

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790766

研究課題名(和文) 心血管疾患におけるマイクロRNA発現評価と発現調節による新規治療の開発

研究課題名(英文) MicroRNA expression in plasma and new therapy for cardiovascular diseases

研究代表者

得能 智武(Tokunou, Tomotake)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50567378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：心血管疾患発症リスクの高い睡眠時無呼吸症候群の患者の血漿中で発現するマイクロRNAを測定した。持続陽圧呼吸装置(CPAP)治療前後での発現変化検討のため、マイクロRNAアレイを施行した。変化の大きいものについて検体数を増やして定量PCRを施行したが、今回の症例群では治療の前後で有意差を認めたマイクロRNAを同定出来なかった。

miR-132は、低酸素培養下の培養血管内皮細胞では発現量が0.52倍に有意に低下した。下肢虚血モデルへのmiR-132投与で、p120RasGAPの発現低下と虚血の改善を予想したが、明らかな改善は認めていない。マイクロRNAの投与方法に改善の必要あり。

研究成果の概要(英文)：Sleep apnea syndrome is one of the risks of cardiovascular diseases. MicroRNAs from plasma of sleep apnea syndrome patients with agreement of using CPAP (continuous positive airway pressure) were measured. The microRNAs expression was measured before and after CPAP therapy. First microRNAs expression was measured by microRNA array. The result showed some microRNAs expression changed after CPAP therapy. The expression changes of microRNAs were measured by real-time PCR with 11 samples, but the results showed no significant difference with CPAP therapy in this case group.

The expression of microRNA-132 of vascular endothelial cells decreased 0.52 times with low oxygen culture condition. One of the microRNA-132 targets is p120RasGAP (Ras GTPase activating protein). The administration of microRNA-132 might be one of the therapeutic targets of ischemic vascular diseases by decrease of p120RasGAP. But the delivery method of microRNA is needed to be improved.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子血管病態学 マイクロRNA 低酸素

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで心血管疾患に関する転写因子の機能を含むシグナル伝達系について詳細に検討してきた。この中で、培養血管平滑筋細胞をアンジオテンシン II やトロンビンといった血管作動性物質で刺激すると、Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) や p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) が活性化され、インターロイキン-6 (IL-6) などのサイトカインの産生や c-fos の発現を促し、細胞増殖、肥大を促進することが分かった。この反応系において CREB という転写因子が活性化すること、またこの活性化無くしてはサイトカインの発現や細胞の増殖肥大が進行しないことを証明した。さらに CREB 機能評価には dominant negative (DN)-CREB を過剰発現させる手法を用いた。DN-CREB の過剰発現による CREB 活性化抑制にて培養細胞はアポトーシスに陥ることが分かり、また DN-CREB を過剰発現させた血管では、血管傷害後の新生内膜の形成が著しく抑制された。このことから、細胞の増殖に CREB の活性化が重要な役割を果たしていること、DN-CREB による CREB 活性化の抑制は細胞のアポトーシスを促し、血管病変の進行を抑制できることが示された (Circulation. 2003 Sep 9;108(10):1246-52.)。

近年、マイクロ RNA の研究が急速に進み、マイクロ RNA の発現量と各種疾患との関連性が指摘されている。マイクロ RNA とは、タンパク質に翻訳されない非翻訳 RNA のうち、22 塩基長の小分子 RNA のことである。マイクロ RNA はゲノムにコードされており、シグナルの種類によって発現が増減する。マイクロ RNA 発現が増加するとターゲットの mRNA の 3' 非翻訳領域に結合し、発現を特異的に負に制御する。CREB に関する新しい知見として、CREB の活性化がマイクロ RNA -132 の発現を著しく高めることが報告された。

2. 研究の目的

- (1) 低酸素や心血管疾患に関係するマイクロ RNA を血漿中から同定する。
- (2) 我々はこれまで心血管疾患において cAMP response element-binding protein (CREB) という転写因子に着目し、CREB の活性化を調

節することで、治療のターゲットとして検討してきた。最近、CREB によって発現が増加するマイクロ RNA-132 が報告された。このマイクロ RNA はいくつかの遺伝子発現を調節していることが報告されており、マイクロ RNA -132 の発現の増減により、炎症反応や血管新生などを調節できる可能性が示唆されている。マイクロ RNA を使用した治療検討例は少なく、マイクロ RNA -132 を治療薬として臨床応用出来るかどうか検討する。

3. 研究の方法

(1) 臨床研究：心血管疾患におけるマイクロ RNA の発現

虚血性心臓病、慢性心不全患者や睡眠時無呼吸症候群患者のように低酸素にさらされた患者を対象に、採血を行い、血漿中や白血球細胞におけるマイクロ RNA -132 の発現量を定量-PCR にて測定する。血漿中のマイクロ RNA は微量であるため、マイクロ RNA 精製キットを使用。

