

令和元年6月6日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09490

研究課題名(和文) 大動脈弁狭窄症の発症抑制を目指したmicroRNA解析

研究課題名(英文) Therapeutic inhibition of microRNA-34a ameliorates aortic valve calcification via modulation of Notch1-Runx2 signaling

研究代表者

渡邊 哲 (WATANABE, Tetsu)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：40359568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：石灰化大動脈弁狭窄症患者の大動脈弁で、複数のmicroRNA(miR)の発現が亢進していた。我々はmiR-34aに注目し動物実験を行った。ワイヤー傷害大動脈弁狭窄症マウスに、miR-34a阻害薬を投与すると、大動脈弁石灰化が抑制された。大動脈弁間質細胞でmiR-34aを抑制すると、石灰化誘導刺激下のNotch1低下が抑制され、Runx2の活性化と石灰化が抑制された。miR-34aは石灰化大動脈弁狭窄症の新たな治療標的になる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト大動脈弁組織、ブタ大動脈弁間質細胞、ワイヤー傷害大動脈弁狭窄症マウスを用い、大動脈弁狭窄症の進展に深く関わるmiRの役割について検討した。先天性二尖弁は三尖に比べ、大動脈弁狭窄症の進行が速いが、これには組織反応障害仮説の関与が示唆される。既に癌治療の分野では、miRNAを用いた臨床試験が始まっている。またmiRsはバイオマーカーとしての応用も行われている。大動脈弁石灰化に密接に関わるmiRNAの同定は、ハイリスク患者の早期発見および治療介入に臨床応用できる可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Expression of microRNA(miR)-23a, miR-34a, miR-34c, miR-133a, miR-146a, and miR-155 was increased, and expression of miR-27a and miR-204a was decreased in valve tissues from calcific aortic valve stenosis(CAVS) compared with those from aortic regurgitation(AR). Expression of Notch1 was decreased, and expression of Runt-related transcription factor 2(Runx2) was increased in patients with CAVS compared with those with AR. We selected miR-34a among increased miRs in porcine aortic valve interstitial cells(AVICs) after osteogenic treatment. Inhibition of miR-34a significantly attenuated the calcification signals in AVICs compared with miR-control. In wire injury CAVS mice, locked nucleic acid miR-34a inhibitor suppressed aortic velocity, calcium deposition of aortic valves, and cardiac hypertrophy, which were involved in decreased Runx2 and increased Notch1 expressions.

研究分野：循環器内科学

キーワード：石灰化大動脈弁狭窄症 micro RNA Notch1 Runx2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

欧米では75歳以上の一般住民における大動脈弁狭窄症(AS)の有病率は12.4%で、うち重症ASは3.4%と頻度の高い疾患である。ASは高血圧、糖尿病、脂質異常症など危険因子が動脈硬化疾患と共通するが、強力なコレステロール低下療法はASの進展および予後を改善しないことが報告され、有効な薬物療法は未だ確立していない。また半数のAS患者では動脈硬化疾患を合併していない。

ASの初期段階では、大動脈弁石灰化とカスプ肥厚を生じるが、流出路狭窄は起こさない。65歳以上の20-30%、85歳以上の48%で大動脈弁石灰化が認められ、5年で約9%の人がASに進展すると報告されている。また先天性二尖弁は人口の1-2%に見られ、ASの主要な発症要因とされ、大動脈弁が三尖の場合より、10-20年早く、ASを発症するとされている(JACC 2008;51:1327-1336)。

手術適応の重症ASの5年生存率は15-50%と予後不良である。近年、経カテーテル大動脈弁置換術(TAVR)が日本でも施行可能となったが、外科的大動脈弁置換術(SAVR)に比べ5倍程度コストが高く、適応の拡大とともに医療経済を圧迫することが懸念される。心臓超音波検査などにより、大動脈弁石灰化は容易にスクリーニングが可能であることより、無症候な大動脈弁石灰化症例に対して、AS進展抑制に有効な薬物療法の開発が待たれる。

