

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：24701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670301

研究課題名(和文) 遺伝子発現制御システムを用いた新規予防医学的バイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Developing the new preventive biomarkers by using gene expression system

研究代表者

牟礼 佳苗 (Mure, Kanae)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90268491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：加齢に伴う疾患の原因として、インスリン抵抗性や内皮機能不全が挙げられるが、これらを初期段階で検出する予防医学的バイオマーカーの開発は重要である。遺伝子発現制御機構であるマイクロRNA(miRNA)は、血液や尿中で小型脂質小胞(エクソソーム)に内包されており、予防医学的バイオマーカーとしての可能性を発展させている。

本研究では、エクソソーム内包miRNAの疾患発症予知マーカーとしての可能性について検討した。その結果、いくつかのmiRNAについて、報告されている機能と矛盾しない結果を得ることができ、今後鋭敏な予防医学的バイオマーカーになる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The impact of the accumulation of chronic health condition such as insulin resistance and endothelial dysfunction caused by aging has been gaining attentions, since it causes diabetes, cardiovascular disease, Alzheimer's disease and other serious chronic diseases. Exosome, cell-derived vesicles in serum, plasma and urine, contains micro RNAs (miRNA) that regulate expression of genes related to these diseases.

In this study, we have found some of exosomal miRNAs showed consistent associations with serum cholesterol levels and oxidative stress markers which is thought to be underlying mechanism of insulin resistance and endothelial dysfunction. It suggests that exosomal miRNAs can be sensitive biomarkers for predicting aging-related chronic diseases.

研究分野：予防医学

キーワード：miRNA exosome

1. 研究開始当初の背景

急速な高齢化の進展に伴い、メタボリックシンドロームやアルツハイマー型認知症等の加齢に伴う疾患の増加が懸念されている。メタボリックシンドロームの発症基盤であるインスリン抵抗性が、アルツハイマー型認知症発症にも関与していることが明らかにされつつあり、加齢に伴う疾患の根幹における共通発症基盤としてのインスリン抵抗性の重要性を示唆している。しかしながら、大規模健診において、発症に至る初期段階を検出する予防医学的バイオマーカーとしての機能解析を行っている研究は、ほとんど例を見ない。

一方、遺伝子発現制御機構であるタンパクをコードしない 22 ヌクレオチド以下の一本鎖 miRNA について、疾患診断マーカーとしてのプロファイリングや、遺伝子治療を目的とした機構解明等が精力的に研究されている。MiRNA は、細胞分化・増殖などに重要な役割を担い、がんをはじめとする種々の疾患との関連について注目されている。MiRNA の発現は、疾患組織において、特異的な発現プロファイルを示すことが報告されている。近年、組織ではなく、血液やその他の生体試料中の分泌型 miRNA が、新たなバイオマーカーとして期待されている。分泌型 miRNA の多くは、直径 50 ~ 100 nm の小型脂質小胞(エクソソーム)に内包されていることから、多種類の体液中で安定に存在し得るとされており、miRNA の予防医学的バイオマーカーとしての可能性を進展させている。

我々は、発症に至る初期段階での検出には、遺伝子レベルでの影響評価が重要と考え、遺伝子発現制御システムである miRNA の発症予知マーカーとしての可能性に着目した。

2. 研究の目的

本研究では、加齢に伴う疾患の発症を早期に予知できる予防医学的バイオマーカーの開発を目的として行った。

メタボリックシンドロームやアルツハイマー型認知症等、加齢に伴う疾患の共通発症基盤として、インスリン抵抗性、血管内皮機能不全が挙げられる。これらのシグナル経路関与することが報告されている miRNA を解析の標的とした。

約 2,500 人の地域住民コホート集団から、対象者を抽出し、血液・尿中エクソソームを単離し、内包 miRNA のうち、主に血管内皮機能不全に関与すると報告されている miRNA を中心として定量解析し、影響評価を行うことを目的とした。

また、我々の研究も含め、メタボリックシンドロームとの関連が報告され、また、アルツハイマー型認知症との関連も報告されている、尿中酸化ストレスマーカーを解析することで、詳細な作用機序を解明し、疾患発症の初期段階を検出する予防医学的バイオマーカーへの応用を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