(2) マイクロ RNA -132 の発現と機能解析

培養血管内皮細胞における p120RasGAP、マイクロ RNA -132 の発現を RT-PCR により検討。またアンジオテンシン II やサイトカインによる発現の変化を検討。

(3) マイクロ RNA -132 オリゴヌクレオチド投与による治療

マイクロ RNA -132 mimic を筋肉内注射する。既知遺伝子配列と相同でないマイクロ RNA をネガティブコントロールとして使用する。

上記オリゴヌクレオチドを局所投与。局所での投与を行うため、以前の実験でタンパク質やケモカインを局所投与するために使用したナノファイバージェル (PuraMatrix Peptide Hydrogel) を使用し、マイクロ RNA の拡散を抑制する。もしくはリポソームとの投与も検討。

マウス下肢虚血モデルにおける血管新生に及ぼす影響を検討。虚血モデル作成 (大腿動脈結紮除去) 後に上記のようにジェル、もしくはリポソームとオリゴヌクレオチドを虚血下肢に注入する。0、1、2、4、6 週間後にレーザー Doppler による血流の評価および、毛細血管密度などを組織学的に定

量 (CD31 免疫染色)。術後にマイクロ RNA が局所に留まっているか、組織を回収し、RT-PCR で確認 (経時的な減少率を測定)。

4. 研究成果

臨床研究において心血管疾患に関わるマイクロ RNA 発現を検討した。対象として、心血管疾患発症リスクの高い睡眠時無呼吸症候群の患者を選択した。心血管疾患の合併症なく、持続陽圧呼吸装置 (Continuous Positive airway Pressure: CPAP) 治療の前後で血漿回収に同意された無呼吸症候群症例は 11 例 (男性 10 例、女性 1 例)。平均年齢 58.3 歳。(九州大学臨床研究倫理審査委員会許可番号 24-110 図 1)

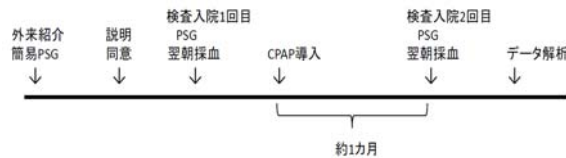


図 1. 臨床研究プロトコール

CPAP 治療により、AHI (Apnea hypopnea index) は平均 59.4 から平均 6.5 まで全ての症例において有意に改善した(図 2)。また血圧及び血管内皮機能 (FMD : flow mediated dilation にて測定、4.7%→5.8%に上昇) も改善傾向を認めた。

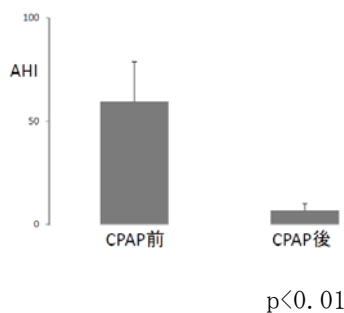


図 2. CPAP 前後での AHI 変化

上記の患者において血漿中から RNA を抽出し、マイクロ RNA の発現を検討した。まず、4 人分の検体を使用し、マイクロ RNA アレイを施行し、変化の大きいものを選択し、さら

に 11 人の検体を用いて定量-PCR を施行した (miR-1243, miR-302c など) が、今回の症例群では治療の前後で有意差を認めたマイクロ RNA を同定出来なかった。miR-132 についても検討したが有意な変化を認めなかった(図 3)。

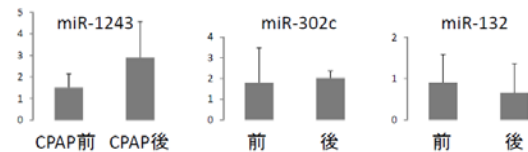


図 3. 血漿中の miRNA 変化

マイクロ RNA-132(miR-132)の心血管疾患への治療応用を検討した。培養血管内皮細胞を用い 1%酸素で培養し、細胞内でのマイクロ RNA 発現量を検討した。48 時間低酸素により、miR-132 は 0.52 倍に有意に低下した。低酸素誘導因子 (HIF) によって発現制御を受けるといわれる miR-210 の発現は 1.58 倍に増加した(図 4)。

