

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24790559

研究課題名(和文)冠動脈内皮障害の包括的早期診断を目指したmicroRNA解析による探索的研究

研究課題名(英文)Comprehensive study for detection of coronary endothelial dysfunction using microRNA array analysis

研究代表者

杉浦 知範(Sugiura, Tomonori)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60535235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：健常喫煙者を対象として禁煙前後での流血中のmicroRNAを検討した結果、microRNA 126が増加することを見出し、血管内皮に関連したmicroRNAは病態変化により変動することを確認した。また、心血管危険因子を有する患者において血液中のセロトニン濃度は酸化ストレスや冠動脈疾患の罹患と有意に関連を認め、セロトニンと酸化ストレスを軸とした治療戦略は動脈硬化性疾患患者の診療に有用な方策と考えられた。さらに、冠動脈疾患の有無、区分により、流血中の内皮関連microRNAの発現変化を確認し、冠動脈内皮障害の指標としての可能性が示唆された。引き続き、バイオマーカーとして有用性を検討している。

研究成果の概要(英文)：Vascular endothelial damage was improved and plasma levels of circulating microRNA-126 were increased after 8 weeks of smoking cessation, demonstrating variable circulating levels of microRNA in different conditions. The ratio of plasma/whole blood serotonin concentration showed significant association with oxidative stress in individuals with cardiovascular risks, and is a significant determinant of the incidence of coronary artery disease. Targeting serotonin-oxidative stress axis as a part of a holistic anti-atherothrombotic strategy is potentially beneficial in patients with atherosclerosis. Moreover, damages in the coronary endothelium affect circulating levels of endothelium-derived microRNAs. Further examination is necessary to establish the clinical significance of microRNAs.

研究分野：動脈硬化

キーワード：動脈硬化 マイクロRNA 血管内皮 酸化ストレス 高血圧 喫煙 脂質異常 冠動脈

1. 研究開始当初の背景

血管内皮は血管の恒常性維持に重要な血管構成成分である。生体内での炎症や酸化ストレスの増大は内皮障害の主要な誘引となり、血管内皮が障害されるとこれらのバランスが崩れ、血管トーンや血管構造の破綻へとつながる。このため血管内皮障害は動脈硬化の第一段階と考えられており、動脈硬化を予防する上で内皮を保護し、内皮機能を維持することが重要である。心血管病は内皮機能障害から進行し、やがて虚血性心疾患などに進展する。また、内皮障害時における血栓の増大機構は一樣ではなく、プラーク組成、血小板、凝固・線溶系のバランス、炎症・酸化ストレス関連因子が複雑に作用している。

セロトニンは生理活性脂質として機能することが明らかになっているが、内皮細胞や平滑筋細胞の分化・増殖・遊走など血管の成熟過程や、eNOSの活性化を介して血管の収縮弛緩や血流量の調節、血栓形成の抑制など関わっていることが報告されている。我々の施設における検討でも動脈硬化の初期段階においては血漿セロトニン濃度が上昇しており、内皮機能に関連して変動することが確認され、セロトニンに関連した内皮機能低下の機序としては炎症、酸化ストレスが背景に存在すると考察している。近年、RNAのsplicingにより産生されるmicroRNAは遺伝情報を持たないものの、タンパクへの翻訳を制御して重要な要素を反映しているという報告がなされている。また、microRNAのレベルは産生、分泌、細胞での取り込みで決定されるが、治療による変動に注目した研究は皆無である。そこで今回我々は心血管危険因子を有する血管内皮が障害された患者および冠動脈疾患患者に対し、内皮機能や内皮依存性生理活性物質とともに、内皮に関連したmicroRNAを網羅的に解析し、治療介入による動態を明らかにする。

2. 研究の目的

動脈硬化病変がある程度進行した病態である冠動脈疾患患者における血管内皮機能、内皮作動性物質の測定に加えて、microRNA解析を行って冠動脈内皮障害を包括的かつ簡便に判断できるようになれば冠動脈疾患の早期診断・早期治療に結びつき、社会全体の利益になると期待される。

