

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08996

研究課題名(和文) HDL-miRNAの動脈硬化発症および進展に対するバイオマーカーとしての可能性

研究課題名(英文) Possibility of HDL-miRNA as a biomarker for arteriosclerosis development and progression

研究代表者

石川 浩章 (ISHIKAWA, HIROAKI)

藤田医科大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：50321013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、高比重リポタンパク(HDL)中に存在するmiRNAを注目して、動脈硬化とHDL-miRNAの関連性を調査した。そこで、現在報告されているHDL-miRNAの測定法よりも簡便な定量法を確立した。この方法を用いて、一般住民健診受診者の血漿サンプルから3種類のHDL-miRNA(miR-223、miR-92、miR-150)を測定した。その結果、動脈硬化所見を有する者では2種類のHDL-miRNA(miR-223、miR-92)の有意な増加を認め、HDL-miRNAは動脈硬化の進展に関する新規バイオマーカーになり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血中miRNAの研究発展に伴い、キャリアーごとにmiRNAを計り分けることが注目されている。我々が確立したHDL-miRNAの定量法は、多くの研究者にとってHDL中のmiRNAの探索研究が容易になり、各種疾患との関連が明らかになると考えられる。今回、我々の結果から、動脈硬化症の進展に伴って変化するHDL中のmiRNAが明らかとなった。今後、この新しい動脈硬化の進展に関与するバイオマーカーを用いることで、その後に発症が考えられる心筋梗塞等の予知に役立つ可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the relationship between arteriosclerosis and HDL-miRNA, focusing on miRNAs present in high-density lipoprotein (HDL). Therefore, we established a simpler quantification method of HDL-miRNA than the currently reported measurement method. Using this method, four types of HDL-miRNA (miR-223, miR-92, miR-146a and miR-150) were measured from plasma samples of health checkups. As a result, a significant increase in two types of HDL-miRNA (miR-223 and miR-92) was observed in atherosclerotic patients, HDL-miRNA suggested to be a novel biomarker for the progression of arteriosclerosis.

研究分野：臨床生化学

キーワード：HDL-miRNA 動脈硬化 Circulating miRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現の調節に重要な役割を果たしているmicroRNA(miRNA)は、エクソソームおよび微小胞等のキャリアーに封入され、血中においても分解されることなく安定的に存在している。

近年、血中のTotal miRNAを測定するだけでなく、それぞれのキャリアー別にmiRNAを測り分けることにより、各種疾病の詳細な評価が可能となることが示唆されている。例えば、エクソソームに含まれるmiRNAと卵巣がんや肺がん、血小板に含まれるmiRNAと冠動脈疾患や潰瘍性大腸炎との関連が報告されている。2011年、Vickersらは、miRNAが高比重リポタンパク(High-density lipoprotein : HDL)などのリポタンパク中に封入され、血中で安定的に存在していることを報告している。さらに、HDL中に存在するmiRNAのプロフィールが、家族性高コレステロール血症患者と健常者を比較すると有意な差があること、またWagnerらも、急性冠症候群患者中における数種類のHDL-miRNAが、健常者よりも有意に変化することを報告している。HDL-miRNAは、約300種類以上存在し、エクソソーム中のmiRNAプロフィールとは異なっている。HDL-miRNAはExosome-miRNAに比べて微量であり、血清や血漿からの測定ではExosome-miRNAにマスクされてしまう。従って、これまでの研究と違い血中のTotal miRNA やexosome中のmiRNAを解析するのではなく、HDL中のmiRNAのみを解析することは、miRNAの研究に対する新たな知見を見出すことが期待できる。

