

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293125

研究課題名(和文) マイクロRNAの発現変動を切り口とした肺動脈性肺高血圧症の理解と新治療法の探索

研究課題名(英文) Altered expression of miRNA and gene expression in lungs of pulmonary arterial hypertension

研究代表者

酒井 俊 (SAKAI, SATOSHI)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：30282362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：肺高血圧症(PAH)患者肺(n=3)および肺癌患者肺健常部(n=3)から全RNAを抽出し、マイクロアレイ法によりmiRNAおよび遺伝子発現に対する網羅的解析を行った。PAH肺検体にて有意に増加するmiRNAの標的遺伝子のうち実際に発現低下が認められる81遺伝子は、TGFシグナル伝達(ALK1, BMP2, BMPR2)および細胞傷害反応(FAS, ICAM1)に関係していた。このことは、TGF経路の低下およびFAS発現低下によるアポトーシス抑制がPAHの病態形成に関与し、これらの遺伝子発現低下はmiRNAの発現変動により調節されている可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the expression of miRNA and mRNA in lungs of patients with pulmonary arterial hypertension (PAH) (n=3) and normal subject (n=3) using the microarray chips for miRNA and mRNA. We obtained actually decreased 81 genes among the target genes predicted from the increased miRNA in PAH lungs. These decreased 81 genes is involved in TGFb signaling pathway (ALK1, BMP2, BMPR2) and cytotoxic responses (FAS, ICAM1). It suggests that the suppression of TGFb signaling and anti-apoptosis contributes to the development of pathogenesis of PAH. Moreover, decrease in ALK1, BMP2, BMPR2 expression and inhibition of apoptosis by decreased FAS expression are partly regulated by miRNA augmentation in lungs of patients with PAH.

研究分野：循環器内科学

キーワード：マイクロRNA 肺高血圧症 マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

難治性疾患である肺動脈性肺高血圧症 (PAH) の共通病像は、肺小動脈の中膜・新生内膜における著明な肺動脈血管平滑筋細胞 (PASMC) 増殖による血管閉塞と引き続く肺血管抵抗・肺動脈圧の上昇である。申請者らは PAH の進展に、エンドセリン (ET) 系亢進による血管収縮と PASMC 増殖が関与し、ET 遮断薬が肺動脈壁肥厚と肺動脈圧上昇を抑制することを世界で初めて明らかにした。現在の PAH 治療は肺動脈収縮抑制と肺動脈壁肥厚抑制を基本方針とし、ET 遮断薬を含め 3 系統の薬剤が使用されるが治療効果は不十分である。近年ではチロシンキナーゼ阻害作用を有するイマチニブの有効性が注目されていることから、PAH の発症機序には不明な点が多く、別の分子を狙った新規治療法の開発が進むことが予想される。

遺伝子発現制御には転写因子および DNA メチル化・ヒストン修飾といった複数の調節メカニズムがある。近年、マイクロ RNA (miRNA) による遺伝子発現・翻訳抑制が知られるようになってきた。miRNA はゲノムの非翻訳領域にその配列が存在し、転写後プロセッシングを受け約 22 塩基の短鎖 RNA として形成され、標的遺伝子の 3' 側非翻訳領域に相補的配列に結合し (RISC 複合体)、メッセンジャー RNA (mRNA) の分解・翻訳抑制を介してその遺伝子機能阻害を行う。

PAH での miRNA 発現解析は、ここ数年間に国外から報告されているトピック分野である。一方、同一検体で網羅的かつ同時に miRNA 発現と遺伝子発現変動解析とを行い、両者を組み合わせて PAH を統合的に解釈した報告はない。

2. 研究の目的

PAH の病態における miRNA 発現変動-遺伝子発現変化の関連性を見出し、見出される PAH 関連 miRNA-標的遺伝子連関を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) ヒト PAH 患者および健常者の血漿中から小分子 RNA を抽出し、マイクロ RNA (miRNA) 発現変動をマイクロアレイにより行い、PAH 血漿において有意に変動する miRNA を解析した。
- (2) ヒト PAH 肺検体 (n=3) および肺がん患者肺の健常組織 (n=3) から total RNA および小分子 RNA を抽出し、有意にその発現が変動する miRNA およびメッセンジャー RNA (mRNA) を、各々のマイクロアレイ (東レ社) により解析した。ソフトウェアは Subio 社製 Subio Platform ver 1.19 を使用した。
- (3) miRNA の標的遺伝子および mRNA に対する制御 miRNA は、Web 上に公開されている [mirTarbase \(http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw\)](http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw), [PITA \(http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_data.html\)](http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_data.html), [miRanda \(http://www.microrna.org/microrna/home.do\)](http://www.microrna.org/microrna/home.do) から予測した。
- (4) 発現変動遺伝子が、どのようなパスウェイに関与しているかは、Web 上の DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) で検索した。

