

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590886

研究課題名(和文) 冠動脈疾患でのmicroRNAプロファイリングと遺伝子発現制御に関する研究

研究課題名(英文) MicroRNA profiling in patients with coronary artery disease.

研究代表者

佐藤 衛 (SATO MAMORU)

岩手医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90305996

研究成果の概要(和文)：本研究では、冠動脈疾患での動脈硬化進展のメカニズムのうち血管内皮障害と血管炎症に着目した。具体的には、血管内皮前駆細胞(EPC)の分化増殖および免疫担当細胞の活性化、特に、Toll様受容体4シグナル(TLR4)の発現を制御するmicroRNAの解析を行った。その結果、miR-221/222がEPCの分化増殖に関与し、miR-146a/bおよび*let-7i*がTLR4シグナルの制御に関与していることが明らかとなった。また、スタチンおよびRAS阻害薬を用いた臨床試験を実施し、アトルバスタチンおよびテルミサルタンの有用性を立証した。

研究成果の概要(英文)：The present study has investigated microRNA biology concerning endothelial cellular injury and vascular inflammation, such as Toll-like receptor 4 (TLR4). Endothelial progenitor cells (EPCs) play an important role in the maintenance of vascular integrity. The physiological role of miR-221/222, a newly discovered class of small RNA, is closely linked to the proliferation of EPCs. In addition, this study demonstrates that lipid lowering therapy (LLT) with atorvastatin increases EPC numbers and decreases miR-221/222 levels in patients with CAD, possibly contributing to the beneficial effects of LLT with atorvastatin in this disorder.

TLR4 signal plays an important role in immunity in CAD. One of the *let-7* family microRNAs, *let-7i*, directly regulates Toll-like receptor 4 (TLR4) expression and contributes to immune response. The miR-146a / b regulates TLR4 downstream molecules (IRAK1 and TRAF6). The present study has shown that miR-146a / b were expressed with TLR4 signal in CAD patients, and combined treatment with a statin and RAS blockade might affect these levels. In addition, *let-7i* played a negative regulator of TLR4 in patients with CAD, and atorvastatin affected TLR4 levels via *let-7i*. This study demonstrates that treatment with ARB and atorvastatin decreases miR-146a / b and TLR4 signal in patients with CAD, possibly contributing to the anti-atherogenic effects of ARB and statins in this disorder.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：循環器内科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：冠動脈疾患、血管内皮前駆細胞、テロメア、血管リモデリング、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

- (1) 冠動脈疾患と血管内皮障害: 高齢化と食生活の欧米化に伴い本邦での冠動脈疾患の患者数が増加すると考えられている。冠動脈での動脈硬化は、①酸化ストレスの暴露による血管内皮障害、②単球/マクロファージの活性化と遊走・浸潤、③冠動脈プラーク病変の不安定化・破裂と血栓形成が関与していると考えられている。すなわち、これらの機序の解明は、冠動脈疾患の予防や新たな治療法の開発の観点から重要視されている。
- (2) 血管内皮前駆細胞(EPC)と冠動脈疾患: 骨髄幹細胞から分化したEPCが循環血液中に存在し、血管内皮を正常に保つために機能していると考えられている。Wernerらは、冠動脈疾患での血中EPC数の減少が、心血管イベントと心血管死の予測因子とであることを示した(NEJM 2005)。また、我々は、酸化ストレスによるEPCのテロメア長の短縮が、血管内皮障害および冠動脈疾患の発症と関連することを示した。しかし、EPCのテロメア機能不全およびそれに伴う動脈硬化進展の詳細なメカニズムは明らかとなっていない。
- (3) MicroRNA(miRNA)による遺伝子の調節: miRNAは、細胞内に存在する長さ20~25塩基ほどの1本鎖RNAを示し、さまざまな遺伝子の発現を調節する機能を有するまったく新しい遺伝子発現制御に関わる重要な機能性RNA分子である。最近、さまざまなmiRNAが、テロメア関連因子や酸化ストレス関連因子の発現を調節していることが注目されている。

