長鎖ノンコーディングRNAの意義の解明

研究課題名(英文) Role of long noncoding RNA in the pulmonary artery hypertension

研究代表者

前村 浩二 (MAEMURA, Koji)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：90282649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肺動脈性肺高血圧症(PAH)の患者の肺動脈と左心室から採血を行い、得られた血漿からRNAを抽出し長鎖ノンコーディング(lnc)RNAの発現量について網羅的に解析した。その結果、肺循環で濃度が上昇しPAHとの関連が示唆されるlncRNA XとYを同定した。lncRNA Xは対照患者とPAHいずれの肺循環でも上昇するが、PAHの血液中では高値であった。lncRNA Yは対照患者の血漿中ではほとんど検出できないが、PAHの血液中では検出でき、かつPAHの肺循環で上昇した。現在これら2つのlncRNAについて、さらに多くのPAH患者において病態のバイオマーカーとしての妥当性の検証を行なっている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PAHは、その発症機序は未だ十分に解明されておらず、未治療のPAHの予後は極めて不良である。2000年頃より新たな治療薬が開発され、予後は改善してきているが、その効果は不十分であり、早期診断のためのバイオマーカーや新しい機序の治療薬の開発が喫緊の課題である。今回の研究によりPAHの病態と関連するlncRNA XとYを同定した。今後PAHの発症機序の解明、早期診断のためのバイオマーカー、新しい治療標的となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Blood samples were collected from the pulmonary artery and left ventricle of patients with pulmonary arterial hypertension (PAH), and RNA was extracted from the obtained plasma and comprehensively analyzed for the expression levels of long non-coding (lnc) RNAs. We identified lncRNAs X and Y, whose levels were elevated in pulmonary circulation, suggesting an association with PAH. lncRNA X tended to be elevated in the pulmonary circulation of both control patients and PAH, but was higher in the blood of PAH. lncRNA Y was barely detectable in the plasma of control patients, but was detectable in the blood of PAH, and was elevated in the PAH pulmonary circulation. These two lncRNAs are currently being validated as disease biomarkers in patients with PAH.

研究分野：循環器内科学

キーワード：肺高血圧症 長鎖ノンコーディングRNA バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は、その発症機序は未だ十分に解明されておらず、未治療の PAH の予後は極めて不良である。2000 年頃より新たな治療薬 (エボプロステノールやエンドセリン受容体拮抗薬、phosphodiesterase type 5 阻害薬) が開発され、予後は改善してきているが、その効果は不十分であり、早期診断のためのバイオマーカや新しい機序の治療薬の開発が喫緊の課題である。

ヒトゲノムのうち、わずか 2% しかタンパク質をコードしていないことが明らかとなり、タンパク質をコードしない RNA であるノンコーディング RNA (ncRNA) の役割が注目されている。ncRNA の中で、長鎖 ncRNA (lncRNA) はそのエピジェネティックな効果により、様々な病態に関与していることが明らかになって来ている。PAH の成因の 1 つとしてエピジェネティックな変化が関与している。また lncRNA は血中にも放出されており、さまざまな疾患の病態を反映することが知られている。そこで、PAH の発症機序の解明、早期診断のためのバイオマーカ、新しい治療標的として lncRNA が key になると期待される。

2. 研究の目的

本研究では患者の血液を用いて lncRNA の発現を網羅的に解析し、PAH 患者の血中で上昇し、さらに肺循環で増加する lncRNA を見だし、PAH のバイオマーカとしての有用性を検証する。次に PAH 動物モデルを用いて、該当の lncRNA の発現動態を解析し、PAH の発症や悪化のメカニズムとの関連性を解明する。そして lncRNA をターゲットとした新しい治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) PAH 患者血液からの網羅的 lncRNA スクリーニング

長崎大学病院循環器内科では PAH が疑われ、右心カテーテル検査が行われた症例の血液サンプルを患者の同意の下、肺動脈と左心室から採取し保存している。この肺動脈と左心室から得られた血漿から miRNeasy Serum/Plasma kit を用い、RNA を抽出し、Qiagen RT2 lncRNA PCR Array Human lncFinder plate を用い、lncRNA の網羅的な発現の定量を行った。しかし、血液中の lncRNA の発現量は微量で、Qiagen RT2 lncRNA PCR Array Human lncFinder plate で確認できるほどの lncRNA の発現は認めなかった。そこで、RT2 lncRNA PreAMP Primer Mix for Human lncFinder で増幅を行ってから RT2 lncRNA PCR Array plate を用い lncRNA の定量を行った。

