

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462758

研究課題名(和文) マイクロRNAを標的とした新しい心筋保護治療の構築

研究課題名(英文) A new strategy targeting microRNAs for cardiac protection against ischemia/reperfusion injury

研究代表者

手嶋 泰之(Teshima, Yasushi)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：10457608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はマイクロRNAを制御することにより虚血再灌流障害の軽減を図ること目的としている。マイクロRNA200cと141を培養心筋細胞内に増加させることにより活性酸素種が増加し、発現を抑制することにより活性酸素種量が減少した。これらのマイクロRNAはカタラーゼやスーパーオキシドディスムターゼなどの細胞内抗酸化酵素を抑制することにより酸化ストレスを増加させており虚血再灌流障害の治療標的となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present project aims to alleviate cardiac ischemia/reperfusion injury by modulating microRNAs. Reactive oxygen species (ROS) were increased by upregulating microRNA 200c and 141, and decreased by suppressing these microRNAs. We revealed that microRNA 200c and 141 increased ROS level by suppressing the activities of catalase and superoxide dismutase. We conclude that modulating these microRNAs may be a possible target against ischemia/reperfusion injury in the heart.

研究分野：循環器内科学

キーワード：マイクロRNA 虚血再灌流障害

1. 研究開始当初の背景

・虚血性心疾患は日本人の死亡原因の第二位であり益々増加傾向にある。我々はこれまで主にミトコンドリアにおけるエネルギー代謝に介入することにより、活性酸素種の産生を減少させ、心筋の虚血再灌流障害を軽減できるのではないかと、この仮説を基に研究を行ってきた(2012年業績 No.5、2011年業績 No.9、2010年業績 No.13)。

・近年、蛋白質をコードしていないマイクロRNAがメッセンジャーRNAの翻訳を制御し、細胞増殖や分化、アポトーシスなど重要な生物学的プロセスに作用することが明らかになった。さらに様々な心血管疾患へのマイクロRNAの関与も徐々に解明されつつあるが、マイクロRNAによる心疾患の治療については未だ臨床応用されたものはない。

・我々は、糖尿病における心筋での活性酸素種増加の機序を解明する研究の中で、マイクロRNA200cと141が心筋細胞における活性酸素種量を制御し得ることを新しく発見した。

・培養心筋細胞を用いた *in vitro* の実験にて Precursor microRNA (Pre-miR) を用いてマイクロRNA200cと141の発現を増加させることにより、心筋細胞における活性酸素種量が増加し、microRNA inhibitor (Anti-miR) により発現を抑制した場合、活性酸素種量が有意に減少した。

・これまでの我々の研究により、活性酸素消去作用を有するリポ酸誘導体による心筋保護効果について調べた結果、高い濃度を使用し、より強力に活性酸素種を減少させた場合よりも、低い濃度で中等度に活性酸素種を減少させた場合の方がより心筋保護効果が大きいことが判明した(2011年業績 No.10)。

また高脂血症治療薬であるスタチン製剤(プラバスタチン)は軽度に活性酸素種を増加させることにより細胞保護効果を惹起した(2010年業績 No.13)。いずれの結果も適量の活性酸素種は心保護的に作用しており、基礎レベルの活性酸素種量を維持することの重要性を示すものである。

・以上の知見をまとめると、

心筋の虚血再灌流時に生じる活性酸素種を抑制することは心筋保護につながる

ただし、基礎レベルの活性酸素種を消去しないことが重要である、ということを見出した。

・虚血再灌流障害を軽減する治療法として、再灌流時の急激な活性酸素種の増加を抑制し、なおかつ適量の活性酸素種を消去することなく維持できる方法が候補として

挙げられる。

・重要なポイントとして、マイクロRNA200cと141のそれぞれの阻害により活性酸素種量を各30~40%減少させ、両方を阻害した場合約70%減少させた点が挙げられる。つまり完全な活性酸素種の消去には至っておらず、この点が基礎レベルの活性酸素種量を維持することにつながり、心筋細胞の機能維持と心保護において重要と考える。