2. 研究の目的

近年、各種疾患における新規のバイオマーカーとして期待されている miRNA が、HDL と複合体を形成し、血中に安定的に存在していることが報告されている。また、HDL-miRNA のプロフィールは、exosome などの miRNA 含有小胞中のものとは異なることも報告されている。本研究の目的は、一般的に測定されている Total miRNA や exosome 中の miRNA を分析するのではなく、血中の HDL-miRNA のみを、我々が確立した HDL-miRNA の新しい定量法を用いて、本研究グループが毎年実施している某地域住民の健康診断により入手した検体を用いて、生活習慣病に起因する動脈硬化の病態進展や発症予測における新規バイオマーカーとしての可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1)現在報告されている HDL-miRNA の測定法は、HDL の精製法に長時間を有することや手順も煩雑であることが欠点である。特に、透析による脱塩およびゲルろ過クロマトグラフィー(GFC)法を組み合わせて実施している。しかし、精製法に透析や GFC 法を用いた場合は、複数検体の処理には向いていない。そこで、HDL-miRNA の臨床検査への応用に向けた検討を行うにあたり、検体処理能力を向上させた精製法の確立し、統一された評価方法が存在しない HDL-miRNA の定量法についても検討した。

(2)動脈硬化と HDL-miRNA の関連を調べるために、2015 年に北海道二海郡八雲町にて行われた住民健診の受診者 525 名から対象者を抽出した。健康診断時に日本超音波医学会の認定超音波検査士が頸動脈の超音波検査を行い、左右の頸動脈の内膜中膜複合体厚(Intima-media Thickness ; IMT)を測定した。左右の頸動脈を測定し、その最大値(max IMT)が基準値である 1.1 mm 以上の場合に動脈硬化の所見が認められると判断した。IMT の基準値は日本超音波医学会が公示している「超音波による頸動脈病変の標準的評価法」を参考にした。健康診断受診者のうち、60 代の男性 111 名の中から現在喫煙している者、癌の既往がある者を除き、Control 群と動脈硬化群(Mild 群、Severe 群)を抽出した。

4. 研究成果

(1) HDL 定量法の確立

血漿から超遠心法、リンタングステン酸/MgCl₂ 沈殿法、脱塩・Buffer 置換によって HDL 分画の精製を行った。HDL 分画中に HDL が存在することを確認するため、ウェスタンブロット分析を用いて HDL の表面タンパクである ApoA-I の検出を行った結果、超遠心後の上清、沈殿試薬処理後の上清、HDL 分画において 20 kDa 付近にバンドが認められた。また、HDL と同様に、血中で miRNA の運搬をするエクソソームの表面抗原 CD63 のバンドは ~

の中に検出されなかった(図 1)。

また、本法を用いた場合の回収率を HDL コレステロール(HDL-C)濃度及び ApoA-I 濃度を用いて求めた。精製の各段階の HDL-C 及び ApoA-I 濃度を測定し、絶対量を求め、血漿 500 μ L の時点からの回収率を計算した。その結果、最終的な HDL-C の回収率は 51.2 \pm 2.4%、ApoA-I の回収率は 46.7 \pm 4.4%であったさらに、LDL の表面タンパクである ApoB を自動分析装置により測定したところ、沈殿法後のサンプルでは検出感度以下となった(表 1)。このことから、沈殿法により HDL 以外のリポタンパクを除去することができた。以上の結果から、HDL 分画中にはエクソソームや LDL の混入は殆ど認められず、HDL を得ることができた。

次に、本法による HDL の精製で miRNA を検出することができるか否かを調べるために、HDL 分画から miRNA を抽出し、定量リアルタイム PCR 法による測定を行った。これまでに HDL 中に存在していることが報告されている3種類の miRNA (miR-223、miR-92 および miR-150) について測定を

(2) 動脈硬化における HDL-miRNA の解析

次に、今回確立した測定法を用いて、動脈硬化における HDL-miRNA の解析を試みた。初めに、2015 年度に北海道二海郡八雲町にて行われた住民健診の受診者の中から対象者を抽出した。HDL に含まれる miRNA を量的に評価するために、HDL-miRNA 量(コピー数)の HDL-C 量による補正、ApoA1 量による補正、血漿量による補正を行った。そのため、各 miRNA の検量線を作成し、定量リアルタイム PCR を用いてコピー数を求めた。即ち、測定した HDL-miRNA を定量し、コピー