4. 研究成果

- (1) 血漿より抽出した miRNA 発現を健常者と PAH 患者で比較した。健常者に比し PAH 患者で有意に 2 倍以上増加している miRNA は 2 種類、有意に 1/2 以下に低下している miRNA は 20 種類あった。しかしながら、肺から抽出した miRNA, mRNA 発現 (研究成果 3-(2), (3)) と関連するものは見いだせなかった。

- (2) PAH 肺検体で有意 ($P < 0.05$) に 2 倍以上増加している miRNA は 19 種類、有意 ($P < 0.05$) に 1/2 以下に低下している miRNA は 17 種類であった。このうち、有意に増加している miRNA の予想標的遺伝子リストは 2762 種類であった。これらの予想標的遺伝子リストのうち、有意に低下している遺伝子は 81 種類であった。この 81 種類の遺伝子がどのようなパスウェイに参与しているかを検索した。有意に変化している経路は TGF β シグナル伝達経路および細胞傷害性反応に関係するものあり、前者では ALK1 (0.4 倍), BMP2 (0.1 倍), BMPR2 (0.4 倍)、後者では FAS (0.01 倍), ICAM1 (0.02 倍) の発現低下が認められた。これらの遺伝子発現パターンは、PAH 患者肺で増加した miRNA が直接・間接的に TGF β シグナル伝達経路を抑制していることを示唆している。また、上記の TGF β スーパーファミリー遺伝子リストの一部は、これまでも遺伝性 PAH 発症に関与していることが明らかにされており、得られた結果は理にかなったものであると考えられると同時に、TGF β 経路が miRNA 発現により調整を受けている可能性を示唆する。また、FAS の発現低下は、FAS リガンド刺激によるアポトーシス誘導を抑制していることを示唆する。PAH 肺血管壁における増殖性変化を考えると、FAS 発現低下による抗アポトーシス作用が血管壁肥厚に結びついている可能性を示唆する。
- (3) 一方、肺組織において 1/2 以下に有意に低下する miRNA の予想標的遺伝子は 1071 種類であった。その中で実際に有意に発現が増加する遺伝子は 6 種類であった。しかしながら、これらの 6 種類の遺伝子が関連するパスウェイは見いだせなかった。

- (4) 以上より、肺高血圧患者肺において有意に増加する miRNA は、TGF β シグナル経路を抑制し、一方で細胞死抑制に働いていることが明らかになった。
- (5) 反対に、遺伝子発現パターンからそれらを制御していると予想される miRNA の抽出を行った。有意に 1/2 以下に低下している mRNA は 184 種類であった。これらから予想される制御 miRNA は 80 種類あり、このうち有意に増加している miRNA は 7 種類であった。一方、PAH 肺検体で有意に 2 倍以上に増加する mRNA は 45 種類あった。これらから予想される制御 miRNA は 108 種類あり、このうち有意に低下している miRNA は 10 種類であった。
- (6) 以上より、このように遺伝子発現変動から予測される miRNA が、直接・間接的に miRNA-遺伝子発現変動に関与していることが示唆された。

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 16 件)

Tahara N, Dobashi H, Fukuda K, Funauchi M, Hatano M, Ikeda S, Joho S, Kihara Y, Kimura T, Kondo T, Matsushita M, Minamino T, Nakanishi N, Ozaki Y, Saji T, Sakai S, Tanabe N, Watanabe H, Yamada H, Yoshioka K, Sasayama S. Efficacy and safety of a novel endothelin receptor antagonist, macitentan, in Japanese patients with pulmonary arterial hypertension. *Circ J*. 2016 in press. 査読有 DOI: 10.1253/circj.CJ-15-1305

Sakai S, Maruyama H, Kimura T, Tajiri K, Honda J, Homma S, Aonuma K, Miyauchi T. Antagonists to endothelin receptor

type B promote apoptosis in human pulmonary arterial smooth muscle cells. *Life Sciences*. 2016 in press. 査読有 DOI: 10.1016/j.lfs.2016.03.044