2. 研究の目的

救急医療において虚血性心疾患は主要な死因の一つであり、その克服は喫緊の課題である。虚血再灌流障害を軽減する方法に関して、これまでに多くの研究結果が発表されているにもかかわらず未だ臨床応用には至っていない。私共はこれまで心筋における活性酸素種を制御することにより虚血再灌流障害を軽減できること(2010年業績 No.13、2012年業績 No.5)、マイクロRNA200cと141が心筋における活性酸素種量を制御していること(基盤研究(C)H22~24年度;論文投稿中)を発見し報告してきた。本研究では、これまでに得た知見を基に、マイクロRNA200cと141を抑制することにより虚血再灌流障害を軽減できるか検討したい。さらにその機序として、マイクロRNA200cと141の標的遺伝子が何か、虚血再灌流時に発生する多量の活性酸素種をどのように抑制するか、について明らかにしたい。

3. 研究の方法

マイクロRNA200cとマイクロRNA141の標的遺伝子を明らかにし、活性酸素種を軽減させる作用機序を解明する。

動物モデルにカテーテルを用いて経静脈的にマイクロRNA inhibitorを導入し心筋内の活性酸素種量を評価する。

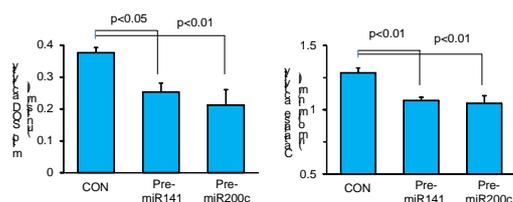
ラットの冠動脈を結紮することにより心筋梗塞モデルを作製し、マイクロRNA inhibitorの導入により再灌流障害が軽減するか検討する。

マイクロRNA200c、マイクロRNA141それぞれ単独で阻害した場合と両方を同時に阻害した場合において心保護効果にどの程度の違いを生じるか検討する。その結果を踏まえ、最も作用効率の高い方法を見出す。

4. 研究成果

虚血再灌流障害を軽減する方法に関して、これまでに多くの研究結果が発表されているにもかかわらず未だ臨床応用には至っていない。本研究ではマイクロRNAを制御することにより虚血再灌流障害の軽減を図ること目的としている。我々はこれまでに血糖値変動が心筋に直接影響し、虚血再灌流障害に対してより脆弱になることを発見した。高グルコース濃度の培養液に暴露した心筋細胞では正常グルコース濃度にて培養した細胞よ

り心筋細胞内の活性酸素種量が有意に増加し、培養液グルコース濃度を変動させた細胞では活性酸素種量が有意に増加し、酸化ストレスに対しより脆弱になった。活性酸素種の指標である心筋内 malondialdehyde (MDA) は正常血糖群よりも糖尿病群、糖尿病群よりも血糖変動群で有意に増加していた。同様の結果は動物モデルを用いた実験においても認められ、心筋梗塞サイズが糖尿病群において正常血糖群に比し有意に大きく、さらに血糖変動群では糖尿病群よりもさらに拡大した。ミトコンドリアの形態変化では、糖尿病群と血糖変動群ではミトコンドリアが有意に膨化しており、さらに糖尿病群ではクリステ構造の破壊が認められたが、破壊像は血糖変動群でさらに顕著であった。糖尿病モデル動物の心筋にてマイクロ RNA200c とマイクロ RNA 141 が増加することも新たに発見した。以上の研究結果よりマイクロ RNA200c とマイクロ RNA 141 の発現増加が心筋細胞内における酸化ストレスの増加に関与することが示唆され、今回このマイクロ RNA を制御することにより虚血再灌流障害を軽減することができるのではないかと考えた。実際にマイクロ RNA200c と 141 を培養心筋細胞内に増加させることにより活性酸素種が増加し、さらにこれらのマイクロ RNA の発現を抑制することにより活性酸素種量が減少した。機序を解明するために細胞内抗酸化酵素活性について検討したところカタラーゼとスーパーオキシドディスムターゼの活性を抑制することが明らかになった。