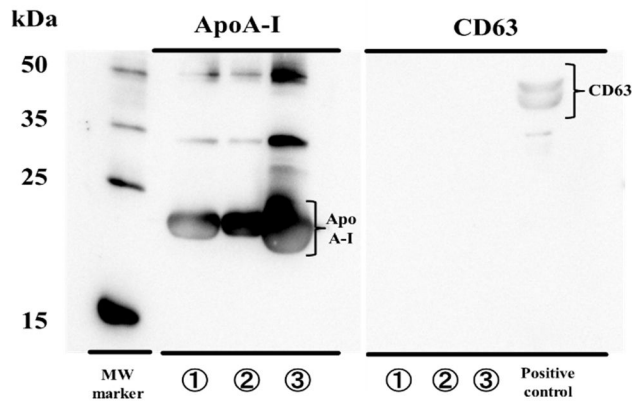


図1. ウェスタンブロットによるApoA-IおよびCD63の検出

①超遠心後の上清、②沈殿試薬処理後の上清、③HDL分画

表1. 各ステップにおけるHDLの回収率

		プール血漿	①	②	③
HDL-C	Mean	100%	64.4%	62.1%	51.2%
	SD		1.7%	1.7%	2.4%
	CV		2.7%	2.7%	4.6%
ApoA-I	Mean	100%	55.8%	56.8%	46.7%
	SD		3.5%	3.9%	4.4%
	CV		6.3%	6.9%	9.3%
ApoB	Mean	100%	60.0%		
	SD		6.8%	n.d.	n.d.
	CV		11.3%		

データは平均値(Mean)、標準偏差(SD)、変動係数(CV)で表した。

¹ HDL分画の精製は、プール血漿から8回実施した。

² 各精製段階でのHD量:① 超遠心後の上清、②沈殿試薬処理後の上清、③HDL分画

³ n.d.: 検出不可。

表2. HDL-miRNA分析法の同時再現性

		HDL-miR-223	HDL-miR-92	HDL-miR-150
Ct value	Mean	32.11	32.50	34.91
	SD	0.58	0.35	0.77
	CV	1.81%	1.08%	2.21%

データは平均値(Mean)、標準偏差(SD)、変動係数(CV)で表した。

¹ HDL分画の精製は、同一被検者から10回実施した。

試みた

数で表し、さらに HDL-C 1 mg あたりの HDL-miRNA 量 (Copies/1 mg HDL-C)、ApoA1 1 mg あたりの HDL-miRNA 量 (Copies/1 mg ApoA1)、血漿 1 mL 中に含まれる HDL-miRNA 量 (Copies/mL) への換算を行った。結果から、miR-223 ではどの評価法を用いた時にも Control 群と Mild 群の間、Control 群と Severe 群の間に有意な差が認められた (Control vs Mild : $p < 0.05$, Control vs Severe : $p < 0.01$)。miR-92 では、HDL-C 1 mg あたりのコピー数を比較した場合は Control 群と Severe 群の間のみ有意な差 ($p < 0.01$) が認められたが、ApoA1 1 mg あたりのコピー数及び血漿 1 mL あたりのコピー数を比較した場合は、Control 群と Mild 群の間、Control 群と Severe 群の間に有意な差 (Control vs Mild : $p < 0.05$, Control vs Severe : $p < 0.01$) が認められた。miR-150 では、HDL-C 1 mg 及び ApoA1 1 mg あたりのコピー数を比較した場合に Severe 群では Control 群に対し高値である傾向がみられたが、Severe 群と Mild 群、Mild 群と Control 群の間に有意な差は認められなかった (表 3)。

表3.動脈硬化症における補正したHDL-miRNAの比較

		Copies/1mg HDL-C ($\times 10^4$)	Copies/1mg ApoA-I ($\times 10^4$)	Copies/1mL ($\times 10^6$)
	Control	3.59 \pm 0.70	1.49 \pm 0.23	1.98 \pm 0.32
miR-223	Mild	8.35 \pm 1.24 *	3.60 \pm 0.53 *	4.77 \pm 0.75 *
	Severe	7.81 \pm 0.97 †	3.44 \pm 0.44 †	4.58 \pm 0.63 †
	Control	1.58 \pm 0.23	0.68 \pm 0.10	0.90 \pm 0.14
miR-92	Mild	3.17 \pm 0.64	1.36 \pm 0.25 *	1.74 \pm 0.35 *
	Severe	4.77 \pm 0.61 †	2.10 \pm 0.27 †	2.78 \pm 0.35 †
	Control	1.52 \pm 0.44	0.67 \pm 0.19	0.90 \pm 0.25
miR-150	Mild	2.43 \pm 0.53	1.05 \pm 0.23	1.30 \pm 0.26
	Severe	4.57 \pm 1.27	1.97 \pm 0.56	2.50 \pm 0.68

定量リアルタイムPCRを用いて、検量線を作製し、それぞれのHDL-miRNAのコピー数を求めた。コピー数はさらに、HDL-C 1 mgあたりのコピー数 (Copies/1 mg HDL-C)、ApoA1 1 mgあたりのコピー数 (Copies/1 mg ApoA1)、血漿 1 mLあたりのコピー数 (Copies/1mL) へ換算した。換算後にControl群、Mild群、Severe群における比較を行った。結果はMean \pm SEMで表記し、Steel-Dwass検定を用いて各ペアの有意差を調べた。
Control vs Mild : * $p < 0.05$, Control vs Severe : † $p < 0.01$

本研究では、従来の方法と比較して簡易的であり、検体処理能力を向上させた HDL-miRNA の測定法を新たに確立した。さらにその方法を用いて、HDL-miRNA を測定し、動脈硬化において HDL 中の miR-223、miR-92 が有意に高値を示すことを明らかにした。したがって、これらの HDL-miRNA は動脈硬化の進展に関する新規バイオマーカーになり得ることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 石川浩章、山田宏哉、太郎丸奈央、近藤奏子、名倉鮎里、山崎未来、安藤嘉崇、宗綱栄二、鈴木康司、大橋鉦二、寺平良治	4. 巻 47
2. 論文標題 HDL-microRNAsに対する臨床応用の可能性 臨床検査への応用を目指して	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床化学	6. 最初と最後の頁 345-346
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 石川浩章	4. 巻 47
2. 論文標題 血清HDL-microRNAの安定性に関する研究	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床化学	6. 最初と最後の頁 427-428
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiroaki Ishikawa, Hiroya Yamada, Kanako Kondo, Takeru Ota, Mirai Yamazaki, Yoshitaka Ando, Genki Mizuno, Eiji Munetsuna, Koji Suzuki, Ryoji Teradaira, Koji Ohashi	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Establishment of a simpler method for measuring HDL-microRNAs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Clinical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 49-55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0004563218775770	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 下平大輝、石川浩章、山田宏哉、宗綱栄二、安藤嘉崇、大橋鉦二
2. 発表標題 MicroRNAを介したHDLと細胞間コミュニケーションの検討
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田駿瑠、近藤奏子、下平大輝、 畑澤莉緒奈、山本温子、石川浩章、山崎未来、山田宏哉、宗綱栄二、鈴木康司、寺平良治、大橋紘二
2. 発表標題 血中HDL-miRNAの細胞への移行および定量法の確立
3. 学会等名 第64回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山田 宏哉 (YAMADA HIROYA) (80610352)	藤田医科大学・医学部・講師 (33916)	