

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25年 3月 31日現在

機関番号：14401

研究種目：基礎研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590827

研究課題名（和文）

動脈硬化関連因子 LTA に関連してマクロファージ 泡沫化に関わるマイクロ RNA の同定

研究課題名（英文）

Identification of MicroRNAs involved in formation of foam cells that are associated with atherosclerosis-related gene lymphotoxin-alpha

研究代表者 坂田 泰彦（SAKATA YASUHIKO）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90379206

研究成果の概要（和文）：

今回、これまでの我々の知見を発展させ、動脈硬化関連因子 LTA に関連してマクロファージ 泡沫化に関わるマイクロ RNA の同定を試みたが、LTA はマクロファージ 泡沫化しないことが明らかとなった。そのため途中より研究計画を変更し、動脈硬化の最終段階として生じる心筋梗塞後の心臓死亡に関連するマイクロ RNA を同定した。

研究成果の概要（英文）：

We tried to identify microRNAs involved in formation of foam cells that are associated with atherosclerosis-related gene lymphotoxin-alpha (LTA). However, we found that LTA was unlikely involved in foam cell formation. Thus, we changed our plan and identified microRNAs that are associated with cardiac death in patients who survived acute myocardial infarction, a major cause of death as a result of atherosclerotic diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2011年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2012年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：分子血管病態学

1. 研究開始当初の背景

急性心筋梗塞は動脈硬化性疾患の代表であり、悪性新生物と並び本邦における最も主

要な死因の一つである。心筋梗塞は糖尿病・高血圧・高脂血症・喫煙などの古典的危険因子に加えて遺伝背景も含めた多数の因子が絡み合って発症に関与するとされる

が、申請者らは心筋梗塞の観察研究を行う大阪急性冠症候群研究会（OACIS: Osaka Acute Coronary Insufficiency Study）の遺伝子バンクを用いて検討を行い、リンホトキシン α （LTA）およびその結合蛋白Galectin-2の遺伝子多型が心筋梗塞発症（文献1, 2）、および生存退院後の予後（文献3）を予測することを報告し、その後LTAの動脈硬化関連因子として刺激伝達経路に関する研究を行ってきた。

まず申請者らは平成19-20年度科学研究費補助金基盤（C）の助成を受けてLTAの動脈硬化における役割を検討した結果、LTA刺激によりヒト血管内皮細胞においてE-セレクトイン、VCAM、ICAMなどの細胞接着因子の発現が強く誘導されること（文献4）、THP1単球細胞の血管内皮細胞への接着が増強すること、またその細胞接着増強には、TNF I型受容体（TNFR I）/PI3K-Akt経路を介した古典的Nuclear Factor κ B（NF κ B）経路の活性化が関与することを明らかにした（文献5）。すなわちLTAは動脈硬化の初期段階においてはTNFR Iを介したNF κ Bの活性化を通じて血管内皮における接着因子の発現と単球との接着作用を増強させると考えられた。さてLTAのファミリーメンバーであるTNF α も同様の機序で細胞接着を誘導することが知られており、これまでTNF α も動脈硬化に関与すると古くから考えられてきた。しかしながら動脈硬化モデルマウスにおいてはTNF α を欠損させても動脈硬化形成に影響は認めないが、LTA遺伝子をノックアウトすると動脈硬化進展が著明に抑制されることが報告されており、TNF α に比べてLTAは生体の動脈硬化に強く関与することが示唆されていた（文献6）。LTAは元来、単球、リンパ球系の分化・発生に関わるサイトカインであり、既知のとおり動脈硬化の進展

に關与するマクロファージは単球が分化した細胞であることから、LTAが単球系細胞を介して動脈硬化に関わることは想像に硬くない。また、TNF α とは異なりLTAはその結合蛋白であるGalectin-2とともにヒトの動脈硬化層において強く発現しているが、その局在は動脈硬化性粥内のマクロファージを中心に認められた（文献2）。そこで研究開始当初、我々はヒトにおける動脈硬化の進展、心筋梗塞発症に対するLTAの寄与を検証するに当たり、その研究対象を単球系細胞であるマクロファージの分化、特にその後期段階である泡沫細胞化に絞り、かつ近年注目されているMicroRNAの挙動と絡めて検討を行うこととした。

なお本研究で解析対象としたMicroRNAは、19~25塩基対からなる内因性のRNAとされ、遺伝子からタンパクへの転写・翻訳を抑制することにより、生体内で重要な役割を果たすことが当時明らかとなりつつあり、注目を集めていた。当時もMicroRNAと循環器疾患、特に動脈硬化性疾患との関連は明らかではないが、研究開始当初も現在も炎症におけるMicroRNAの関与が続けて報告されており、血管・血球系細胞の炎症に深く関わる動脈硬化にも深く関与していると考えられている（いた）。

