

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2011 年 3 月 11 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 藤 井 聡
所属機関名：名古屋市立大学大学院
所属部署名：薬学研究科 職名：教授
所 在 地：名古屋市瑞穂区田辺通 3-1
電 話：0528363451 内線：



1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

早期動脈硬化症に特異的変動を示し血管病変を効率よく評価しうる新規バイオマーカーの同定と日本人・中国人での比較

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：藤井 聡	職名：教授
所属機関名：名古屋市立大学大学院薬学研究科	部署名：病態解析学
中国側研究者氏名：馬 明月	職名：教授
所属機関名：瀋陽医学院	部署名：環境医学

4. 当該研究における発表論文等

動脈硬化症の発症・進展に關与する microRNA の解析

平成 22 年度 名古屋市立大学大学院薬学研究科博士前期課程
論文内容要旨集 169-170 頁 森 智恵子

早期動脈硬化症に特異的変動を示し血管病変を効率よく評価しうる 新規バイオマーカーの同定と日本人・中国人での比較

研究者氏名 藤井 聡

日本研究機関名 名古屋市立大学大学院薬学研究科

共同研究者名 岩城 壮一郎、森 智恵子

中国研究者 馬 明月 教授

中国所属機関 瀋陽医科大学環境医学

共同研究者名 奉天医院副院長孫曉先生、循環器内科医師張曼先生

要旨:

高血糖状態は内皮細胞の機能を障害する。高血糖状態を模倣した 25 mM グルコース濃度で血管内皮細胞を培養したところ、通常血糖状態を模倣した 5 mM グルコース濃度で培養した細胞に比べて内皮細胞に特異的に発現するマイクロ RNA の一種である miR-126 の発現量が減少することが示された (リアルタイム PCR)。動脈硬化症の危険因子として高血圧および狭心症を持つ患者に対して、健常者との血漿中 miRNA-126 の発現量を比較した。各臨床検査値と miRNA-126 の発現量について Kendall の相関係数を求めた結果 miR-126 の発現量は血糖値との間に相関があることが示され、患者の miR-126 の発現量は健常者に比べて減少することが示された。miR-126 の発現量が減少したのは、血圧や血糖値の上昇により内皮細胞に傷害が生じ、内皮機能が低下したためではないかと推測される。以上のことから、miR-126 の発現変化は内皮機能の障害時期に特異的であり、動脈硬化症の病態を診断するのに有力な指標になり得ると考えられる。

Key Words 動脈硬化症, 冠動脈疾患, 高血圧症, 糖尿病, マイクロ RNA

緒言:

動脈硬化症の危険因子には、糖尿病や高血圧症、脂質異常症などの生活習慣病や肥満、喫煙、加齢、ストレスなどがある。また、その発症には血管内皮細胞の傷害が深く関与していることが知られている。血管内皮細胞が傷害を受けると、単球や好中球は内皮細胞へ接着し、内膜内への浸入へとつながり、単球のマクロファージへの分化やコレステロールの取り込みによる泡沫化を経て、内膜が肥厚し、さらにはプラーク形成が誘導される。この内皮細胞の傷害には、酸化 LDL や活性酸素、炎症性サイトカイン、スフィンゴ脂質などが関与している。なかでも、腫瘍壊死因子 (TNF- α) やスフィンゴシン1-リン酸 (SIP) は、E-セレクトリンや VCAM-1 などの内皮細胞表面における接着分子の発現を誘導し、単球などの内皮細胞への接着や血管壁内への侵入を促進することが知られている。最近では、このような内皮細胞の障害機構を制御する因子としてマイクロ RNA (miRNA) が注目を集めている。miRNA はタンパク質をコードしない低分子量 RNA であり、標的 mRNA の 3'-UTR に存在する認識配列と結合することで、mRNA の分解あるいは翻訳抑制を行うと考えられている。内皮細胞に特異的に発現する miRNA は、血管新生および内皮細胞の増殖や分化、アポトーシスに関与することが知られている。また、これらの miRNA は冠動脈疾患や糖尿病などで発現変化が見られることが報告されており、動脈硬化症にも深く関与していることが考えられる。

対象と方法:

本研究では、ヒト血管内皮細胞株 EA.hy926 細胞を用いて内皮細胞の機能障害に miRNA がどのように関わっているのか解析を行った。さらに、ヒトの血漿中 miRNA を測定することで動脈硬化症の危険因子による発現変化

を調べ、動脈硬化症の診断指標となり得るかを検討した。RNA は TRIzol[®] LS Reagent (Invitrogen) を用いて抽出した。その後、TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用い逆転写反応を行い、cDNA にし TaqMan[®] MicroRNA Assays を使用してリアルタイム PCR を行った。

結果:

