

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460646

研究課題名(和文)循環器病のRNA診断による新規バイオマーカー探索

研究課題名(英文)Search for RNA biomarker of cardiovascular disease

研究代表者

中村 和人 (NAKAMURA, Kazuto)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：30456488

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)：血液から得られるRNAサンプルの遺伝子発現パターンを調べ、虚血性心疾患に特異的な新規のRNAバイオマーカーを探索・発見するため、健康人と急性冠症候群の患者における末梢血白血球のRNA発現パターンを比較した。TLR2, TLR4, CCR2, Annexin A1, FPR2, TREM1等の遺伝子に関して、正常群、高度狭窄冠動脈群で、発現量の違いに統計学的な有意差が得られた。前3者はすでによく報告されている遺伝子であるが、後3者と動脈硬化の関連はまだ極めて少なく、冠動脈疾患のバイオマーカーとして有用な可能性がある。

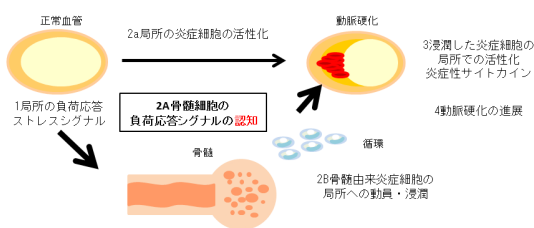
研究成果の概要(英文)：To identify novel mRNA biomarker from peripheral blood for ischemic heart disease, mRNA expression pattern was compared with patients with normal coronary and patients with acute coronary syndrome. On TLR2, TLR4, CCR2, Annexin A1, FPR2, and TREM1 mRNA, expression levels were statistically different between patients with normal coronary and patients with acute coronary syndrome. The first to third genes were already reported well, however forth to sixth genes are not yet less reported. The Annexin A1, FPR2, and TREM1 mRNA from human peripheral blood might be useful biomarker for ischemic heart disease.

研究分野：循環器内科学

キーワード：RNA診断 バイオマーカー 虚血性心疾患

1. 研究開始当初の背景

循環器病学が対象とする動脈硬化(血管リモデリング)、心不全(心筋リモデリング)、メタボリック症候群(脂肪組織リモデリング)などの主要な疾患の病因および進展には、炎症が共通してあることが、知られている。多くのバイオマーカーが、炎症によって惹起されるサイトカインや増殖因子などの何らかの生理作用を持つタンパク質を検出している。しかし、感染症や自己免疫疾患などとは異なり、上記の炎症は微小炎症であることも報告されており、そのことが炎症の検出すなわち病気になるいは病態の早期診断を困難にしている。その点、RNA はタンパク質に比べ、感度、特異度ともに高いと考えられることが、RNA 診断に期待される。循環器病においても多くの血液バイオマーカーの有用性が今まで検討されてきたが、そのほとんどは前記のような組織リモデリングに関わる炎症性サイトカインや増殖因子などのタンパク質のレベルでの検出である。多くの未知の分泌タンパク質がまだ存在し、種々の病態に対し、時には有効的に、また時には有害的に作用していると考えられる。また一部は血液中を検出しようとされ、生理作用のみでなく、バイオマーカーとしての意義も検討もされてきた。これらの分子は局所の心臓、血管および脂肪などの実質細胞が合成・分泌する場合もあるが、炎症担当細胞である各種の白血球が合成・分泌する場合もある。白血球は基本的には局所において活性化され、炎症性サイトカインなどを分泌すると考えられるが、局所に動員され、活性化される以前から、局所の負荷応答による局所由来のシグナルをサインとして認識していると考えられる。この(活性化ではなく)認識を mRNA レベルで検出できないかどうか? が最大の関心である。



2. 研究の目的

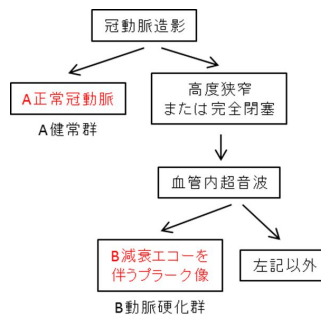
動脈硬化の発症、進展の過程は、炎症担当細胞である白血球がその病因に大きく関与しており、血管壁にかかる生物学的、化学的あるいは物理的なストレスなどに対する負荷応答としての慢性微小炎症の結果、血管壁がその負荷の種類や程度・規模に応じて、種々のシグナルを出し、それらが血液・循環を介し、骨髄中や循環血液中あるいは局所の白血球にシグナルとして認知させ、局所に動員される。その結果、血管壁で炎症およびその結果としての動脈硬化を起こす。これらの白血球の炎症の認知を mRNA レベルで検出することで、動脈硬化における慢性微小炎症の検出

