

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790164

研究課題名(和文)エクソソーム由来分泌型miRNAを用いた新規動脈硬化評価法の開発

研究課題名(英文)Evaluation of circulating miRNA in exosomes for novel biomarker of arteriosclerosis

研究代表者

岩城 壮一郎(Iwaki, Soichiro)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・講師

研究者番号：60399962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、miRNAが動脈硬化症発症のマーカーとなり得るかどうか検討するため、名古屋市立大学病院心臓・腎高血圧内科を受診した患者の血液よりより単離したmiRNAをマイクロアレイを用いて解析することで、特異的な発現を示す分泌型miRNAの候補を得た。本申請ではさらに、リアルタイムPCR法によるmiRNAの検出方法について、miRNA抽出法や反応条件の検討を行った。現在我々は、これらの得られたmiRNA候補のスクリーニングを進めている。

研究成果の概要(英文)：To identify the novel miRNA markers for arteriosclerosis, we first screened total RNA samples derived from patient's plasma using a microarray platform. As a result, several circulating miRNAs were identified to be differentially expressed. We also demonstrated that optimal RNA extraction method of miRNA from human plasma samples for quantitative PCR. These results suggest that circulating miRNAs are available as a novel biomarker to assess the arteriosclerosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：miRNA バイオマーカー 動脈硬化症

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化の発症は血管内皮機能の障害により始まる。この段階では薬物療法や補充療法、生活習慣改善などにより症状の改善が可能であるが、症状が進展すると平滑筋の増殖やプラーク形成、石灰化へと至り治療抵抗性となるため、より早期の診断と治療開始が必要である。しかしながら、動脈硬化症は遺伝的素因に対して種々の環境因子が複雑に関与するため、それぞれの危険因子の寄与度や治療に対する応答は患者により異なる。そのため、個々の患者の症状を正確に評価する方法の開発が必要とされている。

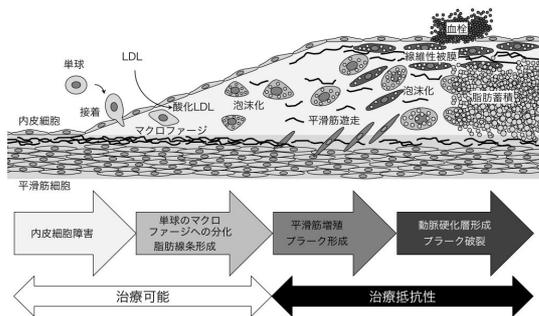


図1. 動脈硬化は早期発見・早期治療が重要である

近年、病態の診断や予防、治療への反応性や効果などの予測を目的とした各種マーカーの開発が注目されており、疾病の予防やオーダーメイド医療への応用が期待されている。血管内皮機能障害のバイオマーカーとしては、血管内皮細胞から産生される一酸化窒素 (NO) の代謝産物である NOx や、NO のセカンドメッセンジャーの cGMP が、また血管内皮障害を反映した因子としては細胞接着分子 (VCAM-1、ICAM-1)、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1 (PAI-1)、von Willebrand factor (vWF) 等が候補とされてきた。しかしながら、これらの因子は血流依存性血管拡張反応検査 (FMD) や脈波伝播速度 (PWV) 等の、既知の血管内皮機能測定法や動脈硬化の進展度との間に緩やかな相関が見られるものの、血管内皮機能障害の評価には十分ではない。

低分子ノンコーディング RNA の一種である miRNA は、標的の遺伝子やタンパク質の発現を微調整することで発生や形態形成、アポトーシス、細胞増殖、生殖機能等の様々な生物学的機能に関与している。近年、エクソソームのような小胞顆粒に包埋されて体内を循環する、分泌型 miRNA が大きな注目を集めている。分泌型 miRNA は、がんをはじめ

めとした疾患の病態や進行度合いなどの生理状態によってその発現量や種類が大きく変動することが知られ、血液を利用した低侵襲性の診断用バイオマーカーとして期待されている。しかしながら、動脈硬化発症の指標となる分泌型 miRNA の存在はまだ明らかにされていない。