本研究では、EA.hy926 細胞に対して SIP や TNF- α 、高血糖、低酸素によって刺激を行い、内皮細胞に特異的に発現する miR-126 および miR-221、miR-210 について、刺激に対する発現変化を検討した。SIP および TNF- α は VCAM-1 などの接着分子の発現を誘導することが知られている。SIP により miR-126 および miR-221 の発現量が増加することを見出した。しかし、TNF- α は miR-126 および miR-221 の発現量に影響を与えなかった。

高血糖状態は内皮細胞の機能を障害することが知られている。高血糖状態を模倣した 25 mM グルコース濃度で細胞を培養したところ、通常血糖状態を模倣した 5 mM グルコース濃度で培養した細胞に比べて miR-126 の発現量が減少した(図 1)。また、miR-221 の発現量も減少した。

動脈硬化病変では血栓形成による狭窄により虚血状態となることが知られている。低酸素 (1%O₂) によって miR-210 の発現量が増加した。さらに低酸素によって増加した miR-210 の発現量は、通常酸素状態に戻すと減少する傾向が見られた。

次に、動脈硬化症の危険因子として高血圧および狭心症を持つ 5 名に対して、健常者 5 名との血漿中 miRNA の発現量を比較した。各臨床検査値と miRNA の発現量について Kendall の相関係数を求めた結果、疾患の有無に関わらず、miR-126 および miR-221 の発現量は血糖値との間に相関があることが示され、患者の miR-126 の発現量は健常者に比べて減少することが示された(図 2)。miR-210 については、患者は健常者との発現量の差が見られなかった。

考察:

miR-126 は VCAM-1 の発現を抑制することが知られており、miR-126 は SIP による VCAM-1 の発現増加を抑制することが予想される。一方で、miR-126 は増殖因子を負に制御する Spred-1 を抑制することが知られており、VEGF を活性化させることでプラークの形成が促進されることが予想される。したがって、miR-126 は動脈硬化症に対して抑制と促進の両作用を示すと考えられる。また、miR-221 は SIP による eNOS mRNA の発現増加におけるネガティブフィードバック機構に作用し、血管拡張作用を抑制する可能性があると考えられる。さらに、miR-126 および miR-221 はそれぞれ VCAM-1 および E-セレクトチンを標的遺伝子とすることが予測されているが、本研究では TNF- α によって誘導されるこれらの接着分子の発現増加には関与していないことが示唆された。

高血糖状態は内皮細胞の機能を障害する。高血糖状態を模倣したグルコース濃度で細胞を培養したところ、miR-126 の発現量が減少したことから、miR-126 は血管内皮細胞における高血糖状態の指標となり、高血糖により内皮機能が障害されることが示唆された。動脈硬化病変では血栓形成による狭窄により虚血状態となることが知られている。低酸素 (1%O₂) によって miR-210 の発現量が増加したことから、miR-210 は血管内皮細胞における低酸素状態の指標となると考えられる。

高血圧および狭心症を持つ患者の血漿で miR-126 の発現量が減少したのは、血圧や血糖値の上昇により内皮細胞に傷害が生じ、内皮機能が低下したためではないかと推測される。以上のことから、miR-126 の発現変化は内皮機能の障害時期に特異的であり、動脈硬化症の病態を診断するのに有力な指標になり得ると考えられる。また、miR-221 も患者での発現量は減少していた。しかし、これまでに冠動脈疾患では miR-221 の発現量は増加するこ

とが報告されている。これらのことから、miR-221 の発現変化には治療の効果や病態の進行度などが関与している可能性があり、今後さらなる検討が必要である。miR-210 については、患者は健常者との発現量の差が見られなかったことから、患者群は治療で心筋虚血がコントロールされており、血管狭窄による虚血状態になっていないことが示唆された。

本研究によって、高血糖により血管内皮細胞での miR-126 の発現量が減少することが示された。また、血液サンプルでも血糖値の上昇により miR-126 の発現量が減少することが示された。以上のことから、miR-126 の発現変化は動脈硬化症の発症における内皮機能の障害に深く関与し、さらに、動脈硬化症に対して抑制と促進の両作用を持っていることが示唆された。また、miR-221 および miR-210 に関しても、動脈硬化症の発症段階において発現変化が見られると考えられる。したがって、これらの miRNA の発現変化は病態の診断バイオマーカーとなり、さらには治療標的としての有力な候補と見込まれるので瀋陽医学院、奉天医院と協力して研究を進めたい (図 3)。