血液・尿中エクソソーム回収

同意を得た対象者から 30 人を抽出した。血清中エクソソームは Total Exosome Isolation Reagent (from serum)、尿中エクソソームは Total Exosome Isolation reagent (from Urine)(ともに Thermo Fisher 社、東京)を用いて回収した。

得られたエクソソームは、エクソソーム特異マーカーである CD63 を用いて、Western Blotting 法により確認した。

エクソソーム内包 miRNA 解析

確認されたエクソソームについて、Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit (Thermo Fisher 社)を用いて RNA を抽出し、さらに mirVana miRNA Isolation Kit (Thermo Fisher 社)を使用して miRNA を抽出した。

得られた miRNA について、TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher 社)により cDNA を生成し、TaqMan Assay 法により、インスリン抵抗性や血管内皮機能不全等に関連があると報告される miR-21、miR-22、miR-34a、miR-126、miR-133a、miR-155、miR-221、miR-222、miR-449、let-7g 等について、各 miRNA の発現を定量解析した。

酸化ストレスマーカーとの関連解析

酸化ストレスマーカーとして、脂質の過酸化マーカーである 8-isoprostaglandin F_{2α} (8-iso-PGF_{2α}) について、尿中の 8-iso-PGF_{2α} 量を、Urinary Isoprostane EIA Kit (Oxford Biomedical Research 社、Rochester, MI)を用いて測定した。同時に尿中クレアチニン量を Creatinine (urinary) Colorimetric Assay Kit (Cayman Chemical 社、Ann Arbor, MI)により測定し、尿中エクソソーム解析および酸化ストレスマーカー解析時に、補正に用いた。

4. 研究成果

血清、尿中エクソソームの単離については、回収できたタンパク量にばらつきがあった。エクソソーム特異マーカーで認識できないものもあり、また、およそ 56KDa であるにもかかわらず、110KDa 程度のバンドを表すサンプルもあり、エクソソームの回収には、さらなる工夫、また他の方法を検討する必要もあると考えられた。

MiRNA 発現定量解析においては、酸化ストレスやアポトーシスに関連する miR-21、miR-22、miR-34a、miR-155 および内皮機能に関連する miR-126、miR-221、miR-222、let-7g について、定量解析が成功した。MiR-126、miR-133、miR-499 については、対象者全員において発現量が低く、定量解析できないサンプルもあった。

MiRNA の発現を詳細に解析した結果を、図 1 に示した。動脈硬化に対して抑制的に作用することが報告されている miR-221 については、HDL-コレステロールとは負の関連を、LDL-コレステロールとは正の関連を示していた。

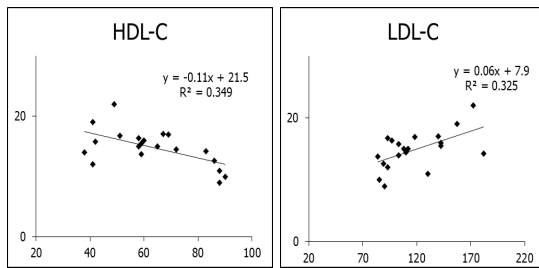


図 1. 血清エクソソーム内包 miR-221 発現量と血中コレステロールの関連

また、血清エクソソーム由来と尿中エクソソーム由来とで異なる関連を示した miRNA 群もあり、血液、尿のどちらか一方の解析のみでは、作用機序解明には至らないことが示唆された。

さらに、酸化ストレスマーカーのうち、メタボリックシンドロームやアルツハイマー型認知症との関連が示唆されており、我々もメタボリックシンドロームとの関連を報告している 8-iso-PGF2 の影響についても解析した。

その結果、表 1 に示したように、それぞれ正または負の関連を示す miRNA 群を見出した。

表 1. 血清および尿中エクソソーム内包 micro RNA と尿中 8-isoprostaglandin F2α との関連

	Serum	Urine
miR-21	+	+
miR-126	-	-
miR-221	-	-
miR-222	+	+

脂質の酸化ストレスマーカーである 8-iso-PGF2α は、循環器疾患で高発現が認められている miR-21 や miR-222 と正の関連を示し、抑制的に作用するとされている miR-126、miR-221 とは負の関連を示したことから、今後、本研究の最終目的である疾患発症の初期段階を検出する予防医学的バイオマーカーへと応用できる可能性が示唆された。