を試み、虚血性心疾患のスクリーニングを行うことが、本研究の目的である。

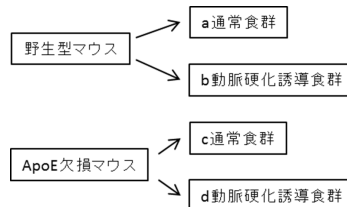
3. 研究の方法

(1) 健常状態および高度の動脈硬化の状態、末梢血白血球の mRNA レベルでの遺伝子発現パターンに違いがあるのかどうかを人およびマウスにおいて検討する。これには differential display (DD: 以下 DD 法)、Suppression Subtractive Hybridization (SSH: 以下 SSH 法) を併用する。

群わけ、血液サンプル採取と RNA 抽出
 人の場合: RNA 用の採血管で人血液サンプルを採取する。胸痛を主訴に心臓カテーテル検査を施行された症例のうち、冠動脈造影上、狭窄がない症例を健常群(A)とする。また急性冠症候群、すなわち不安定狭心症あるいは発症6時間以内の胸痛が残存するST上昇型の急性心筋梗塞の症例で、実際に冠動脈造影上、高度狭窄あるいは完全閉塞の所見を有し、特に血管内超音波で attenuation を伴うプラーク(いわゆる不安定プラーク)を有するような症例を動脈硬化群(B)とする。



マウスの場合: RNA 用の採血管でマウス血液サンプルを採取する。通常食を与えた野生型マウス(a)、動脈硬化誘導食を与えた野生型マウス(b)、通常食を与えた ApoE 欠損マウス(c)、動脈硬化誘導食を与えた ApoE 欠損マウス(d)の4群を準備し、血液サンプルを採取する。



人血液、マウス血液から、専用の抽出キットを使用し、mRNA を抽出する。

DD 法、SSH 法で、2 群間の mRNA の発現差のある遺伝子のスクリーニングを行う。

人血液由来 mRNA サンプルを用いて、マイクロアレイによる網羅的解析も施行する。

(2) 上記より、候補遺伝子を決定し、人血液由来 mRNA サンプルを用いて、real time PCR

で、健常群と動脈硬化群の各群の mRNA の発現差に関して、定量評価をする。

4. 研究成果

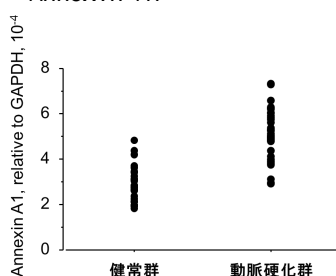
(1) ヒトおよびマウスの末梢血から、解析に十分かつ質の高い RNA を再現性良く抽出可能であった。

上記の両群間での RNA 発現パターンの違いに関して、SSH 法はキットが製造中止となり、DD 法のみによるスクリーニングを施行した。発現差のありそうな RNA は数十程度であったが、サンプル間の再現性に難があり、候補遺伝子の特定は容易ではなかった。

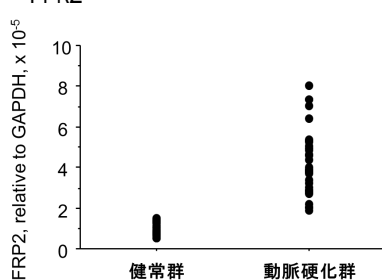
遺伝子の網羅的解析に関して、microarray に変わるより有用な解析法である次世代シーケンス (NGS) が開発された。正常冠動脈群 (N=3)、高度狭窄冠動脈群 (N=3) の末梢血から得られた RNA サンプルを、NGS のうちの RNA sequencing の受託解析を依頼し、現在、解析中である。

(2) DD 法の結果、既報を参考にし、mRNA バイオマーカー候補遺伝子として、TLR2, TLR4, CCR2, Annexin A1, FPR2, TREM1 の遺伝子に関して、健常群、動脈硬化群で、末梢血白血球由来の mRNA の発現量を real time PCR で比較した。