3. 研究の方法

➤ 試験

まず、プレリミナリーな試験として血管内皮障害の初期段階と考えられる健常喫煙者を対象として禁煙前後でmicroRNA解析を行い、内皮に関連したmicroRNAに変化が現れるか検討した。健常男性喫煙者30名(平均年齢42歳)を登録し、禁煙指導を行い、8週間前後で血管内皮機能測定および流血中のmicroRNA解析を実施した。禁煙の指標として問診に加えて血液中のコチニン濃度を測定した。

➤ 試験

次いで生活習慣病を有する患者において血管内皮に関連した指標のなかから冠動脈疾患の診断に有用で内皮障害の可能性を示唆する項目の検討を行った。心血管危険因子を有し、過去にイベントの既往のない132人の外来通院患者を対象とし、血漿中および全血中のセロトニン濃度をHPLC法で測定した。血漿中は放出されたセロトニン濃度を、全血中は貯蔵および放出されたセロトニンの総濃度を示し、乏血小板血漿を採取するため処置には細心の注意を払った。血清中のderivative reactive oxygen metabolites (d-ROM)を測定し、酸化ストレスを定量化した。

➤ 試験

最後に、冠動脈疾患患者を対象として血管内皮機能、内皮作動性物質、炎症・酸化ストレス、血栓、凝固線溶因子に加えて、microRNAの網羅的解析を行い、冠動脈内皮障害の指標となりうるか検討した。

検討項目は理学的所見（血圧、脈拍）、動脈硬化検査（脈波検査）、内皮機能検査（RH-PAT）、血液検査（血算、生化学一般、血清脂質ならびにリポタンパク分画、高感度CRP、酸化ストレスマーカー[MDA-LDL, d-ROM]、内皮依存性生理活性物質[セロトニン、S1P]）および microRNA アレイ解析である。主要評価項目は、（1）従来の血管内皮障害の評価法である反応性充血を用いた血管内皮機能検査、（2）血管内皮の修復要素としての流血中前駆細胞、S1P やセロトニンを含めた生理活性物質、凝固・線溶系因子などの血液検査、（3）microRNA による内皮・血栓凝固に関連した網羅的解析である。冠動脈疾患患者の冠動脈形成術や薬物などの治療介入前後でこれらの指標を総合的に検討し、冠動脈病変の有無、病変の進行・再狭窄、ステント血栓症の発症との関連を調査することにより、病変の有無や治療効果の判定を低侵襲で評価することである。それらを簡便に判断できるようになれば冠動脈疾患有無や再発の早期診断・早期治療に結びつき、医療社会全体の利益になると考えた。対象は安定狭心症疑い、あるいは無症候性の冠動脈疾患の診断で名古屋市立大学病院を受診され、初めて心臓カテーテル検査の目的で精査入院となった患者とし、40 症例を登録した。急性心筋梗塞や不安定狭心症の患者、過去に心筋梗塞の既往のある患者は除外した。

4. 研究成果

➤ 試験

登録時、血清中のコチニン濃度は血管内皮機能の指標である RH-PAT index と負の相関を示し ($r=-0.48, P<0.01$)、脂質や代謝指標とも有意な相関を示した。30 症例中 13 症例のみで禁煙を達成した影響か、全症例で検討すると 8 週間後に RH-PAT index は有意な変化を認めなかった。しかしながら、RH-PAT index の変化率は収縮期血圧の変化率と有意に負の相関を示した ($r=-0.54, P<0.01$)。禁煙

を達成した症例では RH-PAT index と microRNA 126 が有意に増加していることが確認された ($P<0.05$)。8 週間の禁煙の後に内皮機能は改善し、流血中の microRNA 126 は有意に増加することが確認された。この結果により流血中の microRNA 126 が病態変化により変動することが確認され、特に禁煙による内皮障害からの回復を反映することが示唆された。

