

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2012
課題番号：23659670
研究課題名（和文） miRNA を用いた新規大動脈瘤バイオマーカーの開発とその治療応用
研究課題名（英文） Potential of microRNA as a biomarker for atherosclerotic aortic aneurysm
研究代表者 鳥飼 慶（TORIKAI KEI） 大阪大学・医学系研究科 助教
研究者番号：70364792

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は大動脈瘤の miRNA の発現を網羅的に解析し、miRNA を用いて大動脈瘤における新たな biomarker を作成することであるが、まずは腹部大動脈瘤壁組織から miRNA を網羅的に抽出し、正常大動脈壁に発現している miRNA と比較検討した。その結果、炎症、fibrosis、血管内皮の proliferation に関連する miRNA 発現量が正常大動脈壁と比較し、有意に上昇していた。また、その特異的に発現する miRNA と瘤壁に発現する炎症性サイトカインとの間に有意な相関関係を認めることがわかった。その結果を踏まえ target miRNA を決定し、腹部大動脈瘤患者の血漿中において、上記にて決定した target miRNA の発現を real time PCR 法を用いて解析した。その結果、大動脈瘤患者の血中において炎症をコントロールする miR-124a, miR-155, miR-223 の miRNA, fibrosis を制御する miR-29b の miRNA の発現量は有意に低下していた。

研究成果の概要（英文）：

This study examined tissue- and plasma-microRNAs specifically associated with AAA. AAA and normal wall tissues were sampled from patients undergoing AAA repair and aortic valve replacement surgery, respectively. MicroRNA expression was assessed by high-throughput microRNA arrays and validated by real-time PCR for individual microRNAs that showed significant expression differences in the initial screening. MicroRNAs related to fibrosis (miR-29b), inflammation (miR-124a, miR-146a, miR-155 and miR-223), and endothelium (miR-126, let-7 family members and miR-21) were significantly upregulated in AAA tissue. Expression levels of monocyte chemoattractant protein-1 and miR-124a, 146a and 223, tumor necrosis factor- α and miR-126 and 223, and transforming growth factor- β and miR-146a showed a significant negative correlation. Expression of microRNAs, such as miR-29b, miR-124a, miR-155 and miR-223, upregulated in AAA tissue was significantly reduced in plasma of AAA patients compared to healthy controls and coronary artery disease patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科

キーワード：miRNA・大動脈瘤・AAA・

1. 研究開始当初の背景

大動脈瘤の病理組織像では中膜の菲薄化、あるいは中膜弾性線維の消失がしばしば観察される。中膜の破壊には内腔側のアテローム硬化性変化および細胞外基質分解酵素 (matrix metalloproteinase) を中心とする蛋白分解酵素が大きな役割を果たしていると考えられており、炎症反応の結果アテローム硬化巣内には膠原線維の増加による線維化が生じる。また、大動脈瘤は正常径との移行部から大動脈瘤の最大拡張部までダイナミックに変化しており、大動脈瘤初期病変である正常径との移行部では細胞外基質の構造は保たれているものの炎症性サイトカインが増加し炎症細胞浸潤が顕著であることが解明されており、大動脈の瘤形成には限局する炎症反応が大きく関与していることが示唆される。このことから大動脈壁に限局する動脈硬化および炎症反応を抑えることは、大動脈瘤の拡大あるいは線維化の抑制及びその治癒過程に関し重要な要素となりうることは容易に想像できる。

一方、20〜30塩基程度の短いRNAが細胞内で遺伝子発現の抑制やRNAの修飾に重要な役割を果たしているということが、さまざまな研究から明らかとなってきた。miRNAは生理的に発生・分化・増殖などさまざまな生理現象に強く関連していることがわかっている。特に最近の知見では心血管病変の分野においてmiRNAが重要な役割を示していることがわかり始めており、さまざまなmiRNAが血管病変における細胞の proliferation, apoptosis, あるいは動脈硬化性病変における inflammation, fibrosis などに深く関与していることが明らかになりつつある。この

ように研究途上ではあるが動脈硬化病変を含む血管病変に対し、miRNAが深く関与していることはまぎれもない事実となっており、本研究がターゲットとしているmiRNAは動脈瘤の病態に強く関連していることが推測される。

2. 研究の目的

大動脈瘤のmiRNAの発現を網羅的に解析し、miRNAを用いて大動脈瘤における新たな biomarker を作成する

3. 研究の方法

(1) 腹部大動脈瘤組織における up regulate されているmiRNA発現の網羅的解析。

(対象と方法)

腹部大動脈瘤壁組織 (動脈瘤最大径の部位) からmiRNAを網羅的に抽出し、正常大動脈壁に発現しているmiRNAと比較検討する。

(評価)

① miRNA発現の網羅的解析

Microarray (TaqMan Array Human MicroRNA A) にて腹部大動脈瘤壁に発現しているmiRNAを網羅的に解析

② 組織学的検討

HE染色、マッソントリクローム染色、マクロファージ染色、好中球ペルオキシダーゼ染色、Tunnel染色、MCP-1染色を行い、炎症細胞の程度や障害の程度、線維率、血管平滑筋細胞のapoptosisの状態とmiRNAとの相関関係を比較検討する。

③ 炎症性サイトカインとmiRNAとの関係性の検討

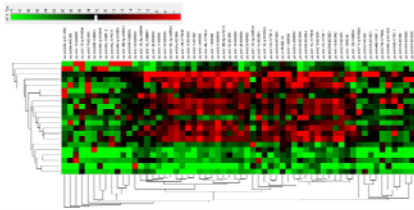
炎症性サイトカイン (TNF- α , TNF- β , IL-6, IL-1 β , MCP-1, MMP, TIMP) の発現を real time PCR 法により mRNA レベルも測定し、miRNA との相関関係を検討し、その結果を踏