2. 研究の目的

冠動脈疾患でのEPCの酸化ストレス・テロメア関連遺伝子の発現を制御するmiRNAおよび免疫担当細胞の活性化、特に、Toll様受容体シグナル(TLR)を制御するmiRNAを同定する。さらに、同定したmiRNAデータをもとに、EPCの酸化ストレス損傷の軽減、テロメア機能を改善、単球でのTLRシグナルの抑制し、すなわち、血管内皮細胞寿命と血管炎症を改善する実験系を確立し、血管再生医療への応用を目指す。

研究開発のゴール

- (1) EPCのmiRNA発現プロファイリングを作成
- (2) 上記の結果を基に冠動脈疾患で特異的に発現するmiRNAを同定
- (3) 上記のmiRNAのターゲット遺伝子の同定
- (4) 同定したmiRNAのトランスフェクション細胞モデルの作成
- (5) トランスフェクション細胞でのターゲット遺伝子発現およびテロメア機能、TLR4シグナルの変化を解析

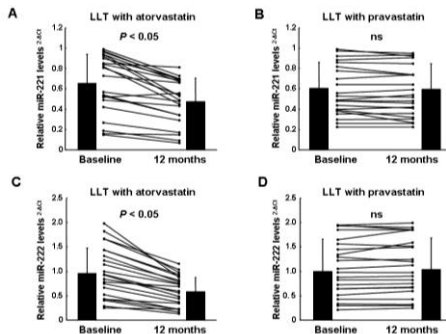
3. 研究の方法

- (1) 目標症例数
 - ① 冠動脈疾患: 100例、岩手医科大学附属病院に入院した症例を対象とする。
診断基準: ACC/AHAガイドライン(*J Am Coll Cardiol.* 2002;40:1366-74)。
 - ② 対照群: 100例、冠動脈疾患症例と年齢がマッチした健常人。
- (2) PBMCの分離とEPCの培養・同定
 - ① EPC培養: 末梢血液から細胞分離用試薬(histopaque-1077, Sigma)を用いた遠心分離法により末梢血単核細胞(PBMC)を分離し、血管増殖因子刺激下で培養する。
 - ② EPCの同定法・機能検査: 血管内皮特異的抗原(CD34, CD133, KDR)で染色し、フローサイトメーターによりEPC数を測定する。Acetyl-LDL取り込み能とlectin結合能でEPC機能を評価する。
- (3) miRNA発現プロファイリングの作成
 - ① 各細胞より、miRNA画分を含むtotal RNAを抽出する。
 - ② TaqMan MicroRNA assay (Applied Biosystem 7900HT)を用い網羅的miRNAプロファイリングを作成する。冠動脈疾患でup-regulationあるいはdown-regulationされているmiRNAを同定する。
 - ③ 上記②で同定したmiRNAについて、real-time RT-PCR法を用い全サンプルでのmiRNA発現を定量測定する。
- (4) ターゲット遺伝子の同定
 - ① EPCおよびPBMCsでのmRNAのマイクロアレイスクリーニングを行い、冠動脈疾患、健常人および正常血管内皮細胞、単核細胞での発現量の異なる遺伝子を検索する。
 - ② miRBase、PIRTAR、TARGETSCANから上記①の候補遺伝子とmiRNAプロファイリングとの結合性を調査する。
 - ③ これらの結果より、冠動脈疾患でのEPC、PBMCで特異的に発現するmiRNAとそのターゲット遺伝子を同定する。
- (5) トランスフェクションEPCの作成
 - ① Gain-of-function、loss-of-function実験: 上記で同定したmiRNAのprecursorおよびinhibitorを作成し、ヒト単球細胞株(THP-1 cell)へトランスフェクションする。ターゲット遺伝子の発現を定量測定する。
- (6) 無作為臨床試験
 - ① 積極的脂質降下療法 vs. 標準的脂質降下療法: CAD群を積極的脂質降下療法群(A群、アトルバスタチン10mg/日)と標準的脂質降下療法群(P群、プラバスタチン10mg/日)に無作為割付した。
 - ② ストロングスタチンによる無作為試験: CAD群は、アトルバスタチン群(10mg/