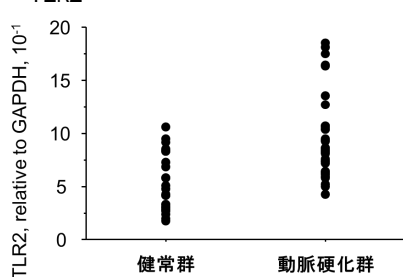
Annexin A1



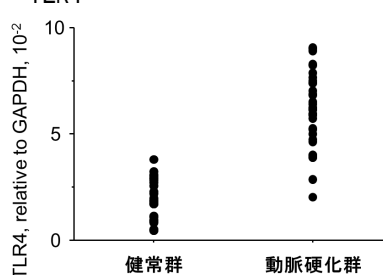
FPR2



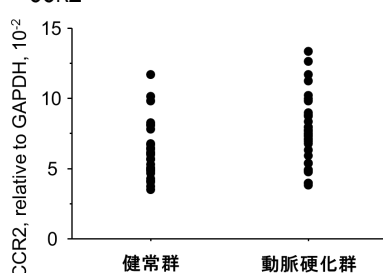
TLR2



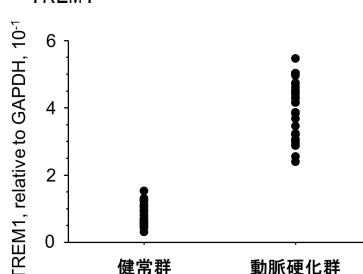
TLR4



CCR2



TREM1



いずれも健常群、N=27、動脈硬化群、N=35 で、 $P<0.05$ である。

今回の結果は、まだいくつかの問題を抱えており、バイオマーカーとしての検証は不十分である。虚血性心疾患に対する RNA バイオマーカーであると断定するには科学的には弱いと考えられ、発表に至っていないが、有力な候補と考えている。確たる RNA バイオマーカーが同定できれば、血液サンプルからの RNA がバイオマーカーとして診断に活用できるという点で、臨床的にもまれな応用例であり、極めて画期的で、インパクトの高いものと考えられる。

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 3 件)

1, Remnant lipoproteinemia predicts cardiovascular events in patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease.

Nguyen SV, Takamitsu Nakamura, Mnabu Uematsu, Daisuke Fujioka, Kazuhiro Watanabe, Yosuke Watanabe, Jun-ei Obata, Kazuto Nakamura, Kiyotaka Kugiyama

J Cardiol. 2017 Mar;69(3):529-535. doi:

10.1016/j.jjcc.2016.04.011.査読あり

2, Phospholipase A2 Receptor Gene Polymorphisms Alter its Functions and Present a Genetic Risk of an Increased Intima-Media Thickness of the Carotid Artery.

Si NV, Daisuke Fujioka, Kazuhiro Watanabe, Yosuke Watanabe, Kazunori Watanabe, Kazuto Nakamura, Kazuyuki Yamaguchi, Manabu Uematsu, Kugiyama Kugiyama
J Atheroscler Thromb. 2016 Oct 1;23(10):1227-1241.

doi:10.5551/jat.34330 査読あり

3, C-type lectin-like domain and fibronectin-like type II domain of phospholipase A2 receptor 1 modulate binding and migratory responses to collagen

Soichiro Takahashi, Kazuhiro Watanabe, Yosuke Watanabe, Daisuke Fujioka, Takamitsu Nakamura, Kazuto Nakamura, Jun-ei Obata, Kiyotaka Kugiyama

FEBS Letters 2015, 589, 7, 829-835, doi:10.1016/j.febslet.2015.02.016 査読あり

〔その他〕

ホームページ等

第二内科ホームページ

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/intern02/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 和人 (NAKAMURA, Kazuto)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：30456488

(2)研究分担者

川端 健一 (KAWABATA, Kenichi)

山梨大学・総合研究部・講師

研究者番号：30345706

渡辺 一広 (WATANABE, Kazuhiro)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：50535449

中村 貴光 (NAKAMURA, Takamitsu)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：60377512

藤岡 大祐 (FUJIOKA, Daisuke)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：70377513