引用文献

1. Ozaki K et al., Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet.* 2002;32(4):650-4.
2. Ozaki K et al., Functional variation in LGALS2 confers risk of myocardial infarction and regulates lymphotoxin-alpha secretion in vitro. *Nature.* 2004;429:72-5.
3. Mizuno H et al., Impact of atherosclerosis-related gene polymorphisms on mortality and recurrent events after myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 2006; 185:400-5.
4. Suna S et al., Up-regulation of cell adhesion molecule genes in human endothelial cells stimulated by lymphotoxin

- alpha: DNA microarray analysis. *J Atheroscler Thromb.* 2008 Jun;15(3):160-5
5. Suna S, et al, Lymphotoxin-alpha 3 mediates monocyte-endothelial interaction by TNFR I/NF-kB signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379; 374-378, 2009.
 6. Schreyer SA et al., Loss of lymphotoxin-alpha but not tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in mice. *J Biol Chem.* 2002;277(14):12364-8

2. 研究の目的

マクロファージの泡沫化は動脈硬化性プラークの形成においてきわめて重要な役割を果たす。研究開始当初はこのマクロファージの泡沫化にLTAおよびMicroRNAが重要な役割を果たすと考えており、マクロファージ泡沫化に重要な役割を果たすMicroRNAを以下のように明らかにすることを目的とした。

- 1) マクロファージへ分化させた単球細胞においてLTA刺激下に発現が調節されるMicroRNA群を明らかにし、その中で実際にLTA刺激下にマクロファージ泡沫化に関与するMicroRNA群を明らかにする。
- 2) 上記1) で絞り込まれた各MicroRNAの発現調節を行い、LTA非刺激下においてもマクロファージ泡沫化を調節しうる、マクロファージ泡沫化のマスタースイッチとして働くMicroRNAの存在を明らかにする。
- 3) 最終的には我々が以前、心血管事故発症リスクに関与することを明らかにしたLTA遺伝子多型の有無により、今回同定したMicroRNAの発現に差異が生じるか否かを検証し、各MicroRNAの臨床的意義を明らかにする。

2. 研究の方法

- 1) 平成22年度(当初予定)

平成22年度はまず当初の予定通り LTA により実際に誘導される MicroRNA の存在をマイクロアレイを用いて検証を試みた。培養系では THP1 単球細胞を phorbol 12-myristate 13 acetate (PMA) にて刺激すると培養皿に付着してマクロファージへの分化が誘導されるが、ここに酸化 LDL (oxLDL) を加えると、マクロファージへと分化した THP1 細胞は oxLDL を取り込んで泡沫化する。このマクロファージの泡沫化は動脈硬化性プラークの形成においてきわめて重要な役割を果たすが、我々はこのマクロファージの泡沫化に MicroRNA が重要な役割を果たすと考えた。そこで PMA によりマクロファージに分化した THP1 細胞に LTA を投与して MicroRNA の発現の変化を網羅的に解析した。具体的には PMA 刺激によりマクロファージ化した THP1 細胞に LTA (10ng/ml) 存在下に 37°C で 2 時間培養を行った LTA 投与 THP1 細胞と、対照 (LTA 非投与) THP1 細胞において mirVana™ microRNA 抽出キット、Megaplex™ RT Reactions キット (共に Applied Biosystems 社) を用いて MicroRNA の抽出と逆転写を行い、これまでに報告された約 700 種類の MicroRNA をほぼすべてカバーする TaqMan® MicroRNA Array (Applied Biosystems 社) を用いて MicroRNA のプロファイリングを行い比較検討を行った。当初の予定ではこのようにマイクロアレイを用いた網羅的な MiRNA プロファイリングにより、マクロファージへ分化した THP1 細胞において LTA により発現の影響を受ける MicroRNA 群を特定し、その中からマクロファージ泡沫化への関与が強く示唆される MicroRNA を 10 程度抽出する

予定であり、引き続きこれら候補 MicroRNA に対して種々の検証を行う予定であった。

2) 平成23年度以降(予定変更後：平成23年度研究開始時に報告済み)

平成 22 年度においては、当初の予定通りマクロファージへ分化した THP 1 細胞において LTA により発現の影響を受ける MicroRNA 群を複数検出したものの、繰り返し検討を行ってもこれらは必ずしも形態学的表現型に関連しないことが明らかとなり、予定を変更した(平成 23 年度研究開始度当初に報告済み)。

