

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15905

研究課題名(和文) HDLに存在するmicroRNAによる、冠動脈疾患症例の予後への影響を検討する

研究課題名(英文) Correlation between micro RNAs on HDL and prognosis in patients with coronary artery disease

研究代表者

西山 大樹(Hiroki, Nishiyama)

順天堂大学・医学部・助手

研究者番号：20816954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究計画では、冠動脈インターベンションデータベースから得られたデータと保存検体を用いて、動脈硬化性疾患におけるhigh density lipoprotein (HDL)上のマイクロRNA (miRNA)のスクリーニングと予後の関連を検討した。凍結保存された血漿からHDLを特異性の高い方法で単離し、さらにごく少量しかないHDL上のmiRNAを単離してスクリーニングを行なった。3症例ずつ、背景因子を厳密に揃えた心血管死亡あり、なし症例でmiRNAをスクリーニングすると、282種類のmiRNAが全ての症例にh発現しており、さらに125種類のmiRNAの発現が50%以上異なっていることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HDL(high density lipoprotein)は、その低値が動脈硬化リスクであることがエビデンスとして確立されているものの、LDL(low density lipoprotein)や中性脂肪に比べ、冠動脈疾患や脳血管疾患など動脈硬化性疾患の治療標的としての地位は高くない。本研究ではそのHDLの機能、ひいては予後にも影響する可能性のある、HDL上のmiRNAをスクリーニングし、これまで全く報告されていない新たなmiRNA、Mir-1914-3pを見出した。HDL機能をコントロール因子は未だに見出されておらず、今回の発見が新たな知見を加える可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Despite an established prognostic significance of low high-density cholesterol (HDL) level in the context of atherosclerotic cardiovascular disease, recent failure of clinical trials of HDL raising drugs, such as CETP inhibitors and niacin, have caused less enthusiasm regarding its clinical and mechanistic exploration. However, since the functionality of HDL has been suggested to be further significant compared to its amount (serum concentration), we identified micro RNA (miRNA) specifically on HDL of patients underwent percutaneous coronary intervention (PCI) and performed their unbiased screening, which might have an impact on occurrence of cardiovascular mortality. Consequently, we identified 529 miRNAs in total. Among those, 125 miRNAs were different more than 50%. Then, Mir-1914-3p, which has never been reported in association with cardiovascular disease, was identified as a potential prognostic marker or a therapeutic target for atherosclerotic cardiovascular disease.

研究分野：循環器内科学

キーワード：HDL機能 ApoA1 動脈硬化 予後 マイクロRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

狭心症、心筋梗塞を含む冠動脈疾患あるいは脳血管の動脈硬化を原因とする脳梗塞・脳血管性認知症などを含む動脈硬化性疾患は、わが国において常に死因の上位を占め、医学的にも医療経済・保険政策上もきわめて重要な疾患である。動脈硬化進行に関するリスク因子は、高血圧、糖尿病、脂質異常症、喫煙、家族歴・遺伝的要因などが知られているが、個々の症例においてそれらのリスクをどの程度コントロールすべきか、ということは明らかでない。例えば腫瘍マーカーのように、病勢を反映し、治療効果判定にも使用出来る指標があれば、個々の症例に適切なタイミングで、適切な介入を行うことが可能となり、将来の心血管イベント発症を抑制できる可能性がある。

スタチン投与後の残余リスクの治療標的として、LDLと同様のリポタンパクである HDL は、LDLとは逆に、「善玉コレステロール」と呼ばれている。血清中の HDL コレステロール (HDL-C) 低値は、一次予防症例で冠動脈疾患発症のリスク因子であることが、わが国でも示されており (Circulation 1994;89:2533)、スタチン内服中で LDL-C が抑制されていても HDL-C 低値は心血管イベントのリスクを上昇させることが示されている (N Engl J Med 2007;35:1301)。さらに HDL は肝臓・腸管で合成された ApoA1 とリン脂質から成り、動脈硬化病変に集簇したマクロファージが取り込んだコレステロールエステルなどを回収して肝臓に戻す機能 (コレステロール逆輸送系)、すなわち動脈壁からコレステロールエステルや遊離コレステロールを除去する抗動脈硬化作用を有しているために「善玉」と呼ばれている。そのため、血中の HDL、あるいは HDL-C を量的に増加させる目的でナイアシン (ビタミン B3)、HDL の LDL などへの変換に関わる酵素、CETP の阻害薬を用いた大規模介入臨床試験が行われたが、それらは確かに血清中の HDL-C レベルを上昇させたにも関わらず、ナイアシンの効果はなく (N Engl J Med 2011;365:2255 など)、CETP 阻害薬の多くは無効か、逆に心血管イベントを増加させた (N Engl J Med 2007;357:2109 など)。これらの試験結果から、HDL 全体の量的な増加は予後改善に寄与しない、ということであり、その原因は HDL が単一のリポタンパクでないためである。HDL は ApoA1 とリン脂質から作られた後、マクロファージからコレステロールエステルやリン脂質を引き抜いてその粒子径も大きくなる。HDL の粒子径が大きいほど冠動脈疾患リスクが高いことが証明されており (J Am Col Cardiol 2008;51:634)、サイズの大きな HDL が多い症例ほど心血管イベント発症率が高いことが示されている (Atherosclerosis 2016;251:454)。それらの結果は、HDL 分画によりその機能に差があることを示している。血清中の HDL のコレステロール引き抜き能の予後への影響を検討した臨床研究では、コレステロール引き抜き能が高いほど、心血管イベント発症率が低いことが示されており (N Engl J Med 2014;371:2383 など)、動脈硬化性疾患の予後を改善するためには、HDL の量ではなく、コレステロール引き抜き能を改善させる治療が必要である。われわれはすでに HDL-C と ApoA1 がきわめて強く正相関する ($r=0.80$) にも関わらず、HDL-C の低値で心血管死亡頻度の増加は認めなかったが、ApoA1 低値が心血管死亡のリスク因子であることを明らかにしている (図 1) (西山ら、投稿準備中)。現時点で HDL の機能改善に有効な治療はまったく確立されていない。HDL の機能を改善させ、予後を改善させる治療法としての有用性、あるいは HDL 機能を簡便にモニタリングして動脈硬化性疾患の予後や病勢を示すバイオマーカーとしての有用性が本研究の核心をなす学問的問いである。

