様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２３年５月２７日現在

機関番号：14301
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2010
課題番号：22890090
研究課題名（和文）　心筋のマイクロＲＮＡ放出・取り込み機序の解明　心臓病態生理における役割
研究課題名（英文）　Mechanism of Cardiac Release and Uptake of MicroRNAs : The Role in Cardiac Pathophysiology
研究代表者
西　仁勇（NISHI HITOO）
京都大学・医学研究科・研修員
研究者番号：70583194

研究成果の概要（和文）：虚血性心疾患患者における心筋特異的 microRNA の血清レベルについてリアルタイム PCR 法を用いて定量した結果、miR-1、-133a の増加を認めた。A23187 が用量依存的にラット培養筋芽細胞 H9C2 培養液中 microRNA レベルを上昇させることを見出した。さらに A23187 刺激により放出されたエクソソーム内 microRNA が細胞に取り込まれ、その機能を発現しうることを示した。

研究成果の概要（英文）：Serum levels of cardiac specific microRNAs in patients with ischemic heart disease were quantified by real-time PCR and consequently, miR-1 and miR-133a were found to be up-regulated. It was also demonstrated that A23187 could increase microRNA levels in the culture medium of H9C2 rat myoblast cells in a dose-dependent manner, and microRNAs contained in exosomes might be incorporated into cells and function in the recipient cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2010 年度	1,450,000	435,000	1,885,000
総　計	1,450,000	435,000	1,885,000

研究分野：医歯薬学
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：MicroRNA　エクソソーム　虚血性心疾患

１．研究開始当初の背景

microRNA(miRNA)は 18～25 個のヌクレオチドからなる一本鎖 RNA であり、その配列構成によりこれまでに約 1 万種の報告がある。線虫からヒトに至るまで高度に保存された miRNA の配列は、同時に数百個ともされる標的遺伝子の mRNA を認識し、その変性、翻訳抑制により遺伝子発現を抑制する。siRNA とともに RNA 干渉(RNAi)という普遍的な現象の重要な一経路を形成している miRNA は、個体発生時の細胞増殖・分化における遺伝子発現制御に重要な役割を果たしており、成体においても生理機能維持や病態形成に深く関与している。心血管系領域においても、種々の病態モデルマウスや移植時の心臓における miRNA の発現プロファイルが明らかにされ、特定の miRNA の心血管系における機能が遺伝子改変マウスを用いて解析され、その病態に深く関与していることが示されている。一方、これまでの研究は生成された miRNA が同じ細胞内で作用するという観点から行われてきたが、最近、細胞から放出されるエクソソーム内に miRNA が存在し他の細胞(レシピエント細胞)に輸送されるという報告(Valadi, *et al. Nature Cell Biol.*2008;10:1470-76)や、レシピエント細胞内でその効果を発現するという報告(Zernecke, *et al. Sci Signal.* 2009;2:ra81)が相次ぎ、細胞間コミュニケーションを担う nucleic acid hormone とし

ての新たな機能に注目が集まっている。
エクソソーム内の miRNA は RNase、酸、凍結・解凍に曝露されても安定して存在し、唾液、乳汁、肺胞液、尿中においても検出される。申請者らの検討においても、これまでの報告と同様、心筋梗塞後早期の循環血漿中エクソソーム分画における心筋特異的 miRNA 濃度の上昇を認めており、H9C2 ラット培養筋芽細胞の検討においても培養液中に miRNA を検出している。エクソソームを介した miRNA の輸送、レシピエント細胞における機能発現の機序は徐々に明らかにされつつあり、細胞間相互作用の一大経路としての可能性が諸報告により提示されている。心筋細胞におけるエクソソーム放出、取り込みの機序については未だ報告がないが、その可能性や潜在的な病態生理学的意義から検討が必要であると考えられる。エンドサイトーシスを介して取り込まれるエクソソームは細胞内でエンドソームとして集められ、再度細胞外へエクソソームとして放出されるか、ライソゾームで処理されるかのいずれかとされている。貪食による取り込みも報告されているが(Feng, *et al.* Traffic;2010:*in press*)、ファゴソームにおける外来 miRNA の動態は大部分が不明であり、エンドソーム同様、miRNA の機能発現が確認された場合、新たな経路の同定につながるため独創的な検証であると考えられる。これらの点から、外来 miRNA の動態、その機能発現を評価することは、心病態の新たな概念、治療戦略の創成に寄与すると期待される。

２．研究の目的
本研究は新規の遺伝子発現制御因子である microRNA(miRNA)について、心筋による miRNA の生理的取り込み、放出機構と細胞機能への影響を解明し、虚血性心筋障害における新たな増悪/代償機構を検証することにより、虚血性心疾患の発症予防、進展予防に向けた新規の治療概念を創成するための研究基盤を確立することが目的である。