今後、エクソソーム回収法を含め、更なる検討、解析方法の精査が必要であると考えられる。

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 8 件)

Hashimoto M, Miyai N, Hattori S, Iwahara A, Utsumi M, Arita M, Takeshita T, Age and gender differences in the influences of eNOS T-786C polymorphism on arteriosclerotic parameters in general population in Japan, *Environ Health Prev Med*, 査読あり, 2016 (印刷中).

DOI 10.1007/s12199-016-0527-1

Hashimoto M, Watanabe M, Uematsu Y, Hattori S, Miyai N, Utsumi M, Oka M, Hayashida M, Kinoshita K, Arita M, Takeshita T, Relationships of alcohol dehydrogenase 1B (ADH1B) and aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) genotypes with alcohol sensitivity, drinking behavior and problem drinking in Japanese older men, *Environ Health Prev Med*, 査読あり, 2016, 21, 138-148.

DOI: 10.1007/s12199-016-0507-5.

Mure K, Yoshimura N, Hashimoto M, Muraki S, Oka H, Tanaka S, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T, Takeshita T, Urinary 8-iso-prostaglandin F2α as a marker of metabolic risks in the general Japanese population: The ROAD study. *Obesity (Silver Spring)*, 査読あり, 23, 2015, 1517-1524.

DOI: 10.1002/oby.21130

Takahashi M, Miyai N, Nagano S, Utsumi M, Oka M, Yamamoto M, Shiba M, Uematsu Y, Nishimura Y, Takeshita T, Arita M, Orthostatic Blood Pressure Changes and Subclinical Markers of Atherosclerosis, *Am J Hypertens*, 査読あり, 2015, 28, 1134-1140.

DOI: 10.1093/ajh/hpu301.

Yoshimasu K, Mure K, Hashimoto M, Takemura S, Tsuno K, Hayashida M, Kinoshita K, Takeshita T, Miyashita K, Genetic alcohol sensitivity regulated by ALDH2 and ADH1B polymorphisms is strongly associated with depression and anxiety in Japanese employees, *Drug Alcohol Depend*, 査読あり, 2015, 1, 147, 130-136.

DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2014.11.034.

Yoshimasu K, Mure K, Hashimoto M, Takemura S, Tsuno K, Hayashida M, Kinoshita K, Takeshita T, Miyashita K, Genetic alcohol sensitivity regulated by ALDH2 and ADH1B polymorphisms as indicator of mental disorders in Japanese employees, *Alcohol Alcohol*, 査読あり, 2015, 50, 39-45.

DOI: 10.1093/alcalc/agu080.

Maeda S, Mure K, Mugitani K, Watanabe Y, Iwane M, Mohara O, Takeshita T, Roles of the ALDH2 and ADH1B genotypes on the association between alcohol intake and serum adiponectin levels among Japanese male workers, *Alcohol Clin Exp Res*, 査読あり, 2014, 38, 1559-1566.

DOI: 10.1111/acer.12406.

Mure K, Maeda S, Mukoubayashi C, Mugitani K, Iwane M, Kinoshita F, Mohara O, Takeshita T, Habitual coffee consumption inversely associated with metabolic syndrome- related biomarkers involving adiponectin, Nutrition, 査読あり, 2013, 29, 982-987.
DOI: 10.1016/j.nut.2013.01.011.