さらに当該 lncRNA の左心室 (LV) /肺動脈 (PA) 比をとって肺循環での変化率を計測し、右心カテーテル検査で得られた平均肺動脈圧や肺血管抵抗との相関性を検討し、バイオマーカとしての有用性を検討した。

(2) PAH 動物モデルでの lncRNA の動態の解析

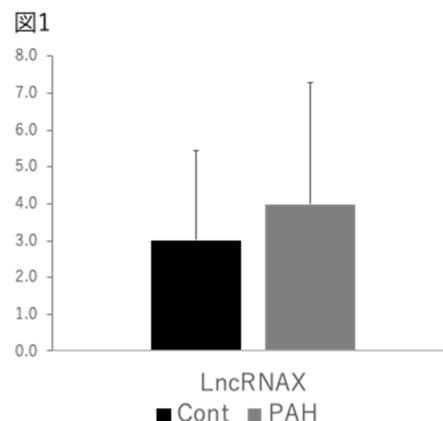
VEGF 受容体拮抗薬 (SUGEN5416) を腹腔内に投与後、3 週間、低酸素に暴露し PAH を誘導しモデル (低酸素-PAH モデル) を作成した。このモデルを用い、それぞれ肺組織やその他の臓器で (1) で同定した lncRNA の発現が変化するか確認した。

4. 研究成果

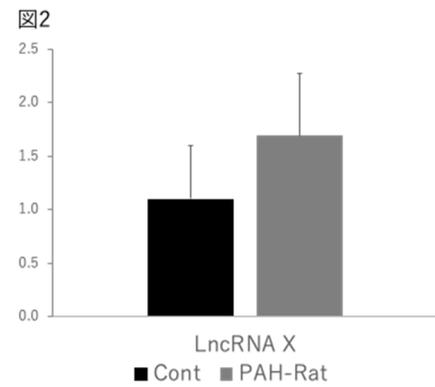
対照 (Cont) 患者と PAH 患者の肺動脈、左心室の血漿から lncRNA を抽出し、Qiagen RT2 lncRNA PCR Array Human lncFinder plate を用いて網羅的に lncRNA の発現量の測定を行った。しかし、血液中の lncRNA の発現量は微量で、Qiagen RT2 lncRNA PCR Array Human lncFinder plate で確認できるほどの lncRNA の発現は認めなかった。そこで、RT2 lncRNA PreAMP Primer Mix for Human lncFinder で増幅を行ってから RT2 lncRNA PCR Array plate を用い lncRNA の定量を行った。当初、RT2 lncRNA PreAMP Primer Mix for Human lncFinder (LBH-001Z、003Z、004Z) の 3 種類で増幅を行ってから、3 種類の RT2 lncRNA PCR Array plate (#330721-LAHS-001Z、003Z、004Z) を用い 252 種類の lncRNA を網羅的に解析する予定であった。しかしそれぞれの Plate 用に検体を PreAMP で増幅する必要性があり、検体量が不足したため、最終的に Cont 2 症例、PAH 4 症例の PA と LV の血漿を用いて RT2 lncRNA PCR Array plate (#330721-LAHS-001Z) の 98 種類の lncRNA を解析する plate でのみ結果が得られた。その中で、PAH 患者では肺循環で上昇する (肺動脈より左心室で高値) Cont 患者では肺循環で変化しない、Cont 患者に比較して PAH 患者で高値、の 3 つ条件を満たす lncRNA を探索した。

その結果、上記の条件を満たす lncRNA X と lncRNA Y (現時点では lncRNA 名を公表できないため X と Y とする) を同定した。lncRNA X は対照患者と PAH いずれの肺循環でも上昇傾向がある lncRNA (LV/PA: Cont vs PAH 2.95 vs. 1.85) で PAH の血液中で高値 (PAH/Cont 133.19) であるもの。lncRNA Y は Cont の血漿中ではほとんど検出ができず。PAH の血液中で検出でき、かつ PAH の肺循環で上昇 (LV/PA 1.5) した。lncRNA X はがん抑制作用が認められることが知られており、また、血管平滑筋細胞の分化を制御するなど、血管の増殖分化にも関与する lncRNA として報告されているが、PAH との関連について報告はない。一方、lncRNA Y はがんの増殖に関与し、様々ながんのバイオマーカーとして報告があり、動脈硬化症例では血中濃度の低下が報告されている。