日) およびロスバスタチン群(2.5mg/日)にランダム化し無作為臨床試験を実施した。

上記の研究成果に基づき冠動脈疾患に関連したさまざまなmiRNAの働きをトランスレショナルに解析する。

4. 研究成果



(1) miRNAの網羅的解析

CAD群および健常者のPBMCおよび分離培養したEPCよりmiRNA画分を含むtotal RNAを抽出し、TaqMan MicroRNA assayを用い網羅的miRNAプロファイリングを作成した。その結果、CADではmiR-221/222、miR-146a/146b、let-7iに発現異常を認めた。また、データベース解析により、これらのmicroRNAは、血管内皮分化増殖因子(c-kit)およびTLR-4とその下流シグナルをターゲット遺伝子とすることが明らかとなった。

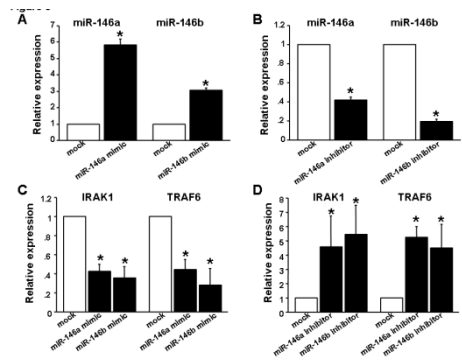
(2) miR-221/222発現とスタチンの薬効評価

① CAD群：44例(男性/女性36/8名、平均年齢66±12歳)。対照群：冠動脈病変を有さない22例(男性/女性17/5名、平均年齢64±8歳)。CAD群および対照群の末梢血液からEPCを分離培養し、血中EPC数を評価した。TaqMan MicroRNA assayを用いmiR-221/222の発現を定量測定した。また、CAD群を積極的脂質低下療法群(A群、アトルバスタチン10mg/日)と標準的脂質低下療法群(P群、プラバスタチン10mg/日)に無作為割付した。

② 血中EPC数は、CAD群で対照群より低値で、miR-221/222の発現は、CAD群で対照群より高値であった。また、CAD群での血中EPC数とmiR-221/222の発現量には負の相関を認めた。投与12ヵ月後のEPC数は、A群で増加し、P群では変化を認めなかった。また、miR-221/222の発現は、A群で減少し、P群では変化を認めなかった(下図)。

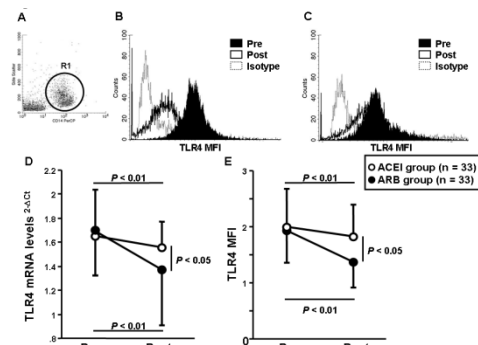
まとめ：CADのEPCでのmiR-221/222発現は亢進し、その発現はアトルバスタチンにより低下した。

③ これらの結果は、CADでのmicroRNA発現とEPCの分化誘導との関連性を示し、さらに、これらのEPCの分化誘導機能に対するスタチンの有用性を示唆した。



(3) CADのPBMCでのmiR-146a/bの発現とスタチン・RAS阻害薬による薬効

① CADの発症には、単球・マクロファージなどの免疫担当細胞でのToll様受容体4(TLR4)シグナルの活性化が関与して



いると考えられている。近年、microRNA(miR)-146 family(miR-146a/b)が、TLR4下流シグナル分子の発現を調節因子として注目されている。