[学会発表] (計 12 件)

島袋美絵, 牟礼佳苗, 竹下達也, 服部園美, 宮井信行, 内海みよ子, 上松右二, 有田幹雄, Lp-PLA2 遺伝子 V279F 多型が血中脂質および動脈硬化指標に及ぼす影響, 第 86 回日本衛生学会学術総会, 2016 年 5 月 12 日, 旭川市民文化会館(北海道, 旭川市)

牟礼佳苗, 竹下達也, 服部園美, 内海みよ子, 有田幹雄, 不飽和脂肪酸および塩分摂取が eNOS Glu298Asp 多型と血圧および動脈硬化指標の関連に与える影響, 第 38 回日本高血圧学会総会, 2015 年 10 月 9 日, 愛媛県県民文化会館ひめぎんホール(愛媛県, 松山市)

牟礼佳苗, 竹下達也, 岡檀, 宮井信行, 内海みよ子, 有田幹雄, アルコール代謝関連遺伝子型と血圧, 第 38 回日本高血圧学会総会, 2015 年 10 月 9 日, 愛媛県県民文化会館ひめぎんホール(愛媛県, 松山市)

Mure K, Oka M, Buyou M, Hattori S, Iwahara A, Miyai N, Utsumi M, Uematsu Y, Shiba M, Takeshita T, Arita M, Influences of endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp polymorphism on blood pressure and atherosclerosis indices in association with unsaturated fatty acid and sodium intake, 25th European Meeting on Hypertension Cardiovascular Protection, 2016 年 6 月 12 日, ミラノ(イタリア)

牟礼佳苗, 竹下達也, 血中および尿中 exosome 内包 miRNA と酸化ストレスマーカーとの関連性について, がん予防学術大会 2015, 2015 年 6 月 5 日, ラフレ埼玉(埼玉県, さいたま市)

牟礼佳苗, 橋本磨和, 渡部益隆, 岡檀, 服部園美, 宮井信行, 内海みよ子, 有田幹雄, 竹下達也, eNOS 遺伝子多型が塩分と血圧・動脈硬化指標との関連に与える影響, 第 85 回日本衛生学会学術総会, 2015 年 3 月 27 日, 和歌山県民文化会館(和歌山県, 和歌山市)

渡部益隆, 牟礼佳苗, 橋本磨和, 服部園美,

宮井信行, 内海みよ子, 上松右二, 有田幹雄, 竹下達也, PPARG 遺伝子多型が加齢に伴う疾患に関する指標に与える影響, 第 85 回日本衛生学会学術総会, 2015 年 3 月 27 日, 和歌山県民文化会館(和歌山県, 和歌山市)

牟礼佳苗, 有田幹雄, 竹下達也, 地域コホートにおける Nutrigenetics 研究-eNOS 遺伝子多型と不飽和脂肪酸, 第 14 回分子予防環境医学研究会, 2015 年 2 月 13 日, 大阪市立大学医学部(大阪府, 大阪市)

渡部益隆, 牟礼佳苗, 橋本磨和, 服部園美, 宮井信行, 内海みよ子, 上松右二, 有田幹雄, 竹下達也, 後期高齢者における PPARG 遺伝子型と尿中イソプロスタニンおよび炎症性マーカーとの関連, 第 84 回日本衛生学会学術総会, 2014 年 5 月 26 日, 岡山コンベンションセンター(岡山県, 岡山市)

橋本磨和, 牟礼佳苗, 服部園美, 宮井信行, 内海みよ子, 有田幹雄, 竹下達也, 日本人における eNOS の T-786C 遺伝子型と動脈硬化の関連性, 第 84 回日本衛生学会学術総会, 2014 年 5 月 27 日, 岡山コンベンションセンター(岡山県, 岡山市)

牟礼佳苗, 橋本磨和, 渡部益隆, 服部園美, 上松右二, 有田幹雄, 竹下達也, 尿中エクソソームおよび内包 miRNA のバイオマーカーとしての可能性, 第 13 回日本分子予防環境医学研究会, 2014 年 1 月 31 日, 和歌山県民文化会館(和歌山県, 和歌山市)

橋本磨和, 牟礼佳苗, 竹下達也, eNOS のプロモーター活性に対するエストロゲンの影響, 第 13 回日本分子予防環境医学研究会, 2014 年 1 月 31 日, 和歌山県民文化会館(和歌山県, 和歌山市)

[図書] (計 1 件)

牟礼佳苗, 創元社, ストレス学ハンドブック, 2015, 15-23.

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牟礼 佳苗 (MURE, Kanae)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号:90268491

(2) 研究分担者

竹下達也 (TAKESHITA, Tatsuya)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号:20150310