まえ target miRNA を決定する。

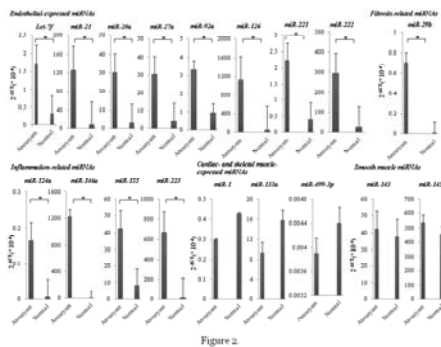
(2) 腹部大動脈瘤患者の血漿中 (plasma) において、上記にて決定した target miRNA (miR-21, 146a, 126, 124, 29b, 155, 223, 17, 7f, 15a, 15b, 26a) の発現を real time PCR 法 (TaqMan MicroRNA Assays Protocol) を用いて解析し、正常および狭心症患者の血漿中における miRNA と比較検討する。

4. 研究成果

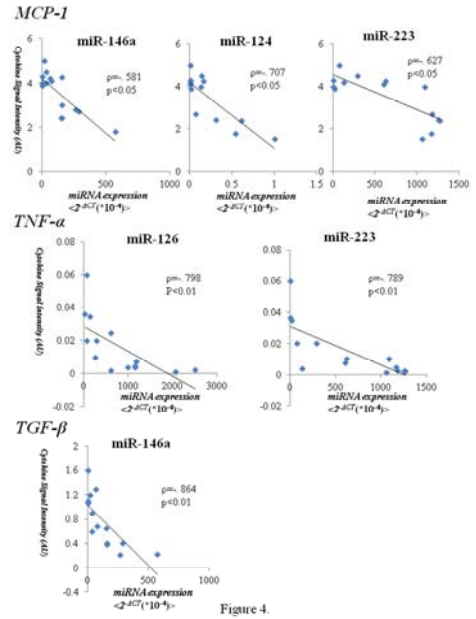
(1) 腹部大動脈瘤壁の miRNA 発現パターンは正常大動脈壁と比較して、大きく相違していた。



(2) 特に、AAA において炎症をコントロールする miR-146, miR-126 等の miRNA, 血管内皮の proliferation を制御する miR-221, 222 等の miRNA, fibrosis を制御する miR-29 の miRNA の発現量は正常大動脈壁と比較し、有意に上昇していた。



(3) 腹部大動脈瘤内に発現する miRNA (miR-124, 126, 146a, 223) は MCP-1, TNF- α , TGF- β と有意な相関関係を認めた。



(4) 正常の血管と比較して、腹部大動脈瘤壁には macrophage の集積を伴う炎症性変化が観察された。

(5) 血中 miRNA の内在コントロールとして miR-16 が妥当であった。

(6) 腹部大動脈瘤患者の血中の miRNA 発現パターンは正常患者と比較して、大きく相違していた。

(7) 大動脈瘤患者の血中において炎症をコントロールする miR-124a, miR-155, miR-223 の miRNA, fibrosis を制御する miR-29 の miRNA の発現量は有意に低下していた。

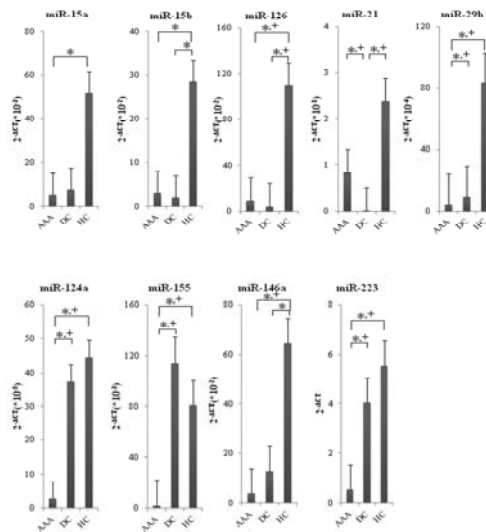


Figure 5.

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1件)

- ① Kin K, Miyagawa S, Fukushima S, Shirakawa Y, Torikai, K, Shimamura K, Daimin T, Kawahara Y, Kuratani T, Sawa Y,
Tissue- and plasma-specific microRNA signatures for atherosclerotic abdominal aortic aneurysm Journal of the American Heart Association 2012; 1: e000745
doi: 10.1161/JAHA.112.000745 査読有

[学会発表] (計3件)

- ① Keiwa Kin
Potential of microRNA as a biomarker for atherosclerotic aortic aneurysm
第76回日本循環器学会総会
2012.3.16-18 福岡国際会議場
- ② Keiwa Kin
Tissue- and plasma-specific microRNA signatures for atherosclerotic abdominal aortic aneurysm
American Heart Association 2011
November 12-16, 2011 Orlando USA
- ③ Keiwa Kin
Comprehensive analysis of microRNA expression in human abdominal aortic aneurysm
第75回日本循環器学会総会
2011.8.3-4
パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥飼 慶 (TORIKAI KEI)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 70364792

(2) 研究分担者

澤 芳樹 (SAWA YOSIKI)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 00243220

倉谷 徹 (KURATANI TORU)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号: 90448035

坂口 太一 (SAKAGUCHI TAICHI)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号: 10467574

(H24年3月31日まで分担者として参画)

白川 幸俊 (SHIRAKAWA YUKITOSHI)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号: 20457013

島村 和男 (SHIMAMURA KAZUO)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 10507205

金 啓和 (KIN KEIWA)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号: 70532985

(H24年1月23日まで分担者として参画)