2. 研究の目的

これまでの石灰化ASマウスモデルは、動脈硬化マウスに数か月の高脂肪食負荷を与えるものが一般的であったが、実際に大動脈弁圧較差を伴う石灰化ASを呈するのは一部のマウスのみであった。ASの重要な原因の一つとして、弁の開閉に伴う機械的損傷や動脈硬化因子による弁組織の内膜障害が知られている。動脈硬化と同様にresponse to tissue injury仮説が注目されている(Cardiovasc Pathol 2011;20:183-190, Cardiovasc Pathol 2002;11:69-77)。大動脈弁間質細胞は最も多い弁の構成細胞であり、傷害を受け活性化すると筋線維芽細胞様に分化する。過剰なりモデリング、癒着化、石灰沈着が生じ、弁尖やカスプが破壊される。これまでin vitroやex vivoでの機械的傷害に対する組織修復についての研究がなされてきたが、これらのモデルは生理的な血流や血液が欠如しているという問題があった。そこで我々は、ワイヤー傷害ASモデルを開発した。このモデルでは、ほぼ全例で大動脈弁逆流(AR)なしに著明な大動脈弁圧較差上昇と、遠隔期に弁尖の石灰沈着が観察された。

近年、心血管の発症および心血管疾患の発症にmicroRNA(miR)が重要な役割を果たすことが明らかになってきた。miRは、ゲノム上にコードされた21-25塩基長のノンコーディング1本鎖RNAで、標的mRNAの翻訳を転写後レベルで抑制する。本研究では、ASに関係するmiRを明らかにするとともに、in vitroおよびin vivo実験により、miRがAS進展に果たす役割を検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト大動脈弁組織を用いた検討

倫理委員会に申請の上、ASおよびAR患者から同意を得て、AVR施行時に摘出した大動脈弁組織を研究目的に凍結保存している。

大動脈弁組織からRNAを抽出した後に、市販のキットによりmiRを精製し、real time PCRにより解析を行った。内在性コントロールにはRNU6Bを用いた。大動脈弁以外の組織で石灰化に関係すると報告されたmiRの中から、治療標的候補miRを選択した。

(2) ブタ大動脈弁間質細胞を用いた検討

ブタ大動脈弁を弁尖組織以外の組織を含まないように切り取り、大動脈側と左室側の内膜層を剥し取る。2mm角に切り培養し、増殖してきた大動脈弁間質細胞を継代し、実験に使用する。候補miR mimicまたはscramble controlを大動脈弁間質細胞にtransfectionし、石灰化誘導培地下に石灰化に関与するBMP2、Runx2、Notch1などの遺伝子発現に与える影響を検討した。

(3) ワイヤー傷害ASモデルを用いた検討

8-10週齢のC57/BL6雄マウスを用いて、ワイヤー傷害ASモデルを作成する。トリプロモエタノール腹腔投与(250 mg/kg)による麻醉下に、ヒト冠動脈形成術用ガイドワイヤー(径0.36mm)を、右総頸動脈を通して心臓超音波ガイド下に左室内に挿入し、ワイヤーをスライドおよびピンさせることで大動脈弁を選択的に傷害する。候補miRNAの影響を検討するために、miRNA inhibitorを大動脈弁障害術の1週間後より投与を開始する。隔週で腹腔内に投与する(JACC 2015; 65: 2526-37)。心臓超音波を用いて経時的に大動脈弁口流速および心機能を測定し、組織学的変化を4-16週間にわたり観察する。また、real time PCRおよび蛍光免疫染色法によって傷害弁の詳細な解析を行う。

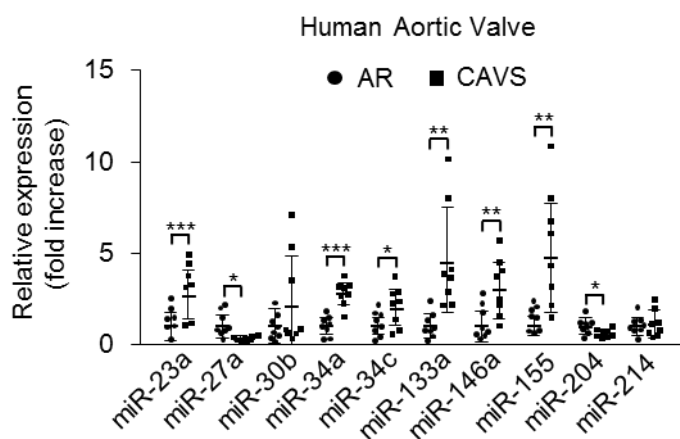
4. 研究成果

ヒト大動脈弁標本、ブタ大動脈弁間質細胞、ワイヤー傷害ASマウスを用いてASとmiRの関連について検討した。AS患者とAR患者の大動脈弁標本を用いて、石灰化への関与が報告されている10個のmiRの発現をqRT-PCRを用いて調べた。AS群においてmiR-23a, miR-34a, miR-34c,