これまでに申請者らは、miRNA が動脈硬化発症のマーカーとなり得る可能性に着目し、動脈硬化モデルマウスの組織に特異的な発現を示す miRNA をマイクロアレイ法により探索した。その結果、両群間で2倍以上発現が変化する miRNA 群を得た。また、申請者らはこれまでに、名古屋市立大学病院心臓・腎高血圧内科の外来を受診した、古典的な心血管危険因子 (高血圧、脂質異常症、糖尿病、喫煙) を有する無症候かつ無治療の患者における分泌型 miRNA の発現を検討し、特定の miRNA の発現が有意に変動することを見出した (Sun, Iwaki et al. *Thrombosis J*, 2012)。従って、動脈硬化発症の指標となる分泌型 miRNA が存在する可能性は非常に高い。

2. 研究の目的

本申請課題では、血中を循環する分泌型 miRNA の測定による新規動脈硬化評価法の開発を目指し、以下の項目について検討を行った。

- (1) 動脈硬化の発症に特異的な分泌型 miRNA の同定を目指したマイクロアレイ法による発現解析
- (2) 動脈硬化発症に特異的な miRNA を微量の血液から効率よく検出する条件の確立

3. 研究の方法

名古屋市立大学病院心臓・腎高血圧内科を受診した冠動脈疾患 (coronary artery disease; CAD) の疑いがあり冠動脈造影上 CAD を有する患者 36 名および CAD を有さない患者 31 名を対象としてインフォームドコンセントを得た後、名古屋市立大学医学研究科倫理審査委員会の承認のもと EDTA 法で採血を行った。遠心分離により血漿を得た後、total RNA を抽出した。miRNA の発現は miRNA アレイにより検討を行った。また、定量 PCR は TaqMan MicroRNA Assays および TaqMan Fast Advanced Master Mix を用いて行った。反応終了後、増幅曲線を確認し、 $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて相対定量を行った。

4. 研究成果

心血管疾患の既往歴を有する患者を対象として血漿中 miRNA の発現を検討し、特定の miRNA の発現が有為に変動することを見いだした。本申請ではさらに、リアルタイム PCR 法による miRNA の検出方法について、miRNA 抽出法や反応条件について最適化を行った。現在我々は、これらの得られた miRNA 候補のスクリーニングを進めている。

今後は、本研究によって得られた miRNA 候補の標的遺伝子の同定や培養細胞への導入を行うこと等により、miRNA による動脈硬化症の進行への影響を検討する予定である。

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)

[雑誌論文](計6件)

1. Shiori Ito, Soichiro Iwaki, Rie Kondo, Masashi Sato, Kazuya Iwabuchi, Ryunosuke Ohkawa, Yuko Mishima, Yutaka Yatomi, Tomoo Furumoto, Hiroyuki Tsutsui, Satoshi Fujii. TNF- α production in NKT cell hybridoma is regulated by sphingosine-1-phosphate: Ramifications of correlation between plasma S1P levels and metabolic syndrome. *Coron Artery Dis*, 2014, **25**: 311-320. (査読あり) doi: 10.1097/MCA.0000000000000082.
2. Shiori Ito, Soichiro Iwaki, Keiko Koike, Yuichiro Yuda, Ayako Nagasaki, Ryunosuke Ohkawa, Yutaka Yatomi, Tomoo Furumoto, Hiroyuki Tsutsui, Burton E Sobel, Satoshi Fujii. Increased Plasma Sphingosine-1-Phosphate in Obese Subjects and Its Capacity to Increase Expression of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Adipocytes. *Coron. Artery Dis*, 2013, **24**: 642-650. (査読あり) doi: 10.1097/MCA.0000000000000033.
3. Naoki Mizutani, Misa Kobayashi, Sayaka Sobue, Masatoshi Ichihara, Hiromi Ito, Kouji Tanaka, Soichiro Iwaki, Satoshi Fujii, Yurie Ito, Keiko Tamiya-Koizumi, Akira Takagi, Tetsuhito Kojima, Tomoki Naoe, Motoshi Suzuki, Mitsuhiro Nakamura, Yoshiko Banno, Yoshinori Nozawa, Takashi Murate. Sphingosine kinase 1 expression is downregulated during differentiation of Friend cells due to decreased c-MYB. *Biochim Biophys Acta*, 2013, **1833**: 1006-1016. (査読あり) doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.01.001.
4. 岩城壮一郎, 松井恵利華, 藤井 聡. スフィンゴシン 1-リン酸のヒト皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン産生に及ぼす影響. *日本褥瘡学会誌*, 2013, 15 巻, 8-14. (査読あり) <http://mol.medicalonline.jp/library/journal/abstract?GoodsID=du9jokso/2013/001501/002&name=0008-0014>
5. Xiao Sun, Zhang Man, Akimasa Sanagawa, Chieko Mori, Shiori Ito, Soichiro Iwaki, Hiroki Satoh, Satoshi Fujii. Circulating microRNA-126 in patients with coronary artery disease: correlation with LDL cholesterol. *Thrombo J*, **10**: 16. (査読あり) doi: 10.1186/1477-9560-10-16.
6. Soichiro Iwaki, Shuhei Yamamura, Moyoko Asai, Burton E. Sobel, Satoshi Fujii. Posttranscriptional regulation of expression of plasminogen activator inhibitor type-1 by sphingosine 1-phosphate in HepG2 liver cells. *Biochim Biophys Acta*, 2012, **1819**: 1132-1141. (査読あり) doi: 10.1016/j.bbagr.2012.07.001.