すなわち平成 2 3 年度以降は我々の仮説を証明する MiRNA 候補の絞り込みを最優先事項とし、臨床例のサンプルを用いて検討を行った。具体的には急性心筋梗塞症例の血清には MiRNA が漏れ出ていることが明らかになっているが、もしマクロファージにおいて LTA により発現の影響を受ける MicroRNA が心筋梗塞後も発現していれば、心筋梗塞の再発につながり、心臓死亡のハイリスクとなると考えられることから、大阪急性冠症候群研究会の血清バンクを用いて、心筋梗塞退院後早期に心臓死亡した症例と、生存退院後 3 年間一度も心血管事故を発生せず、良好に経過した症例間で差を認める MiRNA が存在するか否かを検証した。

3. 研究成果

平成 22 年度はまずはじめに LTA により実際に誘導される MicroRNA の存在をマイクロアレイを用いて検証を行った。前述の通り、PMA によりマクロファージに分化した THP1 細胞に LTA を投与して RNA

を抽出し、TaqMan® MicroRNA Array を用いて MicroRNA のプロファイリングを行い比較検討を行った。その結果、このマイクロアレイを用いた網羅的な MiRNA プロファイリングにより、マクロファージへ分化した THP 1 細胞において LTA により発現の影響を受ける MicroRNA 群を複数検出したが、繰り返し検討を行ってもこれらは必ずしも形態学的表現型に関連しなかった。

そこで平成 2 3 年度以降は当初の研究計画を修正し、臨床例のサンプルを用いて検討を行うこととした。

近年、冠動脈インターベンションの普及に伴い、急性心筋梗塞の急性期予後は改善したものの生存退院後のリスクはむしろ上昇しており、生存退院後の心血管イベントの管理がますます重要となっている。そこでまず我々は大阪急性冠症候群研究会のデータベースを用いて検証を行ったところ、我々は心筋梗塞生存退院後 1 年が最も心筋梗塞再発の高リスクであることを疫学的に発見した(主な発表論文 1)。そこで MiRNA マイクロアレイを用いてこれら心筋梗塞再発群の生存退院時血清に於いて特異的に上昇する MiRNA を探索したが、そうした MiRNA は確認できなかった。その理由として大阪急性冠症候群研究会の症例の生存退院例において記録されている心筋梗塞は非致命的なものであり、致命的であった重症心筋梗塞は心臓死亡としてイベント登録されているからであると考えられた。そこで次に対象の症例を心筋梗塞再発例から、心臓死亡例に変更して研究を継続した。

すなわち急性心筋梗塞症例の血清に

はMiRNAが漏れ出ていることが明らかになっているが、もしマクロファージにおいてLTAにより発現の影響を受けるMicroRNAが心筋梗塞後も発現していれば、心筋梗塞の再発につながり、心臓死亡のハイリスクとなると考えられることから、大阪急性冠症候群研究会の血清バンクを用いて、心筋梗塞退院後1年以内に心臓死亡した7症例と、それら7例と症例背景をマッチさせた生存退院後3年間一度も心血管事故を発症しなかった7例において677のMiRNAを搭載するMiRNAマイクロアレイを用いて生存退院時の血清中に含まれるMiRNAを網羅的に探索したところ、両症例群の間で11のMiRNAに発現レベルに差を認めた(図1)。

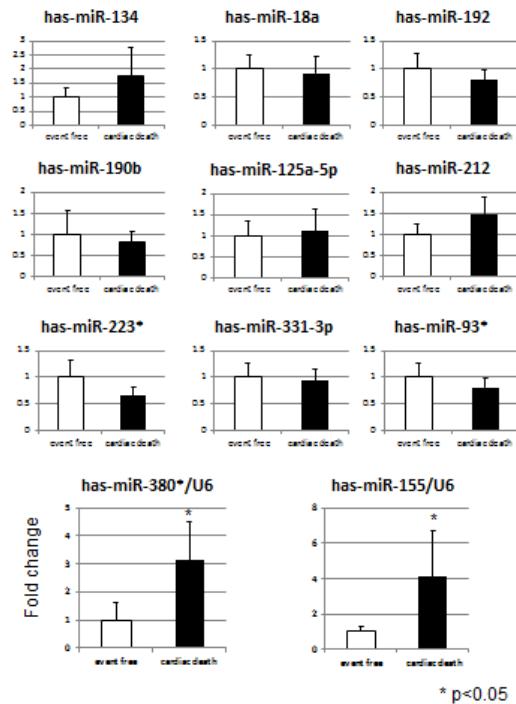
図1: 突然死群と対照群の血清レベルに差を認めたマイクロRNA

| | |
|---------------------------|--|
| Upregulated miRs | hsa-miR-134, hsa-miR-155, hsa-miR-18a, hsa-miR-192, hsa-miR-380* |
| Downregulated miRs | hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-212, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-223*, hsa-miR-190b, hsa-miR-93* |