miR-133a, miR-146a, miR-155 の発現が亢進し、miR-27a, miR-204a の発現が低下していた。AS 群では石灰化を促進する Runx2 の発現が亢進し、Runx2 の発現を抑制する Notch1 の発現が低下していた。miR-34a は Notch1 の発現を抑制することで、Runx2 の活性化を制御することが報告されていることから、miR-34a に注目し、以下の実験を行うこととした。

ブタ大動脈弁間質細胞を石灰化誘導培地で刺激すると、miR-34a の発現は有意に亢進した。また、Runx2 の発現は亢進し、Notch1 の mRNA の発現は低下した。ブタ大動脈弁間質細胞に miR-34a を過剰発現させたところ、Notch1 の発現が低下し、Runx2 の発現および石灰沈着が亢進した。miR-34a を抑制すると、Notch1 の発現が亢進し、Runx2 の発現および石灰沈着が抑制された。また Notch1 mRNA を用いたルシフェラーゼアッセイおよびプルダウンアッセイにより、ブタ大動脈弁間質細胞において miR-34a は Notch1 の発現を直接調節していることが示された。ワイヤー傷害 AS マウスへの Locked Nucleic Acid (LNA) miR-34a inhibitor の投与により、術後 8 週での大動脈弁の肥厚および石灰化が有意に抑制され、心肥大と左室収縮能が改善した。免疫染色では LNA miR-34a inhibitor の投与によりマウス大動脈弁の Runx2 の発現が低下しており、miR-34a の抑制は大動脈弁組織の石灰化を抑制することが示唆された。

miR-34a の抑制で AS の進展および病的な心臓リモデリングが抑制されたことより、miR-34a を標的とした治療は、AS に対する新たな治療戦略になることが示唆された。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 19 件)

Otaki Y, [Watanabe T](#), Konta T, Watanabe M, Fujimoto S, Sato Y, Asahi K, Yamagata K, Tsuruya K, Narita I, Kasahara M, Shibagaki Y, Iseki K, Moriyama T, Kondo M, Watanabe T. Effect of Hypertension on Aortic Artery Disease-Related Mortality - 3.8-Year Nationwide Community-Based Prospective Cohort Study. *Circ J*. 2018 Oct 25;82(11):2776-2782. 査読有

Sugai T, [Watanabe T](#), Otaki Y, Goto J, Watanabe K, Toshima T, Takahashi T, Yokoyama M, Tamura H, Nishiyama S, Arimoto T, Takahashi H, Shishido T, Watanabe M. Decreased Psoas Muscle Computed Tomography Value Predicts Poor Outcome in Peripheral Artery Disease. *Circ J*. 2018 Nov 24;82(12):3069-3075. 査読有

Takahashi T, Shishido T, Watanabe K, Sugai T, Toshima T, Kinoshita D, Yokoyama M, Tamura H, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Miyamoto T, [Watanabe T](#), Shibata Y, Konta T, Ueno Y, Kato T, Kayama T, Kubota I, Watanabe M. Ventricular wall stress and silent myocardial damage are associated with pulse pressure in the general population. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2018 Sep;20(9):1319-1326. 査読有

Watanabe K, Shishido T, Otaki Y, [Watanabe T](#), Sugai T, Toshima T, Takahashi T, Yokoyama M, Kinoshita D, Murase T, Nakamura T, Wanezaki M, Tamura H, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Yamauchi S, Yamanaka T, Miyamoto T, Kubota I, Watanabe M. Increased plasma xanthine oxidoreductase activity deteriorates coronary artery spasm. *Heart Vessels*. 2019 Jan;34(1):1-8. 査読有