[学会発表](計8件)

1. Satoshi Fujii, Shiori Ito, Yuichiro Yuda, Erika Matsui, Soichiro Iwaki. The effects of sphingosine-1-phosphate on collagen expression in human skin fibroblasts. 第4回世界創傷治癒学会連合会議, パシフィコ横浜, 2012年9月6日.
2. 藤井 聡, 真川明将, 伊藤史織, 岩城壮一郎, 森智恵子, Zhang Man, 杉浦知範, 土肥靖明, 山下純世, Xiao Sun, 木村玄次郎. マイクロ RNA: 血管障害を早期に検出可能とする新しいモダリティー. 第35回日本高血圧学会総会, ウェスティンナゴヤキャッスル, 2012年9月21日.
3. 真川明将, Xiao Sun, Zhang Man, 森智恵子, 伊藤史織, 岩城壮一郎, 藤井 聡.

マイクロ RNA-126 と LDL コレステロールの関係：冠動脈疾患での影響。第 35 回日本高血圧学会総会，ウェスティンナゴヤキャッスル，2012 年 9 月 21 日。

4. 伊藤史織、岩城壮一郎、大川龍之介、矢富 裕、古本智夫、筒井裕之、藤井 聡。高血圧症および脂質異常症患者における血中スフィンゴシン 1-リン酸濃度の解析。第 35 回日本高血圧学会総会，ウェスティンナゴヤキャッスル，2012 年 9 月 21 日。
5. 真川明将、岩城壮一郎、浅井萌子、榊原大輔、乗本裕明、長崎彩子、山村周平、藤井 聡。低酸素下の HepG2 細胞における S1P を介した PAI-1 発現制御機構の解明。第 85 回 日本生化学大会，マリンメッセ福岡，2012 年 12 月 16 日。
6. 岩城壮一郎、真川明将、吉川 優、浅井萌子、榊原大輔、山村周平、藤井 聡。S1P は PAI-1 の発現を調節することで血液線溶系を制御する。第 14 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム，日本薬学会長井記念ホール，2013 年 6 月 1 日。
7. 高橋朋弘、田上辰秋、岩城壮一郎、藤井聡、尾関哲也。善玉コレステロール (HDL) 様ナノ粒子の創製とその物性評価。第 22 回 DDS カンファランス，静岡，2013 年 9 月 6 日。
8. 伊藤史織、岩城壮一郎、岩淵和也、藤井聡。NKT 細胞ハイブリドームにおける S1P 受容体を介した TNF- α 発現調節機構および遊走制御の解析。第 86 回日本生化学会大会，パシフィコ横浜，2013 年 9 月 13 日。

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/szg/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩城 壮一郎 (IWAKI SOICHIRO)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号：60399962

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者
なし