

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460203

研究課題名(和文) 分泌型miRNAの測定による新規な動脈硬化発症・進展評価法の開発

研究課題名(英文) The development of novel biomarker for arteriosclerosis using circulating miRNAs.

研究代表者

岩城 壮一郎 (Iwaki, Soihiro)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号：60399962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、miRNAが動脈硬化発症のマーカーとなり得るかどうか検討するため、臨床血液サンプルより単離したmiRNAをマイクロアレイを用いて解析することで、動脈硬化発症の初期段階に特異的な分泌型miRNAの候補を得た。本研究では、ヒト臍帯静脈内皮細胞HUVECを用い、種々のサイトカイン類を用いて炎症状態を惹起することで、候補miRNAの発現を検討した。さらに、定量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および機能解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：To identify the novel miRNA markers for arteriosclerosis, we screened total RNA samples derived from patient's plasma using a microarray platform. We found that several circulating miRNAs were differentially expressed. We also demonstrated that expression of miRNAs was altered by various cytokine that induced the inflammation state in the human umbilical cord vein endothelial cells (HUVECs). Furthermore, we investigated the optimal RNA extraction method of miRNA from 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：分子生物学

キーワード：miRNA バイオマーカー 動脈硬化

## 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。

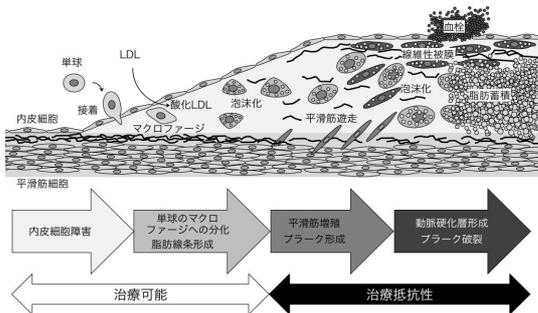


図 1. 動脈硬化は早期発見・早期治療が重要である

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

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本申請課題では本研究は分泌型 miRNA を利用した動脈硬化の新しい評価法の開発や診断キットへの応用に展開するための基盤となる研究を行った。

- (1) 動脈硬化発症早期に特異的な血中 miRNA の機能解析
- (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。

血管内皮機能障害を模倣するためヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC を用い、種々のサイトカイン類を用いて炎症状態を惹起し、得られたバイオマーカーの候補 miRNA の発現を検討した。

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5件)

1. Akimasa Sanagawa, Soichiro Iwaki, Moyoko Asai, Daisuke Sakakibara, Hiroaki Norimoto, Burton E. Sobel, Satoshi Fujii. Sphingosine 1-phosphate induced by hypoxia increases the expression of PAI-1 in HepG2 cells via HIF-1 . Mol Med Rep. 2016 Aug;14(2):1841-8. (査読あり) doi: 10.3892/mmr.2016.5451.
2. Motoshi Suzuki, Ke Cao, Seiichi Kato, Yuji Komizu, Naoki Mizutani, Kouji Tanaka, Chinatsu Arima, Mei Chee Tai, Kiyoshi Yanagisawa, Norie Togawa, Takahiro Shiraishi, Noriyasu Usami, Tetsuo Taniguchi, Takayuki Fukui, Kohei Yokoi, Keiko Wakahara, Yoshinori Hasegawa, Yukiko Mizutani, Yasuyuki Igarashi, Jin-ichi Inokuchi, Soichiro Iwaki, Satoshi Fujii, Akira Satou, Yoko Matsumoto, Ryuichi Ueoka, Keiko Tamiya-Koizumi, Takashi Murate, Mitsuhiro Nakamura, Mamoru Kyogashima, and Takashi Takahashi. Targeting ceramide synthase 6-dependent metastasis-prone phenotype in lung

cancer cells. J Clin Invest. 2016 Jan 4;126(1):254-65. (査読あり) doi: 10.1172/JCI179775.