次に、lncRNA X の Primer を作成し、ヒトの血液に含まれる lncRNA X を PCR を用いて評価を行った。その結果 PAH で高い傾向にはあったが、ばらつきが大きく有意差を認めるまでには至らなかった (Cont vs. PAH 3.001 ± 2.457 vs. 3.993 ± 3.289 , $P > 0.05$ Cont N=5 PAH N=10) (図 1)。



さらに lncRNA X の発現について、低酸素 PAH モデル rat の肺を用いて検証した。PAH-Rat 群では、Control 群 (Cont 群) と比較して、右室圧の上昇、右心室肥大が認められ、PAH になっていることが確認できた (右室圧 (mmHg) Cont vs. PAH-Rat 28.4 ± 4.0 vs. 79.8 ± 17.6 , $P < 0.01$)。lncRNA X の発現については PAH-Rat で上昇傾向はあったが、有意差までは認めなかった (Cont vs. PAH-Rat 1.10 ± 0.49 vs. 1.69 ± 0.57 $P > 0.05$ $N=6$) (図 2)



lncRNA Y については ヒトの Primer を作成したが、血漿中では lncRNA Y の発現は確認ができず、解析が難しかった。また、lncRNA Y は Rat での発現は確認できておらず、ラットの組織を用いた解析はできなかった。

今後 lncRNA X について PA に比べて LV で上昇しているか、また PAH 患者の PA 圧や肺血管抵抗との関連を症例数を増やして検証を行いたいと考える。また今回は結果が出なかった lncRNA PreAMP Primer Mix for Human lncFinder (LBH-003Z、004Z) のプレートを用いて検証を行いたいと考える。

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 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ueno Yuki, Ikeda Satoshi, Motokawa Tetsufumi, Honda Tomohiro, Kurobe Masaya, Akashi Ryohei, Yonekura Tsuyoshi, Yoshimuta Tsuyoshi, Eguchi Masamichi, Kawano Hiroaki, Maemura Koji	4. 巻 -
2. 論文標題 The Authors' Reply to "Efficacy and feasibility of edoxaban therapy without prior parenteral anticoagulants in patients with venous thromboembolism"	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.3509-24	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 Ueno Yuki, Ikeda Satoshi, Motokawa Tetsufumi, Honda Tomohiro, Kurobe Masaya, Akashi Ryohei, Yonekura Tsuyoshi, Yoshimuta Tsuyoshi, Eguchi Masamichi, Kawano Hiroaki, Maemura Koji	4. 巻 -
2. 論文標題 Real-world Safety and Effectiveness of Edoxaban in Patients with Venous Thromboembolism with or without Preceding Parenteral Anticoagulants: A Single-center Retrospective Study	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.2524-23	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 Yamagata Yuki, Ikeda Satoshi, Kojima Sanae, Ueno Yuki, Nakata Tomoo, Koga Seiji, Ohno Chikara, Yonekura Tsuyoshi, Yoshimuta Tsuyoshi, Minami Takako, Kawano Hiroaki, Maemura Koji	4. 巻 86
2. 論文標題 Right Ventricular Dyssynchrony in Patients With Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension and Pulmonary Arterial Hypertension	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 936 ~ 944
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circj.CJ-21-0849	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 Morimoto Yosuke, Ikeda Satoshi, Yamagata Yuki, Kozu Ryo, Kawano Hiroaki, Maemura Koji	4. 巻 3
2. 論文標題 Effect of Living Environment Factors on Quality of Life in Patients With Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension After Completion of Balloon Pulmonary Angioplasty A Cross-Sectional Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circulation Reports	6. 最初と最後の頁 279 ~ 285
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circrep.CR-20-0128	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 Koga Seiji, Ikeda Satoshi, Akashi Ryohei, Yonekura Tsuyoshi, Kawano Hiroaki, Maemura Koji	4. 巻 77
2. 論文標題 Serum soluble Klotho is inversely related to coronary artery calcification assessed by intravascular ultrasound in patients with stable coronary artery disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 583 ~ 589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jjcc.2020.11.014	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Masamichi Eguchi, Satoshi Ikeda, Tomohiro Honda, Yuki Ueno, Hiroki Kawano, Koji Maemura
2. 発表標題 The effectiveness of Esaxerenone on pulmonary arterial hypertension via impairing the ROS generation
3. 学会等名 第7回日本循環器学会基礎研究フォーラム (BCVR)
4. 発表年 2023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
研究分担者	池田 聡司 (Ikeda Satoshi) (10336159)	長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・講師 (17301)	
研究分担者	江口 正倫 (Eguchi Masamichi) (70585405)	長崎大学・病院 (医学系)・助教 (17301)	

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