Maruyama H, Dewachter C, Sakai S, Belhaj A, Rondelet B, Rummelink M, Vachery JL, Naeije R, Dewachter L. Bosentan reverses the hypoxia-induced downregulation of the bone morphogenetic protein signaling in pulmonary artery smooth muscle cells. *Life Sciences*. 2016 in press. 査読有 DOI: 10.1016/j.lfs.2016.05.018

Maruyama H, Dewachter C, Belhaj A, Rondelet B, Sakai S, Rummeling M, Vachery J, Naeije R, Dewachter L. Endothelin-Bmpr2 interaction to induce pulmonary artery smooth muscle cell hyperplasia in pulmonary arterial hypertension. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 34, 468-78, 2015. 査読有 DOI: 10.1016/j.healun.2014.09.011

Baba O, Hasegawa S, Nagai H, Uchida F, Yamatoji M, Kanno N, Yamagata K, Sakai S, Yanagawa T, Bukawa H. MicroRNA-155-5p is associated with oral squamous cell carcinoma metastasis and poor prognosis. *J Oral Pathol Med* 2015 査読有 DOI: 10.1111/jop.12351

Sakai S, Shimojo N, Kimura T, Tajiri K, Maruyama H, Homma S, Kuga K, Mizutani T, Aonuma K, Miyauchi T. Involvement of peptidyl-prolyl isomerase Pin1 in the inhibitory effect of fluvastatin on endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Life Sciences* 102, 98-104, 2014. 査読有 DOI: 10.1016/j.lfs.2014.03.018

Tajiri K, Sakai S, Kimura T, Machino-Ohtsuka T, Murakoshi N, Xu D, Wang Z, Sato A, Miyauchi T, Aonuma K. Endothelin receptor antagonist exacerbates myocarditis in mice. *Life Sciences*. 118, 288-296, 2014. 査読有 DOI: 10.1016/j.lfs.2014.01.007

Homma S, Kimura T, Sakai S, Yanagi K, Miyauchi Y, Aonuma K, Miyauchi T. Calcitonin gene-related peptide protects the myocardium from ischemia induced by endothelin-1: Intravital microscopic observation and ³¹P-MR spectroscopic studies. *Life Sciences*. 118, 248-254, 2014. 査読有 DOI: 10.1016/j.lfs.2014.02.024

Miyauchi Y, Jesmin S, Sakai S, Kamiyama J, Shimojo N, Rahman A, Islam M, Zaedi S, Maeda S, Maruyama H, Mizutani T, Aonuma K, Miyauchi T. Effects of selective endothelin (ET)-A receptor antagonist versus dual ET-A/B receptor antagonist on hearts of streptozotocin-treated diabetic rats. *Life Sciences*. 111, 6-11, 2014. 査読有 DOI: 10.1016/j.lfs.2014.06.008

Shimojo N, Jesmin S, Sakai S, Maeda S, Miyauchi T, Mizutani T, Aonuma K, Kawano S. Fish oil constituent eicosapentaenoic acid inhibits endothelin-induced cardiomyocyte hypertrophy via PPAR- α . *Life Sciences*. 118, 173-178, 2014. 査読有 DOI: 10.1016/j.lfs.2014.04.025

Wang Z, Sato A, Akiyama D, Kimura T, Tajiri K, Hoshi T, Sakai S, Koike A, Miyauchi T, Aonuma K. Clinical value of plasma pentraxin 3 levels for predicting

cardiac troponin elevation after percutaneous coronary intervention. *Life Sciences* 95, 40-44, 2014. 査読有 DOI: 10.1016/j.lfs.2013.11.021

Tajiri K, Sato A, Hoshi T, Kimura T, Nakagawa Y, Sakai S, Aonuma K, Watanabe S. Mechanisms explaining the late “catch-up” phenomenon after sirolimus-eluting stent implantation. *International Journal of Cardiology* 177, 44-45, 2014. 査読有 DOI: 10.1016/j.ijcard.2014.09.116

Kawamura R, Seo Y, Ishizu T, Atsumi A, Yamamoto M, Machino-Ohtsuka T, Nakajima H, Sakai S, Tanaka-Oishi Y, Minami M, Aonuma K. Feasibility of left ventricular volume measurements by three-dimensional speckle tracking echocardiography depends on image quality and degree of left ventricular enlargement: Validation study with cardiac magnetic resonance imaging. *Journal of Cardiology* 63, 230-238, 2014. 査読有 DOI: 10.1016/j.jjcc.2013.08.010

Machino-Ohtsuka T, Tajiri K, Kimura T, Sakai S, Sato A, Yoshida T, Hiroe M, Yasutomi Y, Aonuma K, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C aggravates autoimmune myocarditis via dendritic cell activation and Th17 cell differentiation. *Journal of American Heart Association* 3, e001052, 2014. 査読有 DOI: 10.1161/JAHA.114.001052.