Otaki Y, [Watanabe T](#), Takahashi H, Sugai T, Yokoyama M, Nishiyama S, Arimoto T, Shishido T, Miyamoto T, Yamanaka T, Kubota I, Watanabe M. Circulating Surfactant Protein-D Is Associated With Clinical Outcomes in Peripheral Artery Disease Patients Following Endovascular Therapy. *Circ J*. 2018 Jun 25;82(7):1926-1934. 査読有

Honda Y, [Watanabe T](#), Otaki Y, Tamura H, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Shishido T, Miyamoto T, Shibata Y, Kubota I. Impact of reduced forced expiratory volume on cardiac prognosis in patients with chronic heart failure. *Heart Vessels*. 2018 Sep;33(9):1037-1045. 査読有

Honda Y, [Watanabe T](#), Tamura H, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Shishido T, Miyamoto T, Shibata Y, Konta T, Kayama T, Kubota I. Presence of Myocardial Damage Predicts Future Development of Hypertension in a Normotensive Japanese General Population: The Yamagata (Takahata) Study. *Am J Hypertens*. 2018 Apr 13;31(5):549-556. [査読有](#)

Takahashi T, [Watanabe T](#), Shishido T, Watanabe K, Sugai T, Toshima T, Kinoshita D, Yokoyama M, Tamura H, Nishiyama S, Arimoto T, Takahashi H, Yamanaka T, Miyamoto T, Kubota I. The impact of non-alcoholic fatty liver disease fibrosis score on cardiac prognosis in patients with chronic heart failure. *Heart Vessels*. 2018 Jul;33(7):733-739. [査読有](#)

Yokoyama M, [Watanabe T](#), Otaki Y, Watanabe K, Toshima T, Sugai T, Takahashi T, Kinoshita D, Tamura H, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Shishido T, Yamauchi S, Yamanaka T, Miyamoto T, Kubota I. Impact of Objective Malnutrition Status on the Clinical Outcomes in Patients With Peripheral Artery Disease Following Endovascular Therapy. *Circ J*. 2018 Feb 23;82(3):847-856. [査読有](#)

Honda Y, [Watanabe T](#), Otaki Y, Tamura H, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Shishido T, Miyamoto T, Shibata Y, Konta T, Kawasaki R, Daimon M, Ueno Y, Kato T, Kayama T, Kubota I. Gender differences in the impact of anemia on subclinical myocardial damage and cardiovascular mortality in the general population: The Yamagata (Takahata) study. *Int J Cardiol*. 2018 Feb 1;252:207-212. [査読有](#)

Otaki Y, [Watanabe T](#), Kubota I. Heart-type fatty acid-binding protein in cardiovascular disease: A systemic review. *Clin Chim Acta*. 2017 Nov;474:44-53. [査読有](#)

[Watanabe T](#), Ando K, Daidoji H, Otaki Y, Sugawara S, Matsui M, Ikeno E, Hirono O, Miyawaki H, Yashiro Y, Nishiyama S, Arimoto T, Takahashi H, Shishido T, Miyashita T, Miyamoto T, Kubota I; CHERRY study investigators. A randomized controlled trial of eicosapentaenoic acid in patients with coronary heart disease on statins. *J Cardiol*. 2017 Dec;70(6):537-544. [査読有](#)

Kadowaki S, [Watanabe T](#), Otaki Y, Narumi T, Honda Y, Takahashi H, Arimoto T, Shishido T, Miyamoto T, Kubota I. Combined assessment of myocardial damage and electrical disturbance in chronic heart failure. *World J Cardiol*. 2017 May 26;9(5):457-465. [査読有](#)

Honda Y, [Watanabe T](#), Shibata Y, Otaki Y, Kadowaki S, Narumi T, Takahashi T, Kinoshita D, Yokoyama M, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Shishido T, Inoue S, Miyamoto T, Konta T, Kawasaki R, Daimon M, Kato T, Ueno Y, Kayama T, Kubota I. Impact of restrictive lung disorder on cardiovascular mortality in a general population: The Yamagata (Takahata) study. *Int J Cardiol*. 2017 Aug 15;241:395-400. [査読有](#)

