

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860567

研究課題名(和文) 血管老化におけるレニン・アンジオテンシン系とmicroRNAの関連についての検討

研究課題名(英文) Interaction of Renin-Angiotensin System with microRNA in Vascular Senescence

研究代表者

関 莉娟 (Min, Li-Juan)

愛媛大学・医学部附属病院・助教(病院教員)

研究者番号：80726175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：In vitro、microRNA-21がターゲット分子の発現を抑制することにより、angiotensin II 刺激したVSMCの老化に関与していることが認められたが、今回In vivoで同様な結果が得られなかった。将来、別の老化血管モデルマウスを用いて、さらにmicroRNA-21と血管老化の関係を検討する必要があると考えられる。今回microRNA-21のターゲット遺伝子Spry1の関与は認められなかったため、将来、別のターゲット遺伝子例えばSp-1の役割について調べる必要があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We examined the possible role of microRNA-21, which involved in Ras/ERK signaling pathway and its target gene Spry1, in angiotensin II-induced vascular senescence. In vitro, we observed that microRNA-21 was associated with angiotensin II-induced VSMC senescence together with its downstream target molecule. In vivo, we did not obtain the same results in this time. In future, it is necessary to investigate the interaction of microRNA-21 with vascular senescence using other senescent mouse models. We have not yet observed the possible involvement of Spry1 in the microRNA-21 associated VSMC senescence. In future, the examination of other molecules such as Sp-1 is needed.

研究分野：血管老化の制御機構、

キーワード：動脈硬化 血管老化 レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系 microRNA-21 Ras/MAPK シグナル
血管平滑筋細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 先進国社会の急激な高齢化を背景に、老化に伴う臓器障害を如何に防止するかは、高齢者の生活の質の向上のために注目されている。特に血管の老化は様々な臓器障害の基礎となることから、血管細胞における老化機構の解明が注目されている。最近、ヒトにおける動脈硬化巣では老化血管平滑筋細胞が存在し、動脈硬化などの加齢性の血管病の発症・進展に血管平滑筋細胞の老化が影響を与えていると考えられる。

(2) 血圧調節ホルモンであるレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系 (RAAS) は、心臓・血管・脳・腎などの主要臓器の病態生理に深く関わっていることが明らかにされてきている。RAAS の阻害剤であるアンジオテンシン (Ang) II 受容体ブロッカー (ARB) は、広く降圧剤として用いられているが、心血管病保護薬としても使用されている。Ang II は RAAS の中心的な役割を持つ物質であり 2 種類の受容体が存在する。1 型受容体 (AT1) 刺激は高血圧や臓器障害を誘導する悪玉として、2 型受容体 (AT2) は AT1 に拮抗する作用や独自の組織保護作用を持つ善玉として働くと考えられている。Ang II は細胞の老化に関与していることが知られてきている。我々は血管平滑筋細胞を用いて、血管の老化における RAAS の影響について検討してきた。Ang II とアルドステロン (Aldo) によって誘導される血管平滑筋細胞の老化のメカニズムにおいて、RAAS は Ki-ras2A を上昇させ CDKI を増強して老化を引き起こす機構に密接に関連していることを見出した。一方、我々は AT2 受容体の活性化が AT1 受容体を介したシグナルを抑制すること、DNA 修復因子 MMS2 を介した DNA 傷害の抑制作用によって血管平滑筋細胞の老化を抑制する可能性を報告した。また、AT1 受容体結合性タンパク、ATRAP 及び AT2 受容体関連タンパク、ATIP も、ともに血管老化を抑制することも報告した。これらのことから、血管老化のメカニズムにおいて RAAS が深く関与していることが示唆される。

(3) microRNA は細胞の発生、分化、増殖、がん化およびアポトーシスなどの細胞機能の根幹に関わっていることが知られている。microRNA の機能は遺伝子発現の抑制にあるが、細胞増殖シグナルなどのストレスが続くと microRNA が増えて、ストレスに対抗する可能性が示唆されている。例えば、Thum らは、microRNA-21 が Spry1 を抑制することにより、MAPK シグナルを活性化し、線維化細胞の増殖を促進することを報告した。

2. 研究の目的

こうした報告や血管平滑筋細胞の老化における RAAS の影響に、Ras/ERK/CDKI シグナルパスウェイが深く関与しているというこれまでの私たちの検討から、血管平滑筋細胞の老化において、Ras/ERK 系に関与する microRNA-21 およびそのターゲット遺伝子で

ある Spry1 などが、血管老化にも関係する可能性を想起し、本研究では、RAAS と血管の老化における microRNA の関与について検討する。

3. 研究の方法

(1) in vitro、まず Ang II 連日刺激して老化した血管平滑筋細胞で Argonaute2 結合性 microRNA 精製キットで microRNA を抽出し、Clustering analysis で microRNA の増加を確認する。

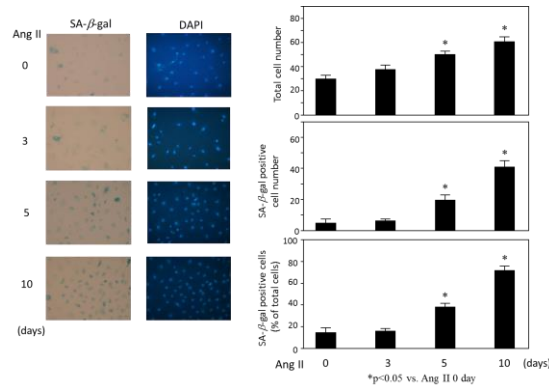


図1. SA-β-gal 染色による Ang II 刺激により VSMC の老化細胞数の増加 (unpublished data)。

(2) microRNA-21 の発現の量は RT-qPCR 法で測定する。

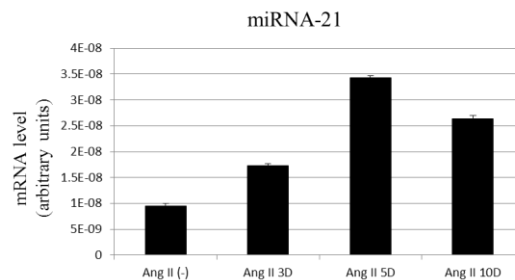


図2. RT-qPCR 法による Ang II 刺激により VSMC の microRNA-21 発現の増加傾向 (unpublished data)。

(3) さらに、microRNA-21-siRNA を血管平滑筋細胞にトランスフェクションして、血管平滑筋細胞の老化やシグナルについて SA-beta-gal 染色法、Western blotting 法、dihydroethidium 染色法などを用いて検討する。

(4) In vivo で、放射線照射を受けたマウスや、大腿動脈へのカフ留置されたマウスなど老化血管モデルを用いて、血管における microRNA の増加を確認する。

(5) 血管 microRNA-21 の発現量の測定を in vitro と同様に行う。

(6) 放射線照射マウスや、カフ留置マウスに microRNA-21-siRNA をトランスフェクションして、血管老化が抑制されるかどうかについても検討する。

(7) microRNA-21-ノックアウトマウスの作成も検討する。

(8) さらに RAAS 阻害剤 (ARB) をマウスに投

与して、microRNA-21 の発現への影響について検討する。

4. 研究成果

(1) In vitro 実験、C57BL/6J マウスの胸部大動脈から血管平滑筋細胞を用いて、細胞老化を検討したところ、Ang II (10^{-7} M) で 10 日間連日刺激により時間依存性に老化細胞数やその割合が増強したことが認められた。

(2) Ang II (10^{-7} M) で 10 日間連日刺激した血管平滑筋細胞の microRNA 発現量を調べたところ、microRNA-21 の発現は Ang II 刺激により時間依存性に増加したことが認められた。

(3) microRNA-21 のターゲット遺伝子 Spry1 の抑制を検討したところ、Western blotting 法で Ang II 10 日間の連日刺激により Spry1 発現の変化は認められなかった。

(4) microRNA-21 が血管平滑筋細胞の老化に関与するかを検討したところ、microRNA-21-siRNA トランスフェクションした細胞において、コントロール細胞と比較して Ang II 刺激により老化細胞数は変化しなかった。

(5) In vivo 実験、10 Gy の X 線を C57BL/6 マウスに全身照射し、胸部大動脈血管の老化を誘導したが、血管 microRNA-21 の発現の増加が認められなかった。

(6) 以上より、In vitro、microRNA-21 がターゲット分子の発現を抑制することにより、Ang II 刺激した VSMC の老化に関与していることが考えられたが、今回 In vivo で同様な結果が得られなかった。将来、別の老化血管モデルマウスを用いて、さらに microRNA-21 と血管老化の関係を検討する必要があると考えられる。今回 microRNA-21 のターゲット遺伝子 Spry1 の関与は認められなかったので、将来、別のターゲット遺伝子例えば Sp-1 の役割について調べる必要があると考えられる。

<引用文献>

(1) Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliensky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JT, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. Nature. 456 巻、2008 年、980-984

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) Kukida M, Mogi M, Ohshima K, Nakaoka H, Iwanami J, Kanno H, Tsukuda K, Chisaka T, Min LJ, Wang XL, Bai HY, Shan BS, Higaki A, Yamauchi T, Okura T, Higaki J, Horiuchi M. Angiotensin II Type 2 Receptor Inhibits Vascular Intimal Proliferation With Activation of PPAR γ . Am J Hypertens. 査読有、(in press) 2015 年.

[学会発表] (計 3 件)

(1) 関莉娟、浅山理恵、大西亜里香、茂木正樹、中岡裕智、菅野晴美、佃架奈、莖田昌敬、山内俊史、檜垣彰典、王小俐、白蒼鈺、単宝帥、岩波純、堀内正嗣、柑橘ジュース飲用により血管リモデリングが抑制される、第 38 回日本高血圧学会総会、2015 年 10 月 9 日～11 日、愛媛県松山市、ひめぎんホール

(2) 莖田昌敬、茂木正樹、中岡裕智、檜垣彰典、単宝帥、白蒼鈺、菅野晴美、佃架奈、王小俐、関莉娟、岩波純、大蔵隆文、檜垣實男、堀内正嗣、アンジオテンシン II2 型受容体刺激は一部 ATIP を介した PPAR-gamma の活性化により血管リモデリングを抑制する、第 38 回日本高血圧学会総会、2015 年 10 月 9 日～11 日、愛媛県松山市、ひめぎんホール

(3) 山内俊史、茂木正樹、千阪俊行、中岡裕智、莖田昌敬、菅野晴美、佃架奈、王小俐、白蒼鈺、単宝帥、関莉娟、岩波純、檜垣高史、堀内正嗣、子宮内胎児発育遅延は血管リモデリングを促進させるリスクとなる、第 38 回日本高血圧学会総会、2015 年 10 月 9 日～11 日、愛媛県松山市、ひめぎんホール

[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]

ホームページ等

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/biochem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

閔 莉娟 (MIN, Li-Juan)

愛媛大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80726175

(2) 研究分担者

堀内 正嗣 (HORIUCHI, Masatsugu)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40150338

茂木 正樹 (MOGI, Masaki)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20363236