3. Naoki Mizutani, Minami Inoue, Yukari Omori, Hiromi Ito, Keiko Tamiya-Koizumi, Akira Takagi, Tetsuhito Kojima, Mitsuhiro Nakamura, Soichiro Iwaki, Masahiro Nakatochi, Motoshi Suzuki, Yoshinori Nozawa, Takashi Murate. Increased Acid Ceramidase Expression depends on Upregulation of Androgen-dependent Deubiquitinases, USP2, in a Human Prostate Cancer Cell Line, LNCaP. J Biochem. 2015 Oct;158(4):309-19. (査読あり) doi: 10.1093/jb/mvv039.
4. Tomonori Sugiura, Yasuaki Dohi, Sumiyo Yamashita, Soichiro Iwaki, Shiori Ito, Akimasa Sanagawa, Nobuyuki Ohte, Satoshi Fujii. Circulating Level of MicroRNA-126 may be a Potential Biomarker for Recovery from Smoking-Related Vascular Damage in Middle-Aged Habitual Smokers. Int J Cardiol: Heart & Vasculature 2015, 7: 83-87. (査読あり) doi: 10.1016/j.ijcha.2015.02.012
5. Shiori Ito, Soichiro Iwaki, Rie Kondo, Masashi Sato, Kazuya Iwabuchi, Ryunosuke Ohkawa, Yuko Mishima, Yutaka Yatomi, Tomoo Furumoto, Hiroyuki Tsutsui, Satoshi Fujii. TNF-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 Jun;25(4):311-20. (査読あり) doi: doi: 10.1097/MCA.0000000000000082.

[学会発表](計11件)

1. Satoshi Fujii, Akimasa Sanagawa, Soichiro Iwaki, Moyoko Asai, Daisuke Sakakibara, Hiroaki Norimoto. The role of the HIF-1 /HuR pathway in increased expression of PAI-1 induced by sphingosine 1-phosphate in HepG2 cells rendered hypoxic. XXIIIrd International Congress on Fibrinolysis & Proteolysis and XVIth International Workshop on Molecular and Cellular

- Biology of Plasminogen Activation, 静岡, 2016年10月18日.
2. Satoshi Fujii, Misa Ogasawara, Soichiro Iwaki. Hypoxia induces dysregulation of mir-126 and affects VEGF and MMP-9 expression in endothelial cells. 2015 Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Toronto, Canada, 2015年6月22日.
  3. 藤井 聡、小笠原美沙、岩城壮一郎. 低酸素環境が血管内皮細胞由来 miRNA と血管内皮機能に与える影響の解析. 第37回日本血栓止血学会学術集会, 甲府市, 2015年5月22日.
  4. Tomonori Sugiura, Yasuaki Dohi, Sumiyo Yamashita, 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. American Heart Association's 2014 Scientific Sessions and Resuscitation Science Symposium, シカゴ, USA, 2014年11月18日.
  5. 水谷直貴、大森由佳里、小泉恵子、鈴木 元、高木 明、小嶋哲人、岩城壮一郎、藤井 聡、中村光浩、野澤義則、村手 隆. 転写因子 CREB による Sphingosine kinase 2 発現調節機序. 第87回日本生化学会大会, 京都, 2014年10月16日.
  6. 尾関哲也、高橋朋弘、田上辰秋、岩城壮一郎、藤井 聡. HDL 様金ナノ粒子製剤の創製と血管に対する抗炎症効果. 第30回日本 DDS 学会学術集会, 東京, 2014年7月30日.
  7. 長谷川 諒、伊藤史織、岩城壮一郎、岩淵和也、佐藤 雅、藤井 聡. NKT ハイブリドームにおける GLP-1 による S1P を介した TNF- 発現制御機構. 第36回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014年5月31日.
  8. 田上辰秋、高橋朋弘、岩城壮一郎、藤井 聡、尾関哲也. スフィンゴシン 1 リン酸/Aポリポタンパク A1 含有金ナノ粒子による炎症性動脈硬化に対する新規ドラッグデリバリーシステムの開発. 第15回 Pharmaco-Hematology シンポジウム, 名古屋, 2014年5月24日.
  9. 鈴木 元、小泉恵子、村手 隆、岩城壮一郎、藤井 聡、高橋 隆. 悪性腫瘍におけるスフィンゴ脂質代謝の果たす役割. 第15回 Pharmaco-Hematology シンポジウム, 名古屋, 2014年5月24日.
  10. 岩城壮一郎. スフィンゴ脂質が線溶系に与える影響の分子機構. 第15回 Pharmaco-Hematology シンポジウム, 名古屋, 2014年5月23日.
  11. 長崎彩子、湯田雄一郎、小池慶子、岩城壮一郎、藤井 聡. 低酸素環境における脂肪細胞の PAI-1 発現調節機構の検討. 第15回 Pharmaco-Hematology シンポジウム, 名古屋, 2014年5月23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
  - (4)研究協力者  
なし