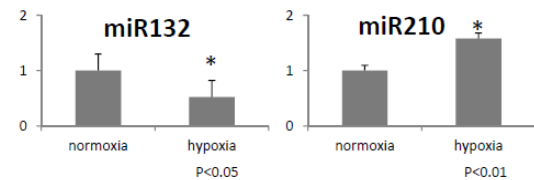


図 4. 低酸素条件の血管内皮細胞での miRNA 発現変化

低酸素にて miR-132 発現は低下していた。miR-132 のターゲットの 1 つである p120RasGAP は細胞増殖を促す Ras を不活化する GTPase の補酵素である。このため、低酸素領域において、miR-132 補充による p120RasGAP の発現低下、細胞増殖及び血管新生効果を予測して、マウス下肢虚血モデルに投与した。

虚血領域に筋注し、その後同部位の蛋白を回収したが、p120RasGAP の発現に変化なかった(図 5)。レーザードップラーで測定した虚血の改善も明らかなものは見られなかった。



図 5. miR-132 投与後の p120Ras GAP

直接虚血部位への筋注ではマイクロ RNA が拡散し、効果が少ないと思われたため、以前の実験で蛋白の局所投与に有効であったナノフエーバーゲルを (PuraMatrix Peptide Hydrogel) 用いて混注したが、有意な改善は認められなかった。今後マイクロ RNA デリバリーの工夫が重要であり、有効な方法を再検討する。

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 Hashimoto T, Ichiki T, Watanabe A, Hurt-Camejo E, Michaëlsson E, Ikeda J, Inoue E, Matsuura H, Tokunou T, Kitamoto S, Sunagawa K. Stimulation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor by AR-R17779 suppresses atherosclerosis and aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Vascular Pharmacol.* 査読有 2014 Mar 29. S1537-1891(14)00059-7. doi:10.1016/j.vph.2014.03.006.
- ② Watanabe A, Ichiki T, Sankoda C, Takahara Y, Ikeda J, Inoue E, Tokunou T, Kitamoto S, Sunagawa K. Suppression of abdominal aortic aneurysm formation by inhibition of prolylhydroxylase domain protein through attenuation of inflammation and extracellular matrix disruption. *Clin Sci (Lond).* 査読有 126(9)、2014、671-8 doi: 10.1042/CS20130435.
- ③ Ikeda J, Ichiki T, Matsuura H, Inoue E, Kishimoto J, Watanabe A, Sankoda C, Kitamoto S, Tokunou T, Takeda K, Fong

GH, Sunagawa K. Deletion of phd2 in myeloid lineage attenuates hypertensive cardiovascular remodeling. *J Am Heart Assoc.* 査読有 18;2(3):e000178, 2013 doi: 10.1161/JAHA.113.000178.

- ④ Sadamatsu K, Yoshida K, Yoshidomi Y, Koga Y, Amari K, Tokunou T. Comparison of pre-dilation with a non-compliant balloon versus a dual wire scoring balloon for coronary stenting. *World Journal of Cardiovascular Diseases,* 査読有 3、2013、395-400 http://dx.doi.org/10.4236/wjcd.2013.36061
- ⑤ Tokunou T, Sadamatsu K. Recurrence of Takotsubo cardiomyopathy with coronary slow flow phenomenon. *Journal of Cardiology Cases,* 査読有 5:e100-e106. 2012 doi:10.1016/j.jccase.2011.10.003
- ⑥ Ichiki T, Miyazaki R, Kamiharaguchi A, Hashimoto T, Matsuura H, Kitamoto S, Tokunou T, Sunagawa K. Resveratrol attenuates angiotensin II-induced senescence of vascular smooth muscle cells *Regulatory Peptides,* 査読有 177(1-3):35-39. 2012 doi: 10.1016/j.regpep.2012.04.005.

[学会発表] (計 2 件)

Aya Watanabe, Toshihiro Ichiki, Chikahiro Sankoda, Yusuke Takahara, Jiro Ikeda, Eriko Inoue, Tomotake Tokunou, Shiro Kitamoto, Kenji Sunagawa. Suppression of Abdominal Aortic Aneurysm Formation by Inhibition of Prolyl Hydroxylase Domain Protein through Attenuation of Inflammation and Extracellular Matrix Disruption. 第 78 回日本循環器学会 2014 年 3 月 23 日 東京
Daisuke Toyomura, Teiji Akagi, Yasufumi Kijima, Koji Nakagawa, Kengo Kusano, Toshiro Shinke, Atsushi Yao, Tomotake Tokunou, Hiromi Matsubara, Katsumasa Miyaji, Hiroshi Itoh, Shunji Sano

New Strategies for Patients with Atrial
Septal Defect and Severe Pulmonary
Arterial Hypertension: Combination of
Medical Therapy and Catheter Closure
日本循環器学会 2013 年 3 月 15 日 横浜

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.med.kyushu-u.ac.jp/cardiol/2_junkan/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

得能 智武 (TOKUNOU, Tomotake)

九州大学大学院・医学研究院・先端循環制
御学講座

研究者番号 : 50567378

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし