

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461131

研究課題名(和文) 脂肪細胞由来のマイクロRNAを介した血管リモデリング制御機構の解析

研究課題名(英文) microRNA released from adipose cells regulate vascular remodeling

研究代表者

八木 秀介 (YAGI, Shusuke)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号：00507650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：血管周囲脂肪細胞が種々の血管作動性物質を産生・分泌する内分泌器官として働き、血管での慢性炎症の発生・進展に重要な役割を果たす。マイクロRNAはさまざま細胞において遺伝子発現を制御するが、近年マイクロRNAが異なった細胞間で移動し、遺伝子発現を制御することが知られるようになった。我々は脂肪細胞から分泌されるmiR100が血管平滑筋に作用し、mTORを標的し、その遺伝子発現を抑制することで細胞増殖を制御する可能性があることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Perivascular fat produces various vasoactive substances and exerts important rolls in vascular chronic inflammation and vascular remodeling. It is known that microRNAs released from cells enter another cells to regulate gene expression. In this study, we showed that miR-100 released from adipose cells regulates mTOR in smooth muscle cells, indicating that miRNA regulates cell proliferation.

研究分野：循環器内科

キーワード：マイクロRNA 脂肪細胞

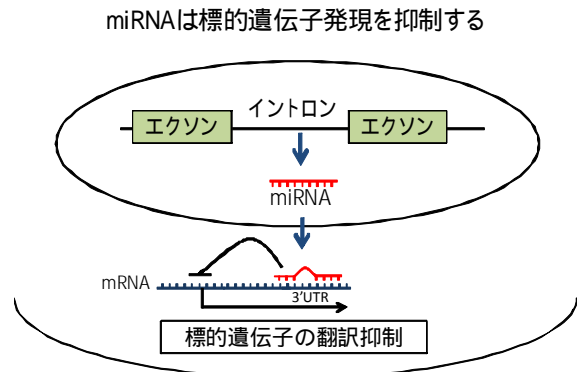
1. 研究開始当初の背景

動脈硬化性疾患は、血管の慢性炎症であるという概念が動物実験や臨床試験により確立されてきた。レニン・アンジオテンシン系の活性化などから、内皮細胞機能不全、酸化ストレス増加が血管炎症を誘発し動脈硬化病変が形成される。アンジオテンシン II 受容体拮抗薬やスタチンなどにより、血圧低下や脂質改善作用のみならずそれらの多面的作用により動脈硬化病変抑制作用が期待されているが、これらの薬剤効果は限局的であり、動脈硬化性病変を十分には抑制できない。また薬物溶出ステントの出現を含めた冠動脈形成術の技術の進歩により冠動脈狭窄の問題は改善されつつあるが、ステント挿入による冠動脈内局所炎症、遅発性ステント内血栓症などの問題が残存している。局所炎症は血管平滑筋や線維芽細胞において肥大や増殖を誘導し血管のリモデリングを引き起こし冠動脈ステント内狭窄にも関連する。これは現在の局所治療である冠動脈形成術のみでは、心血管病発症抑制には不十分であることを示唆する。したがって全く新しい概念による平滑筋細胞増殖抑制による動脈硬化性疾患予防の戦略が求められている。

2. 研究の目的

我々は、血管周囲脂肪細胞が種々の血管作動性物質を産生・分泌する内分泌器官として働き、血管での慢性炎症の発生・進展に重要な役割を果たすことをこれまでに明らかにしてきた。また、血管内皮細胞から分泌されるマイクロ RNA(miRNA)が血管平滑筋に移動し、その酸化ストレスを制御することを見いだしている。従って脂肪細胞から分泌される miRNA が血管平滑筋に作用し血管炎症や細胞増殖を制御する可能性がある。本研究の目的は、miRNA を用いた

新しい動脈硬化病変治療法の基盤となり得る、脂肪細胞から分泌される miR-100 の血管平滑筋における作用を明らかにすることである。



3. 研究の方法

(1)脂肪細胞から miR-100 が分泌されるかどうかを明らかにする。

まず脂肪細胞には豊富に miR-100 が存在することを PCR にて確認する。次にこの脂肪細胞中の miR-100 が培養液中に分泌されるかどうかを脂肪細胞培養液を培養前後で PCR を行い確認する。

(2)脂肪細胞由来の miR-100 の血管平滑筋細胞における標的遺伝子を明らかにする。

miR-100 の標的分子の一つが mTOR であることが報告されている。我々も miR-100 の標的分子が mTOR であることをコンピュータプログラム(TargetScan)で確認しており、実際に mTOR が標的であるかどうかを調べるために miR-100 を血管平滑筋に投与し mTOR が抑制されるかどうか、またアンチセンスオリゴヌクレオチドを血管平滑筋に投与し mTOR の抑制が解除されるかどうかをウエスタンブロッティングにて調べる。

(3)脂肪細胞から分泌された miR-100 が血管平滑筋に進入するか明らかにする。

細胞培養液中に存在する miR-100 が血管平滑筋細胞内に進入するかどうかを検討するために脂肪細胞を培養した培養液を血管平

滑筋と培養し、平滑筋のmTOR が抑制されるかどうかウエスタンブロッティングにて調べる。

(4)脂肪細胞由来の miR-100 の血管平滑筋細胞における作用を明らかにする。

血管平滑筋細胞における mTOR 抑制がどのような機能を発揮するのかを調べる。mTOR の発現抑制は血管平滑筋細胞を増殖サイクルから休止期に誘導する。したがって、miR-100 による mTOR 発現抑制は、血管平滑筋の増殖を抑制することが予測できる。miR-100 もしくは脂肪細胞からの培養液を血管平滑筋に投与し、細胞数の変化を評価する。

4 . 研究成果

(1)脂肪細胞から miR-100 は培養液中に分泌される。

まず脂肪細胞には豊富に miR-100 が存在することを PCR にて確認した。次にその脂肪細胞の培養液を回収し PCR を行い miR-100 が培養液中に増加していることを確認した。これは脂肪細胞から miR-100 が分泌されたこと示唆する。

(2)脂肪細胞由来の miR-100 は血管平滑筋細胞において mTOR を標的遺伝子とする。

合成された miR-100 を血管平滑筋にトランスフェクションすると mTOR の発現が抑制されることをウエスタンブロッティングにて確認した。またアンチセンスオリゴヌクレオチドを血管平滑筋細胞に投与すると mTOR の抑制が解除されることを確認した。これにより mTOR は miR-100 の標的遺伝子であることが示された。

(3)脂肪細胞から分泌された miR-100 は血管平滑筋に進入する。

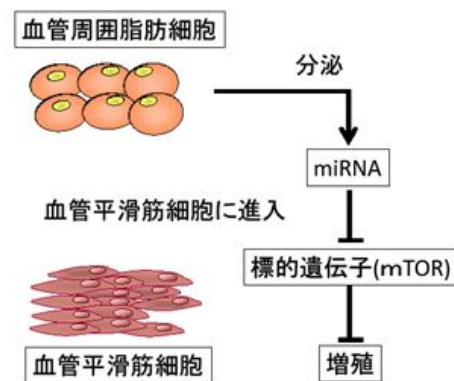
脂肪細胞を培養した培養液を血管平滑筋に投与すると血管平滑筋の mTOR が抑制されることが明らかとなった。このことは脂肪細胞から分泌された miR-100 が血管平滑筋に侵入し標的遺伝子である mTOR を抑制したと考えられた。

(4)脂肪細胞由来の miR-100 は血管平滑筋

細胞の増殖を抑制する。

合成 miR-100 もしくは脂肪細胞からの培養液を血管平滑筋に投与すると、細胞増殖が抑制されることを確認した。

これらの結果は血管周囲の脂肪細胞から分泌される miR-100 を介して血管リモデリングを抑制していることを示唆する。今後動物実験にて *in vivo* において脂肪由来の miR-100 の血管平滑筋に対する効果を確かめる必要がある。



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 4 件)

Soeki T, Yagi S, et al.
Relationship between Local Production of MicroRNA-328 and Atrial Substrate Remodeling in Atrial Fibrillation. J Cardiol. 2016 in press. (査読あり)

Soeki T, Yagi S, et al.
Plasma microRNA-100 is associated with coronary plaque vulnerability. Circ J. 2015;79:413-418.(査読あり)

Ishida M, Yagi S, et al.
MicroRNA-378 regulates adiponectin expression in adipose tissue: A new plausible mechanism. PLoS One. 2014;9:e111537. (査読あり)

Yagi S, et al.
Association of lower limb muscle mass and energy expenditure with visceral fat mass in healthy men. Diabetol Metab Syndr. 2014 26;6(1):27. (査読あり)

【学会発表】(計 2件)

Shimabukuro M, Yagi S, *et al.*
Post-transcriptional regulation of adiponectin
by microRNA-378 in adipose tissue: a novel
mechanism for hypoadiponectinemia, ESC
Congress 2014, Barcelona, Spain, 29 Aug - 3
Sep 2014

Ishida M, Yagi S, et al.
Post-Transcriptional Regulation of
Adiponectin by Micro-RNA 378 in Human
Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue.
AHA Scientific Sessions 2013, Dallas,
America, November 16-20, 2013

6 . 研究組織

(1)研究代表者

八木 秀介 (YAGI, Shusuke)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：00507650

(2)研究分担者

佐田 政隆 (SATA, Masataka)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：80345214

石田 昌義 (ISHIDA, Masayoshi)
琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助
教
研究者番号：50643251