さらにマイクロ RNA200c と 141 の標的遺伝子の解明を試みた。マイクロ RNA 標的検索アルゴリズムを用いて、マイクロ RNA とメッセンジャー RNA のシークエンスの相補的配列を利用して、標的 mRNA を推測し 2 つの遺伝子を抽出したところ Slc25a3 と Glrx1 が候補として抽出された。

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 3 件)

1) Saito S, Thuc LC, Teshima Y, Nakada C, Nishio S, Kondo H, Fukui A, Abe I, Ebata Y, Saikawa T, Moriyama M, Takahashi N. Glucose Fluctuations Aggravate Cardiac Susceptibility to Ischemia/Reperfusion Injury by Modulating MicroRNAs Expression.

Circ J.80(1):186-95, 2016. 査読あり

2) Kondo H, Takahashi N, Gotoh K, Fukui A, Saito S, Aoki K, Kume O, Shinohara T, Teshima Y, Saikawa T. Splenectomy exacerbates atrial inflammatory fibrosis and vulnerability to atrial fibrillation induced by pressure overload in rats: Possible role of spleen-derived interleukin-10. Heart Rhythm.13(1):241-50, 2016. 査読あり

3) Aoki K, Teshima Y, Kondo H, Saito S, Fukui A, Fukunaga N, Nawata T, Shimada T, Takahashi N, Shibata H. Role of Indoxyl Sulfate as a Predisposing Factor for Atrial Fibrillation in Renal Dysfunction. J Am Heart Assoc. 4(10):e002023,2015. 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

1) Sonoda Y, Teshima Y, Ikebe Y, Abe I, Yufu K, Shimada T, Miyamoto S, Takahashi N Microstructural Features of Atrial Appendage in Patients with Atrial Fibrillation. 第 81 回日本循環器学会総会学術集会 3.17-19,2017. ホテル日航金沢 (石川県金沢市)

2) Ikebe Y, Teshima Y, Sonoda Y, Abe I, Yufu K, Shimada T, Miyamoto S, Takahashi N Glucose Fluctuations Impair Cardiac Sinus Node Function in Diabetic Animal Models. 第 81 回日本循環器学会総会学術集会 3.17-19,2017. ホテル日航金沢 (石川県金沢市)

3) Sonoda Y, Abe I, Teshima Y, Ikebe Y, Yufu K, Shimada T, Miyamoto S, Takahashi N Histological Analyses of Left Atrium in Patients with Atrial Fibrillation. 第 80 回日本循環器学会総会学術集会 3.22-24,2016. 仙台国際センター (宮城県仙台市)

4) Saito S, Teshima Y, Abe I, Ikebe Y, Kondo K, Nishio S, Yufu K, Takahashi N Glucose Fluctuations Aggravate Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Type 2 Diabetic Rats 第 79 回日本循環器学会総会学術集会 4.24-26,2015. 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

5) Abe I, Teshima Y, Ikebe Y, Kondo K, Saito S, Yufu K, Takahashi N Deletion of Ghrelin exacerbates high fat diet-induced atrial remodeling and fibrillation 第 32 回 ISHR 日本部会総会 12.10-12,2015. 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

〔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〕

Circulation Journal Awards 2016

優秀論文賞受賞

Saito S, Thuc LC, Teshima Y, Nakada C,
Nishio S, Kondo H, Fukui A, Abe I, Ebata
Y, Saikawa T, Moriyama M, Takahashi N.
Glucose Fluctuations Aggravate Cardiac
Susceptibility to Ischemia/Reperfusion
Injury by Modulating MicroRNAs Expression.
Circ J.80(1):186-95, 2016.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

手嶋 泰之 (Teshima Yasushi)
大分大学・医学部・講師
研究者番号：10457608

(2) 研究分担者

高橋 尚彦 (Takahashi Naohiko)
大分大学・医学部・教授
研究者番号：30263239

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

斉藤 聖多郎 (Saito Shotaro)
西尾 諭 (Nishio Satoru)