microRNA (miRNA) は 21-25 塩基長の 1 本鎖 RNA 分子であり、遺伝子の転写後発現調節に関わる。miRNA による転写調節は細胞の増殖および分化、アポトーシス、代謝といった広範な生物学的プロセスに役割を担うことが次第に明らかとなっている。動脈硬化においても様々な microRNA がその進行に関与することが報告されているが、そのうち HDL の代謝に関わる臓器・細胞として、肝臓・小腸とマクロファージが挙げられる。そのうちマクロファージにおいて miR-33 や-26 などがマクロファージに存在し、ABCA1 や ABCG1 など、コレステロールのマクロファージからの排出に極めて重要な働きを果たす遺伝子の調節に関与していることが示されている (Science 2010;328:1566 など)。さらに、HDL の上にも実は miR-126、-223、-92 などの miRNA が存在し、HDL-C と血管内皮細胞とのやり取りの中で、抗動脈硬化作用や抗血管炎症作用を発現していること示唆されている (Nat Commun 2014;5:3292, Circ Res 2014;114:183 など)。しかし、それらの miRNA の、予後への影響については、ほとんど検討されていない。

2. 研究の目的

本研究計画では、「HDL-C の機能調節に関わる HDL 上の microRNA を、動脈硬化疾患における治療標的あるいはバイオマーカーとして使用できる可能性」について検討する。その方法として、順天堂 PCI レジストリからの (1) 臨床データすなわち PCI 施行時の背景因子と予後 (follow-up 期間中の心血管イベントの有無)、(2) 保存血清から単離した HDL 上の microRNA の症例ごとの同定と定量化、そして (3) 単離した HDL と cell line 細胞を用いた HDL 機能 (コレステロール引き抜き能) の症例ごとに定量化、3つのパラメータを用い、HDL 上に存在する microRNA の治療標的としての可能性とバイオマーカーとしての可能性を nested case-control 研究にて検討することを目的とする。

図1: HDL上のmiRNA単離を目的とした高純度HDLの単離

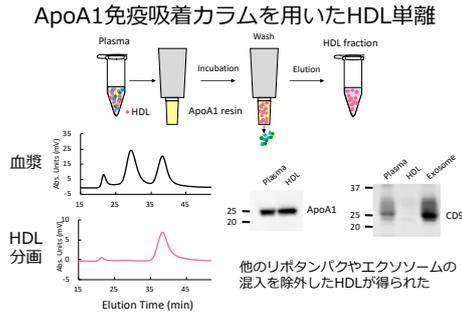
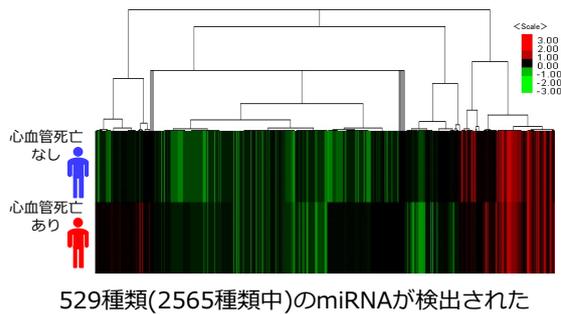


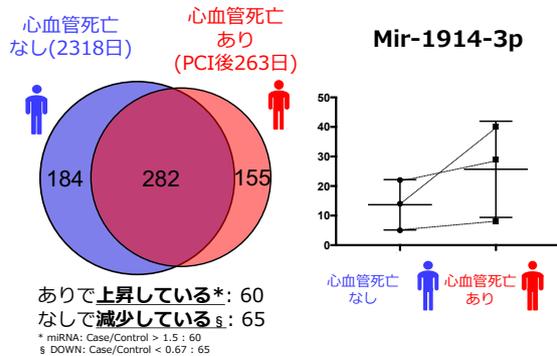
図2: 血漿→HDL単離→RNA単離→マイクロアレイ
マイクロアレイによるHDL miRNAの網羅的解析