３．研究の方法
1）心筋の miRNA の放出機序の解明

①虚血性心疾患における循環血漿中 miRNA のプロファイルの検証
急性冠症候群症例において血液サンプルを採取し、心筋特異的 miRNA のプロファイルを定量リアルタイム PCR 法にて非急性冠症候群症例と比較する。

②心筋細胞の miRNA 放出のトリガーとなる刺激の検索
ラット培養筋芽細胞(H9C2)を用いて、心筋虚血時の様々なストレスを再現する刺激を行い、培養液中に放出される心筋特異的 miRNA を定量リアルタイム PCR 法にて検出する。検出を試みる miRNA としては、急性心筋梗塞時に血漿濃度が上昇すると報告されている心筋特異的な miRNA-1, -133a, -208a を考えている。

③エクソソーム放出阻害による放出 miRNA のプロファイルの変化
エクソソーム放出に関与する分子はこれまでいくつか報告されており、それらについて培養筋細胞においてレンチウィルスベクターを用いた siRNA にて機能抑制を行い、放出 miRNA のプロファイル変化や生存能を評価する。また、miRNA 放出を阻害すると報告された GW4869 についても同様の検討を行う。

2)外来 miRNA の細胞内取り込み機序の検討

①細胞貪食したマクロファージ内の他細胞由来 miRMA の動態の解明
申請者らは miRNA の過剰発現系を確立済みである。この系を用い心筋特異的 miRNA-208a を過剰発現させたヒト培養胎児腎細胞(293FT)にアポトーシスを誘導する。マウス腹腔内マクロファージを採取し、培養後にそのアポトーシス細胞を貪食させ、miRNA-208a の動態を検証する。定量リアルタイム PCR 法を用いて発現量の経時的変化を観察する。

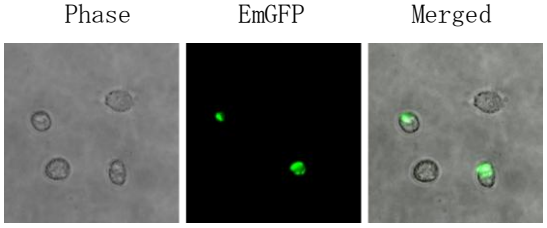

図 1:マウス腹腔内マクロファージによるアポトーシス 293FT 細胞の貪食　(X40)

②筋細胞のエクソソーム取り込みの評価
293FT 細胞にレンチウイルスベクター、リン酸カルシウム法を用い、EmGFP 遺伝子を導入する。導入後、無血清培地で 96 時間培養し、培養液を 4℃、110,000g、2 時間の超遠心にてエクソソームを単離する、H9C2、C2C12 培養細胞とともに 48 時間培養し、EmGFP の mRNA をリアルタイム PCR 法で確認する。タンパク発現は蛍光顕微鏡、ウエスタンブロット法で確認する。エクソソームには miRNA の他、mRNA も存在しており、レシピエント細胞においてタンパク翻訳されることが示されてい

る (Valadi, *et al. Nature Cell Biol.* 2008;10:1470-76)。さらにエクソソームはレトロウイルス(HIV)やプリオン蛋白の輸送体ともされ、レトロウイルスであるレンチウイルスのエクソソーム内の有無を、ウイルス構造蛋白をコードする gag に対するリアルタイム PCR 法で確認する。確認された場合、レンチウイルスを含むエクソソームを利用した生体への遺伝子導入の可能性をマウス投与にて検証する。エクソソーム単離の確認は、そのマーカーとされる CD63 で評価する。ラット培養心筋細胞でも同様の実験を行う。

③外来 miRNA の標的遺伝子発現抑制の評価

エクソソーム放出を促進する試薬にて筋細胞を刺激する。刺激後、無血清培地で 96 時間培養し、培養液を 4℃、110,000g、2 時間の超遠心にてエクソソームを単離する。miRNA ルシフェラーゼレポーター遺伝子(図 2)を導入した 293FT 細胞とともに 48 時間培養し、ルシフェラーゼ活性の低下の有無を検証する。

図 2 ： miR-133a ルシフェラーゼレポーター

3)外来 miRNA が及ぼす心筋とマクロファージへの影響

リン酸カルシウム法にて miRNA-15b を導入した 293FT 細胞からエクソソームを単離する。HEK293 細胞に外来 miRNA を過剰発現させるとエクソソーム内にその miRNA が多量に放出されることが示されている(Kosaka, *et al. J Biol Chem*;2010:in press)。単離したエクソソームを新生仔ラット心筋細胞、採取したマウス腹腔内マクロファージと培養する。また、前述した急性冠症候群症例における血中のプロファイルに応じた miRNA をそれぞれの細胞にレンチウイルスベクターを用いて過剰発現させる。その上で以下の項目について評価を行う。