図1 高血糖状態 (25 mM) では miR-126 の発現量は低下する

EA.hy926 細胞を 25 mM グルコースおよび 5 mM グルコースを添加した培地でそれぞれ培養し、さらに 24 時間血清飢餓処理を行った。その後、細胞を回収し、RNA を抽出して miR-126 の発現量をリアルタイム PCR により定量した。データは miR-16 で補正し、5 mM で培養したサンプルをコントロールとし、その発現量を 1 として相対値で示した。(n=3, *p<0.05 vs 5 mM Glucose)

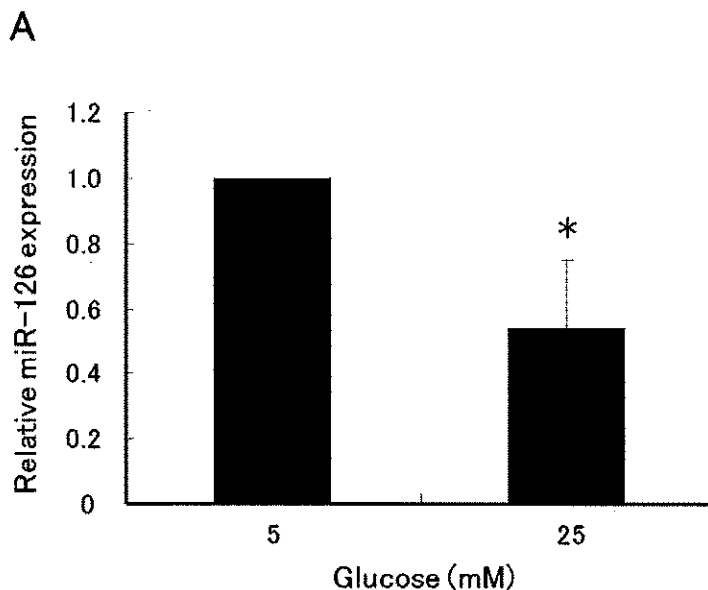


図2 血糖値に対する血漿中 miR-126 および miR-221 発現量の分布

血漿から RNA を抽出し、miR-126 の発現量をリアルタイム PCR により定量した。データは miR-16 で補正した。(Healthy control n=5, patient n=5) 相関分析の結果、miR-126 は相関係数 (Kendall の τ) = -0.911 、有意確率 (両側) = 0.001 となった。

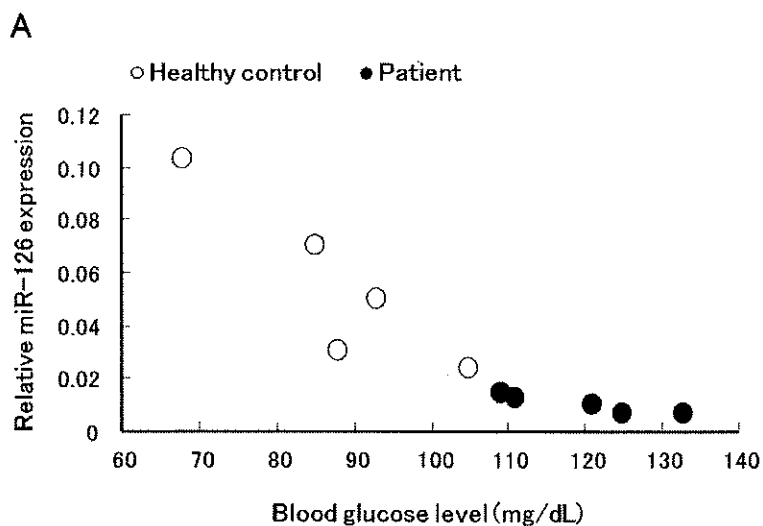
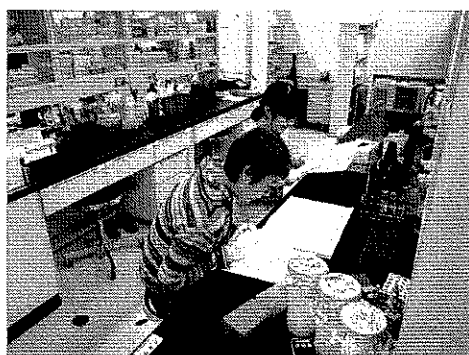


図3 名古屋市立大学薬学研究科での瀋陽医学院、奉天病院研究者(手前)との共同研究



参考文献

O'Sullivan JF, Martin K, Caplice NM. Microribonucleic acids for prevention of plaque rupture and in-stent restenosis: "a finger in the dam". *J Am Coll Cardiol.* 2011; 57:383-9.

Qin S, Zhang C. MicroRNAs in vascular disease. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011; 57:8-12.

Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res.* 2010; 107:1047-57.

注 本研究の一部は平成22年度 名古屋市立大学大学院薬学研究科博士前期課程論文内容要旨集 169-170 頁(森 智恵子)で発表した。

作成日 2011年3月11日