クロアレイを用いて miRNA の網羅的な解析を行なった(図2)。

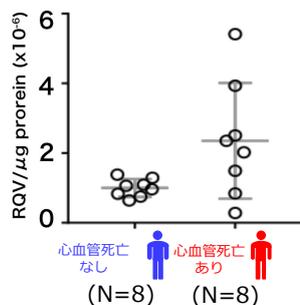
4. 研究成果

図3: 網羅的解析により心血管死亡なしvs.あり症例で変化しているmiRNAが同定された



ありで**上昇している***: 60
なしで**減少している**‡: 65
* miRNA: Case/Control > 1.5 : 60
‡ DOWN: Case/Control < 0.67 : 65

図4: HDL上のMir-1914-3pは心血管疾患死亡症例で高値であった



脈、あるいは大動脈弁狭窄症などの弁膜症でも同様の検討を行う予定である。

3. 研究の方法

順天堂大学循環器内科は、順天堂 PCI (経皮的冠動脈インターベンション) レジストリという、1984年より現在までのデータが蓄積された動脈硬化性疾患二次予防データベースを有している。1984年2月から2013年12月の間にPCIを施行された4873症例では、PCI施行時の背景情報・内服薬データがあり、その後の追跡率は80%以上で、平均フォローアップ期間は10.27年と長期にわたる。順天堂PCIデータベースから、心血管イベントにて死亡した症例と、少なくとも5年間イベントのなかった症例を、年齢・性別・糖尿病の有無・内服薬などの背景因子を揃えた対象群として1:1で抽出した。抽出された症例の凍結保存血清からApoA1レジンカラム (Academy Biomedical社, Goat Anti-Human Apolipoprotein AI Sepharose 4B™ Gel) を用いてHDLを単離し、miRNAを含有するexosomeや他のリポタンパク粒子を除去した上で(非HDL由来のmiRNA混入を防ぐ)(図1)、HDL上のmiRNAを、mirVana PARIS Kit (Thermo Fisher Scientific社)にて単離、その発現量をTaqMan MicroRNA Assays (Thermo Fisher Scientific)を用いて定量化した。まずHDL上に存在するという報告がある3種類のmiRNA、miR-223、-126、-92a、-92bの発現量を定量化したのち、マイ

PCI後長期にわたって経過観察された(平均10.3年)症例のうち、経過中に心血管疾患で死亡した症例としなかった症例で、年齢・性別・LDL-C値・糖尿病・腎機能・スタチン内服を完全に一致させた3組の症例を同定し、保存されたPCI時の血清からApoA1吸着カラムを用いてHDLを単離、HDL上で発現するmiRNAをマイクロアレイを用いてスクリーニングした。その結果、529種類のmiRNAが同定され(図2)、うち282種類が全ての症例での発現が確認された。心血管死亡症例で50%以上の高発現を認めたものが60種類、50%以上の発現低下を認めたものが65種類見出された(図3)。

そのうち、われわれはMir-1914-3pに注目し、症例数を増やして検討したところ、後に心血管疾患で死亡した症例ではPCI時点で明らかに高値であった(図4)。

今後の方向性

本研究計画では、今後今回見出したMir-1914-3pを保存血清から単離したHDLでその発現を検討し、同時にHDL機能(コレステロール引き抜き能)との相関も検討する。保存検体のHDLでのmiRNAの発現を定量化し、予後予測するバイオマーカーとしての有用性、更には治療標的としての可能性についても検討する予定である。将来的には動脈硬化性疾患のみならず、心房細動などの不整

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Katsutoshi Miyosawa, Hiroshi Iwata, Asuka Minami-Takano, Hidemori Hayashi, Haruna Tabuchi, Gaku Sekita, Tomoyasu Kadoguchi, Kai Ishii, Yui Nozaki, Takehiro Funamizu, Yuichi Chikata, Satoshi Matsushita, Atsushi Amano, Masataka Sumiyoshi, Yuji Nakazato, Hiroyuki Daida, Tohru Minamino	4. 巻 15
2. 論文標題 Enhanced monocyte migratory activity in the pathogenesis of structural remodeling in atrial fibrillation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One .	6. 最初と最後の頁 e0240540
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0240540.	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 -

1. 著者名 Kato Yoshiteru, Dohi Tomotaka, Chikata Yuichi, Fukase Tatsuya, Takeuchi Mitsuhiro, Takahashi Norihito, Endo Hirohisa, Nishiyama Hiroki, Doi Shinichiro, Okai Iwao, Iwata Hiroshi, Isoda Kikuo, Okazaki Shinya, Miyuchi Katsumi, Daida Hiroyuki, Minamino Tohru	4. 巻 77
2. 論文標題 Predictors of discordance between fractional flow reserve and resting full-cycle ratio in patients with coronary artery disease: Evidence from clinical practice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 313 ~ 319
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jjcc.2020.10.014	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------