Tajiri K, Shimojo N, Sakai S, Machino-Ohtsuka T, Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Tsujimura Y, Kimura T, Sato A, Yasutomi Y, Aonuma K. Pitavastatin

regulates helper T-cell differentiation and ameliorates autoimmune myocarditis in mice. *Cardiovascular Drug and Therapy* 27, 413-424, 2013. 査読有 DOI: 10.1017/s10557-013-6464-y

Seto K, Uchida F, Baba O, Yamatoji M, Karube R, Warabi E, Sakai S, Hasegawa S, Yamagata K, Yanagawa T, Onizawa K, Miyoshi E, Shoda J, Bukawa H. Negative expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in oral squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis. *Springerplus* 2013 査読有 DOI: 10.1186/2193-1801-2-657

〔学会発表〕(計 11 件)

Sakai S, et al. Involvement of peptidyl isomerase (Pin1) in development of hypoxia-induced pulmonary hypertension. 第 80 回日本循環器学会学術集会 2016.03.20 仙台国際センター(仙台市)

Sakai S, et al. Effects of endothelin receptor antagonists on doxorubicin-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells derived from human pulmonary artery. 14th International Conference on Endothelin 2015.09.03 (Savannah, GA, USA)

Maruyama H, Dewachter C, Sakai S, et al. Bosentan reverses the hypoxia-induced downregulation of the bone morphogenetic protein in pulmonary artery smooth muscle cells. 14th International Conference on Endothelin 2015.09.03 (Savannah, GA, USA)

酒井 俊 他 肺高血圧進展における Pin1 (Peptidyl isomerase1)の役割。第 4 回日本肺循環学会・第 3 回日本肺高血圧学会合同学術集会 2015.10.04 東京ステ

ーション・コンファレンス（東京都）
丸山秀和、デワヒタ・セリン、酒井 俊
他 肺動脈における内弾性板構成の機
序とその障害。第 4 回日本肺循環学会・
第 3 回日本肺高血圧学会合同学術集会
2015.04 東京ステーション・コンファレ
ンス（東京都）

Honda J, Kimura T, Sakai S, et al. The
glucagon-like peptide-1 receptor antagonist
improves hypoxia induced pulmonary
hypertension in mice. 第 79 回日本循環器
学会学術集会 2015.04.26 大阪国際会議
場（大阪府）

Sakai S, et al. Modulation of RNA
polymerase II activity by the C-terminal
domain phosphatase FCP1 in development
of cardiac dysfunction. 第 18 回日本心不
全学会学術集会 2014.10.11 大阪国際会
議場（大阪府）

酒井俊介、酒井 俊、他：POPH で肺動
脈圧低下効果が減弱したエボプロステ
ノールの再導入例 第 3 回日本肺循環
学会・第 2 回日本肺高血圧学会合同学術
集会 2014.10.04 大手町サンケイプラザ
（東京都）

酒井 俊、蕨 栄治、他：新規肥満モデ
ル SQSTM/p62 遺伝子欠損マウスにおけ
る血圧動態 第 43 回日本心脈管作動
物質学会 2014.02.15 神戸国際会議場
（神戸市）

Sugano A, Sakai S, et al. The case of
pulmonary veno-occlusive disease
succeeded in administration of sildenafil by
dose adjustment. The Thirteenth
International Conference on Endothelin
2013.09.09 筑波大学東京キャンパス（東
京都）

Maruyama H, Sakai S, et al. The
hypoxia-mimetic agent cobalt chloride
induces the expression of intrinsic BMP

antagonist noggin independently of
endothelin pathway. The Thirteenth
International Conference on Endothelin
2013.09.09 筑波大学東京キャンパス（東
京都）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 俊 (SAKAI, Satoshi)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：30282362

(2) 研究分担者

武川 寛樹 (BUKAWA, Hiroki)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：80173558

住田 孝之 (SUMIDA, Takayuki)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：00183054

宮内 卓 (MIYAUCHI, Takashi)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：60222329

蕨 栄治 (WARABI, Eiji)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：70396612