Hashimoto N, Arimoto T, Narumi T, Iwayama T, Kutsuzawa D, Ishigaki D, Kumagai YU, Tamura H, Nishiyama S, Takahashi H, Shishido T, Miyamoto T, [Watanabe T](#), Kubota I. The Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Predicts All-Cause Mortality in Patients with Implantable Cardioverter Defibrillators. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2017 Feb;40(2):135-144. [査読有](#)

Ishigaki D, Kutsuzawa D, Arimoto T, Iwayama T, Hashimoto N, Kumagai Y, Nishiyama S, Takahashi H, Shishido T, Miyamoto T, Nitobe J, Fukui A, [Watanabe T](#), Kubota I. The association between defibrillation shock energy and acute cardiac damage in patients with implantable cardioverter defibrillators. *J Arrhythm*. 2016 Dec;32(6):481-485. [査読有](#)

Yokoyama M, [Watanabe T](#), Otaki Y, Takahashi H, Arimoto T, Shishido T, Miyamoto T, Konta T, Shibata Y, Daimon M, Ueno Y, Kato T, Kayama T, Kubota I. Association of the Aspartate Aminotransferase to Alanine Aminotransferase Ratio with BNP Level and Cardiovascular Mortality in the General Population: The Yamagata Study 10-Year Follow-Up. *Dis Markers*. 2016;2016:4857917. [査読有](#)

Otaki Y, [Watanabe T](#), Kinoshita D, Yokoyama M, Takahashi T, Toshima T, Sugai T, Murase T, Nakamura T, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Shishido T, Miyamoto T, Kubota I. Association of plasma xanthine oxidoreductase activity with severity and clinical outcome in patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol*. 2017 Feb 1;228:151-157. [査読有](#)

Otaki Y, [Watanabe T](#), Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Shishido T, Miyamoto T, Konta T, Shibata Y, Sato H, Kawasaki R, Daimon M, Ueno Y, Kato T, Kayama T, Kubota I. The Impact of Superoxide Dismutase-1 Genetic Variation on Cardiovascular and All-Cause Mortality in a Prospective Cohort Study: The Yamagata (Takahata) Study. *PLoS One*. 2016 Oct 18;11(10):e0164732. [査読有](#)

〔学会発表〕(計 4件)

Taku Toshima, Tetsu Watanabe, Tetsuro Shishido, Ken Watanabe, Takayuki Sugai, Tetsuya Takahashi, Harutoshi Tamura, Satoshi Nishiyama, Takanori Arimoto, Hiroki Takahashi, Takuya Miyamoto, and Isao Kubota. Inhibition of MicroRNA-34a Attenuates Osteogenic Differentiation via Inhibiting Notch1 Signal in Aortic Valve Interstitial Cells. AHA Science session 2017.

Taku Toshima, Tetsu Watanabe, Tetsuro Shishido, Takuya Miyamoto, Takanori Arimoto, Hiroki Takahashi, Satoshi Nishiyama, Harutoshi Tamura, Taro Narumi, Yoichiro Otaki, Isao Kubota, and Masafumi Watanabe. The Role of microRNA-34a in Aortic Valve Calcification via Notch1-Runx2 Signaling. AHA Science session 2018.

Taku Toshima, Tetsu Watanabe, Tetsuro Shishido, Takuya Miyamoto, Tetsuya Takahashi, Takayuki Sugai, Ken Watanabe, Jun Goto, Isao Kubota¹, Masafumi Watanabe. Therapeutic inhibition of microRNA-34a ameliorates aortic valve calcification via modulation of Notch1-Runx2 signaling in calcific aortic valve stenosis model mice by direct wire injury. ESC Congress 2018.

豊島拓、渡邊哲、穴戸哲郎、後藤準、渡部賢、須貝孝幸、高橋徹也、田村晴俊、西山悟史、有本貴範、高橋大、宮本卓也、久保田功. MicroRNA-34a facilitates osteogenic differentiation of aortic valve interstitial cells via Notch1 signal. 日本循環器学会 2017 .

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.ichinai.com/basic-research-calcific-aortic-valve-stenosis-model-mice/>

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：豊島 拓

ローマ字氏名：(TOSHIMA, Taku)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。