そこで次に症例数を心臓死亡群19例、対照群21例に増やして2時検証を行ったところ、MiR155 および MiR380*の2つの血清MiRNA値が心臓死亡群で有意に高いことを見出した(図2)(主な発表

論文2)。症例背景は、早期心臓死群と対照群のそれと差を認めないことからこれら2つのMiRNAが生存退院時に上昇していた急性心筋梗塞症例では、既に生存退院時から1年以内の心臓死亡に関連する何かのシグナルが働いていたと想像される。

図2: 2次スクリーニングの結果、MiRNA-155と380*に突然死群での血清レベル上昇を認めた。



現在これらのMiRNAがどのように心血管事故発症に関与しているのか引き続き詳細な検討を予定している。

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2件)

- 1) Nakatani D, Sakata Y, Suna S, Usami M, Matsumoto S, Shimizu M, Sumitsuji S, Kawano S, Ueda Y, Hamasaki T, Sato H, Nanto S, Hori M, Komuro I. on Behalf of The Osaka Acute Coronary Insufficiency Study (OACIS) Group Incidence,

Predictors, and Subsequent Mortality Risk of Recurrent Myocardial Infarction in Patients following Discharge for Acute Myocardial Infarction. *Circ J*. 2013;77(2):439-446.

- 2) Matsumoto S, Sakata Y, Nakatani D, Suna S, Mizuno H, Shimizu M, Usami M, Sasaki T, Sato H, Kawahara Y, Nanto S, Hamasaki T, Hori M, Komuro I. A Subset of Circulating MicroRNAs are Predictive for Cardiac Death After Discharge for Acute Myocardial Infarction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;427(2):280-4.

[学会発表] (計4件)

- 1) Shinichiro Suna, Yasuhiko Sakata, Daisaku Nakatani, Masaya Usamai, Sen Matsumoto, Keiji Okuda, Kouichi Ozaki, Seiji Takashima, Tetsuo Minamino, Toshihiro Tanaka, Hiroshi Sato, Masatsugu Hori, Shinsuke Nanto, Issei Komuro; on behalf of Osaka Acute Coronary Insufficiency Study (OACIS) Group. Cardiovascular Events Associated with Lymphotoxin Alpha and its Polymorphism After the Onset of Myocardial Infarction. Annual Congress of American Heart Association. November 12-16, 2011. Orlando, USA.
- 2) Daisaku Nakatani, Yasuhiko Sakata, Shinichiro Suna, Masaya Usamai, Sen Matsumoto, Toshimitsu Hamasaki, Hiroshi Sato, Masatsugu Hori, Shinsuke Nanto, Issei Komuro; on

behalf of Osaka Acute Coronary Insufficiency Study (OACIS) Group. Incidence, Predictors, and Long-Term Mortality of Recurrent Myocardial Infarction in Patients following Discharge for Acute Myocardial Infarction. Annual Congress of American Heart Association. November 12-16, 2011. Orlando, USA.

- 3) 松本 専、坂田泰彦、中谷大作、砂真一郎、宇佐美雅也、原正彦、南都伸介、小室一成. The association of circulating microRNAs with prognosis of patients after acute myocardial infarction. 2011年12月3日. 第28回国際心臓研究会 日本部会(東京).
- 4) Sen Matsumoto, Yasuhiko Sakata, Daisaku Nakatani, Shinichiro Suna, Masaya Usami, Masahiko Hara, Yukio Kawahara, Toru Oka, Seiji Takashima, Tatsuya Sasaki, Hiroshi Sato, Shinsuke Nanto, Issei Komuro. Circulating MicroRNAs as Therapeutic Targets for Cardiac Remodeling and Heart Failure in Patients after Acute Myocardial Infarction. 2013年3月15日. 日本循環器学会総会(横浜).

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂田 泰彦（大阪大学・医学系研究科・
助教）
研究者番号：90379206

(2) 研究分担者

- ・ 中谷 大作（大阪大学・医学系研究科・
研究員）
研究者番号：60444535
- ・ 砂 真一郎（大阪大学・歯学研究科
助教）
研究者番号：40573085

(3) 連携研究者

なし