➤ 試験

血清 d-ROM 濃度は血漿セロトニン濃度、血漿/全血セロトニン濃度比と有意な相関を示した。さらに、d-ROM 濃度は、収縮期血圧、空腹時血糖、LDL コレステロールという心血管危険因子、および炎症の指標である CRP と有意な相関を示した。重回帰分析において、血漿/全血セロトニン濃度比と CRP は d-ROM と独立した関連を示した。132 名を対象の中で 25 名が冠動脈疾患の診断に至った。冠動脈疾患を有する患者は、冠動脈疾患を有さない患者に比して CRP、d-ROM、セロトニン濃度の有意な上昇を認めた。ロジスティック解析によりセロトニン濃度は冠動脈疾患の独立した規定因子であることが明らかになった。心血管危険因子を有する患者において血液中のセロトニン濃度は酸化ストレスや冠動脈疾患の罹患と有意に関連を認めた。これらの結果は血小板活性化と酸化ストレスには関連がありセロトニンと酸化ストレスは動脈硬化のプロセスにおいて重要な役割を果たすことを示唆しており、セロトニンと酸化ストレスを軸とした治療戦略は動脈硬化性疾患患者の診療に有用な方策と考えられる。

➤ 試験

冠動脈造影の結果、冠動脈に器質的病変を認め (C 群 : AP)、心臓カテーテル治療を実施した症例が 18 例、冠動脈に病変を認めるもののカテーテル治療の適応とはならず薬物治療を実施した症例が 3 例、冠動脈に重症の

狭窄病変を認め、冠動脈バイパス術を実施した症例が2例、冠動脈に狭窄病変を認めず冠攣縮誘発試験陽性となり冠攣縮性狭心症の診断に至った症例(B群:VSA)が5例、冠動脈に有意狭窄病変を認めず冠攣縮誘発試験も陽性とならなかった症例(A群:normal)が12例であった。また、2015年3月までに登録患者のなかからnormal 7例、VSA 4例、APの9例の合計20症例に対してマイクロアレイ解析を実施した。

狭心症患者では正常患者に比して一般的な冠疾患危険因子の差に加えて酸化ストレスの指標であるd-ROMと炎症の指標であるCRPのレベルが有意に高値であった。

マイクロアレイ解析の結果から、A群(normal)と比較してB群(VSA)で発現増加を認めたmicroRNA 14項目、発現低下認めたmicroRNA 1項目、A群(normal)と比較してC群(AP)で発現増加を認めたmicroRNA 1項目、発現低下認めたmicroRNA 24項目、そしてA群(normal)と比較してB+C群(VSA+AP)で発現増加を認めたmicroRNA 5項目、発現低下認めたmicroRNA 30項目であった。

これらのなかから、特にmicroRNA 4688(miR-4688)はA群(normal)と比較してC群(AP)で発現低下しており、B+C群(VSA+AP)で評価しても有意に発現低下を認め、さらに個々の検体での発現頻度の高さから最も重要な標的候補と考え、検討を行った。miR-4688はヘマトクリット値や推定糸球体濾過量と正相関を示し($r=0.471$, $P<0.05$; $r=0.506$, $P<0.05$)、さらにmiR-4688は酸化ストレスの指標であるd-ROMと負の相関を示した($r=-0.766$, $P<0.01$)。しかしながら、miR-4688は指尖測定 of 血管内皮機能とは負の相関を示し、miR-4688にて判定される内皮機能は冠動脈を必ずしも反映しない可能性が示唆された($r=-0.551$, $P<0.05$)。一方、microRNA 1914(miR-1914)も同様にA群