② 目的と方法：CAD群および非CAD群でのTLR4およびmiR-146a/bの発現を比較検討した。また、無作為臨床試験により、TLR4シグナルに対するRAS阻害薬とスタチンの効果を検証した。CAD群(n=66)および非CAD群(n=33)の末梢血液から遠心分離法により単球を分離した。Real-time PCR法により、miR-146a/bおよびTLR4 mRNAを定量測定した。また、FACSscanを用いてTLR4蛋白を定量測定した。CAD群は、ARB投与群(ARB+スタチン)およびACEI投与群(ACEI+スタチン)にランダム化し無作為臨床試験を実施した。また、miR-146a/bトランスフェクション細胞(THP-1)モデルを作成した。

③ 結果：miR-146a/bトランスフェクション細胞の解析により、miR-146a/bはTLR4下流シグナル(IRAK-1, TRAF6)に必須な因子であることが立証された(右上図)。CAD群でのmiR-146a/bおよびTLR4 mRNAの発現は、非CAD群より高値であった(P<0.01)。また、miR-146a/bとTLR4 mRNAの発現には、正の相関を認めた。投与6ヵ月後のmiR-146a/bとTLR4の発現は、ARB群およびACEI群でともに減少し、こ

これらの変化は、ARB 群で有意に大きかった ($P < 0.05$) (下図)。

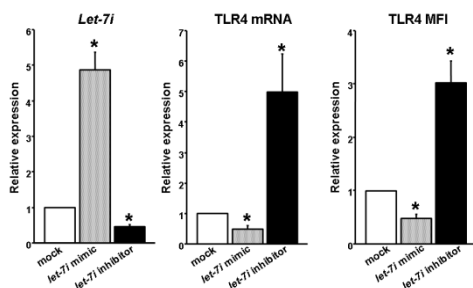
- ④ 結 語: 単球での miR-146a/b および TLR4 の発現の亢進は、CAD 発症の一因であることが示唆された。また、ARB とスタチンとの併用療法は、miR-146a/b および TLR4 の発現を抑制し、ARB およびスタチンが持つ抗動脈硬化作用のメカニズムの一つと考えられる。

(4) CAD での *let-7i* の発現とストロングスタチンの薬効評価

- ① 冠動脈疾患 (CAD) の発症には、単球・マクロファージなどの免疫担当細胞での Toll 様受容体 4 (TLR4) シグナルの活性化が関与していると考えられている。近年、*let-7* family に属する microRNA、*let-7i* が、TLR4 の発現を直接調節する microRNA として注目されている。

- ② 目的と方法: ヒト THP-1 細胞を用いた *let-7i* トランスフェクションモデルを作成し、*let-7i* 機能解析を行った。CAD 群および非 CAD 群での TLR4 および *let-7i* の発現を比較検討した。また、無作為臨床試験 (アトルバスタチン vs. ロスバスタチン) により、TLR4 シグナルに対するストロングスタチンの効果を検証した。CAD 群 ($n = 98$) および非 CAD 群 ($n = 48$) の末梢血液から遠心分離した末梢血単核細胞 (PBMCs) を対象とした。Real-time PCR 法により、*let-7i* および TLR4 mRNA を定量測定した。また、FACSscan を用いて TLR4 蛋白を定量測定した。CAD 群は、アトルバスタチン群 (10mg/日) およびロスバスタチン群 (2.5mg/日) にランダム化し無作為臨床試験を実施した。

- ③ 結 果: *let-7i* トランスフェクションモデルにより、*let-7i* は、TLR4 の発現に必須な因子であることが明らかとなった (下図)。



CAD 群での *let-7i* の発現は、非 CAD 群より低値であった ($P < 0.01$)。一方、CAD 群での TLR4 (mRNA および蛋白) の発現は、非 CAD 群より高値であった ($P < 0.01$)。投与 12 ヶ月後のアトルバスタチン群での *let-7i* の発現は増加し、TLR4 の発現は減少した。一方、ロスバスタチン群で

の *let-7i* と TLR4 の発現は、変化を認めなかった。

- ④ 結 語: 末梢血単核細胞での *let-7i* の発現低下に伴う TLR4 の発現は、CAD 発症の一因であることが示唆された。また、アトルバスタチンは、*let-7i* の発現を介した TLR4 の発現を抑制し、アトルバスタチンが持つ抗動脈硬化作用のメカニズムの一つと考えられる。

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 9 件)

1. Takahashi Y, Satoh M, Minami Y, Tabuchi T, Itoh T, Nakamura M. Expression of miR-146a/b is associated with the Toll-like receptor 4 signal in coronary artery disease: effect of renin-angiotensin system blockade and statins on miRNA-146a/b and Toll-like receptor 4 levels. Clin Sci (Lond). 2010; 119: 395-405 査読有
2. Satoh M, Minami Y, Takahashi Y, Tabuchi T, Nakamura M. Expression of microRNA-208 is associated with adverse clinical outcomes in human dilated cardiomyopathy. J Card Fail. 2010;16:404-10. 査読有
3. Satoh M, Tabuchi T, Minami Y, Takahashi Y, Itoh T, Nakamura M. Prospective, randomized, single-blind comparison of effects of 6 months of treatment with telmisartan versus enalapril on high-molecular-weight adiponectin concentrations in patients with coronary artery disease. Clin Ther. 2009;31:2113-25 査読有
4. Minami Y, Satoh M, Maesawa C, Takahashi Y, Tabuchi T, Itoh T, Nakamura M. Effect of intensive lipid-lowering therapy on telomere erosion in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. Eur J Clin Invest. 2009;39:359-67 査読有
5. Satoh M, Minami Y, Takahashi Y, Nakamura M. Immune modulation: role of the inflammatory cytokine cascade in the failing human heart. Curr Heart Fail Rep. 2008;5: 69-74. 査読有
6. Satoh M, Ishikawa Y, Minami Y, Takahashi Y, Nakamura M. Role of Toll like receptor signaling pathway in ischemic coronary artery disease. Front Biosci. 2008;13:6708-15. 査読有

7. Satoh M, Ishikawa Y, Minami Y, Takahashi Y, Nakamura M. Local expression of Toll-like receptor 4 at the site of ruptured plaques in patients with acute myocardial infarction. Clin Sci (Lond). 2008;115:133-40 査読有
8. Satoh M, Ishikawa Y, Itoh T, Minami Y, Takahashi Y, Nakamura M. The expression of TNF-alpha converting enzyme at the site of ruptured plaques in patients with acute myocardial infarction. Eur J Clin Invest. 2008;38:97-105 査読有
9. Satoh M, Ishikawa Y, Takahashi Y, Itoh T, Minami Y, Nakamura M. Association between oxidative DNA damage and telomere shortening in circulating endothelial progenitor cells obtained from metabolic syndrome patients with coronary artery disease. Atherosclerosis. 2008;198:347-53. 査読有
- [学会発表] (計4件)
1. Takahashi Y, Satoh M, Minami Y, Tabuchi T, Itoh T, Nakamura M. Expression of miR-146a/b is associated with the Toll-like receptor 4 signal in coronary artery disease: effect of renin-angiotensin system blockade and statins on miRNA-146a/b and Toll-like receptor 4 levels. European Society of Cardiology 2010. 2010年9月 Stockholm, Sweden.
2. Minami Y, Satoh M, Tsuyoshi T, Takahashi Y, Itoh T, Nakamura M. Effect of atorvastatin on microRNA 221/222 expression in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. European Society of Cardiology 2009. 2009年9月 Barcelona, Spain.
3. Satoh M, Minami Y, Takahashi Y, Tabuchi T, Nakamura M. Myocardial expression of microRNA-208 in human dilated cardiomyopathy. Heart Failure 2009. 2009年5月 Nice, France.
4. Satoh M, Ishikawa Y, Takahashi Y, Itoh T, Minami Y, Nakamura M. Effect of HMG-CoA reductase inhibitor therapy on telomere erosion in endothelial progenitor cells obtained from patients with stable angina. European Society of Cardiology 2008. 2008年9月 Munich, Germany.

[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

6. 研究組織
 (1) 研究代表者
 佐藤 衛 (SATOH MAMORU)
 岩手医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：90305996

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：