①□生存能の評価

TUNNEL 染色、Annexin A5 にてアポトーシスの評価を行う。PI(propidium iodide)アッセイ、MTT アッセイにて生存能を評価する。

②マクロファージの貪食能の評価

ラテックスビーズを取り込ませ、その数を測定する。

③マクロファージが分泌するサイトカインの検索

炎症性 (IL-6、TNFαなど)、抗炎症性サイトカイン(IL-4、IL-10、TGFβなど)の発現を定量リアルタイム PCR 法にて、mRNA レベルで評価する。

４．研究成果

miRNA は血清中にも存在し、細胞から放出されたエクソソーム内に存在している。虚血性心疾患患者における心筋特異的 miRNA の血清レベルについてリアルタイム PCR 法を用いて定量した結果、miR-1、-133a の増加を認めた(図 3)。

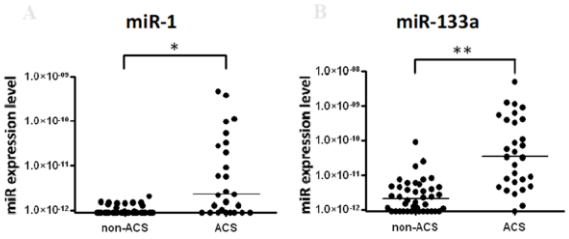

図 3：循環血漿中 miRNA レベル

この増加が虚血心筋によるエクソソームを介する microRNA 放出の増加に由来するとの仮説を立て、それを検証するために、まずトリガーとなる刺激をラット培養筋芽細胞 H9c2 を用いて検索した。その結果、細胞内に Ca イオンを流入させる A23187 イオノフォア(A23187)が用量依存的に細胞培養液中 microRNA レベルを上昇させることを見出した(図 4)。

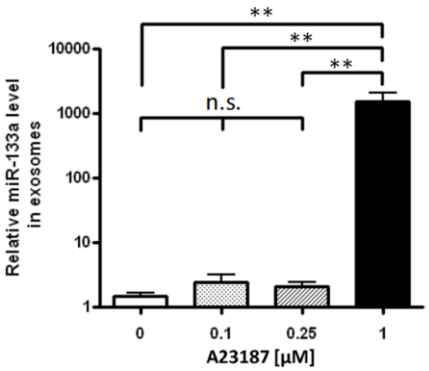

図 4：エクソソーム中 miR-133a レベル

さらに A23187 刺激により放出されたエクソソームを抽出し、miR-133a ルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入した 293FT 細胞とインキュベートするとルシフェラーゼ活性が低下した(図 4、5)。エクソソーム内 microRNA が細胞に取り込まれ、その機能を発現しうることを示した。

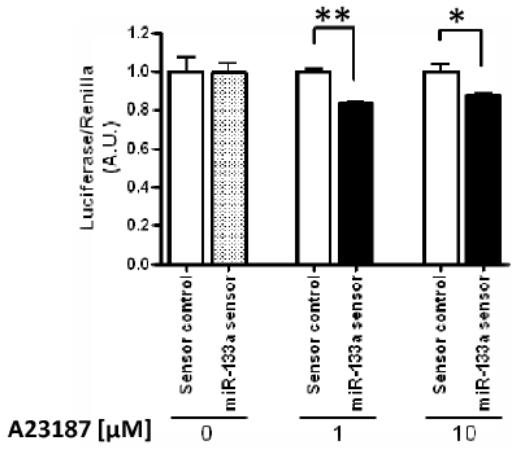

図 5:ルシフェラーゼレポーターアッセイ

これは虚血心筋から放出されたエクソソームが正常心筋や心臓内の他の細胞種、あるいは遠隔臓器に拡散し、取り込まれ、外来性 miRNA が作用を及ぼしうることを示唆し、miR-1、-133a の血清レベル上昇が虚血性心疾患の病態に寄与している可能性を示すものである

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）

〔学会発表〕（計１件）
桑原康秀、尾野亘、堀江貴裕、西仁勇、木下美菜子、渡邉真、中島康弘、長央和也、長谷川浩二、小島洋児、北徹、木村剛、マイクロ RNA-1 とマイクロ RNA-133a は急性冠症候群患者の有用な早期診断バイオマーカーである 、アメリカ心臓学会、2010 年 11 月 13-17 日、シカゴ

６．研究組織
(1)研究代表者
西　仁勇（NISHI HITOO）
京都大学・医学研究科・研修員
研究者番号：70583194