(normal)と比較してB+C群(VSA+AP)で有意に発現低下を認めたが、さらにセロトニン濃度($r=-0.61$, $P<0.05$)および酸化ストレスの指標であるd-ROM($r=-0.63$, $P<0.05$)とも有意な相関を示した。これらの結果からmicroRNAは病態により変動しうる指標であり、冠動脈疾患および冠動脈内皮障害の指標としての可能性を有している。特に一部のmicroRNAでは病態に応じた変動を呈しており、今後さらなる解析を行うことにより、バイオマーカーとして有用な指標となりうるか検討していく予定である。

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 2件)

1. Sugiura T, Dohi Y, Yamashita S, Hirowatari Y, Fujii S, Ohte N. Serotonin in Peripheral Blood Reflects Oxidative Stress and Plays a Crucial Role in Atherosclerosis: Novel Insights toward Holistic Anti-atherothrombotic Strategy. *Atherosclerosis*. 246:157-60, 2016. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.01.015. (査読有り)
2. Sugiura T, Dohi Y, Yamashita S, Iwaki S, Ito S, Sanagawa A, Ohte N, Fujii S. Circulating Level of MicroRNA-126 may be a Potential Biomarker for Recovery from Smoking-Related Vascular Damage in Middle-Aged Habitual Smokers. *IJC Heart & Vasculature*. 7:83-7, 2015. doi: 10.1016/j.ijcha.2015.02.012 (査読有り)

[学会発表](計 6件)

[国際学会]

1. Tomonori Sugiura, Yasuaki Dohi, Sumiyo Yamashita, Yuji Hirowatari, Satoshi Fujii, Nobuyuki Ohte: Plasma Serotonin Reflects

Oxidative Stress and Plays a Crucial Role in Atherosclerosis: Novel Insights toward Holistic Anti-atherothrombotic Strategy.

Scientific Session of American Heart Association 2015, November 7-11, Orlando, USA

2. Tomonori Sugiura, Yasuaki Dohi, Sumiyo Yamashita, Shiori Ito, Akimasa Sanagawa, Soichiro Iwaki, Nobuyuki Ohte, Satoshi Fujii : Blood Pressure Reduction and Increase of Circulating MicroRNA-126 Indicate Improvement of Vascular Endothelial Damage After Smoking Cessation Intervention in Middle-aged Habitual Smokers. Scientific Session of American Heart Association 2014, November 15-19, Chicago, USA
3. Tomonori Sugiura, Yasuaki Dohi, Sumiyo Yamashita, Shiori Ito, Akimasa Sanagawa, Soichiro Iwaki, Nobuyuki Ohte, Satoshi Fujii: Smoking-Induced Vascular Damage is Associated with Decreased Plasma MicorRNA-126 and Persistent Elevation of Plasma Serotonin. Scientific Session of American Heart Association 2013, November 17-20, Dallas, USA

[国内学会]

1. 杉浦知範、土肥靖明、山下純世、藤井聡、廣渡祐史、大手信之 : Plasma Serotonin Reflects Oxidative Stress and Plays a Crucial Role in Atherosclerosis: Novel Insights Toward Holistic Anti-atherothrombotic Strategy
第 80 回日本循環器学会総会・学術集会 2016 年 3 月 18-20 日仙台国際会議場(宮城県、仙台市)
2. 杉浦知範、土肥靖明、山下純世、藤井聡、廣渡祐史、大手信之 : 心血管危険因子を有する患者における血液中セロトニン

濃度と酸化ストレスの関連

第 63 回日本心臓病学会学術集会 2015 年 9 月 18-20 日パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

3. 杉浦知範、土肥靖明、山下純世、大手信之、藤井聡 : Eight Weeks Smoking Cessation Improves Vascular Damage and Increases Circulating MicroRNA-126 in Middle-Aged Habitual Smokers
第 78 回日本循環器学会総会・学術集会 2014 年 3 月 21-23 日東京国際フォーラム(東京都、千代田区)

[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
名古屋市立大学大学院医学研究科心臓・腎高血圧内科学
<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/inter3dir/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者
杉浦 知範 (SUGIURA, Tomonori)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号 : 60535235

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし