

血管内皮機能を反映するバイオマーカーとしての circulating micro RNAの探索

大阪大学大学院医学系研究科 臨床遺伝子治療学
特任助教 東 純哉

(共同研究者)

大阪市立大学大学院医学研究科 循環器内科学・総合診療学 講師 竹本 恭彦
大阪大学大学院医学系研究科 臨床遺伝子治療学 大学院生 大津 礼

はじめに

近年、我が国でも生活習慣の欧米化によって肥満者が増加し、人口の高齢化も加わって心・血管関連イベントが急増している。これから少子高齢化社会を迎える日本にとって、心・血管関連イベントに関わる動脈硬化病変をより早期に捉え、重症化する前に予防・治療を行うことは、個人のQOLの向上という面はもちろん医療経済面からも重要な課題である。

近年では動脈の硬化巣形成に先立ち、血管内皮細胞の機能障害が先行することが証明され、その機能を評価する目的で血流依存性血管拡張反応 (FMD) 検査が行われるようになった。FMD検査ではカフで腕を締め、その後のカフ解放で生じる血管拡張を超音波で評価することで内皮機能を簡便に定量できる。2012年度より本邦でも保険適応となり、心血管イベントに対するサロゲートマーカーとしてすでに広く認められている。しかし、FMDの評価には超音波装置を必要とし、一般検診における広範なスクリーニング検査には不適切である。

こういった問題を解消するために血液サンプルから血管内皮機能を推定するバイオマーカー探索が精力的に行われるようになった。その代表的なものが高感度CRP、Lp-PLA₂、PTX3などである。これらのマーカーは特に不安定プラークなどの推定には有効だが、必ずしも血管内皮の初期病変を反映しているわけではない。そこで我々は血管内皮機能を反映しうる新規バイオマーカーとしてmicroRNA (miR) に注目した。miRは遺伝子発現を転写後レベルで制御する小さな機能性RNAであり、ヒトでは約1,500種類が同定されている。血清や血漿中のmiRは、かつては不安定ですぐに分解されると考えられていたが、現在はexosomeと呼ばれる分泌顆粒中において安定的に存在することが確認され、疾患マーカーとしての有用性が検討されるようになった¹⁾。

喫煙者では非喫煙者に比べて平均寿命が短く壮年期死亡が多いことは従来から指摘されてきた。日本で1980年から実施された大規模循環器疾患追跡調査においても観察当初年齢が30～60歳の喫煙者の死亡相対危険度は非喫煙者の2倍以上であった。このように喫煙は心血管イベントと強い相関があり、予防医学の観点からも禁煙政策が進められている。

日本国内では、ニコチン依存症に対する薬物治療としてニコチン代替療法が主として行われてきた。しかし、禁煙補助薬投与前後で心血管合併症のサロゲートマーカーとなっている血管内皮機能が改善するのか、またこれらの病態を反映する適切な血中バイオマーカーが存在するのかも明らかではない。本研究では喫煙が血管内皮機能と血中miRに与える影響を検討した。

結果

大阪市立大学医学部附属病院を受診し、ニコチン依存症と診断された症例のうち、脳心血管イベントの既往歴がなく、高血圧、高脂血症、糖尿病等の動脈硬化危険因子を有さない11症例について禁煙治療開始前、禁煙治療開始4週後にFMDおよび既報で動脈硬化に関連することが報告されている血中タンパクであるペントラキシン3：PTX3、highmobilitygroupboxprotein1：HMGB1、トロンボスポンジン-1：TSP-1、インターロイキン6：IL-6、血管内皮細胞増殖因子：VEGFについてはエライザ法により計測を行った。

また血管構成細胞で発現することが確認されているmiR126、miR21、miR92a、miR34、miR29bについて計測を行った。血中のmiRはmiRNeasy miki kitで回収され、回収効率はMS2 RNAキットを用いて確認した。内因性コントロールmiRには発現量がサンプル間で最も安定していたmiR103を使用した。

禁煙治療前後の変化は対応のあるT検定で解析を行った。ニコチン依存症患者から収集された供血液試料は、連結不可能匿名化された上で、試料提供の同意を求め、承諾した提供者から採取された（大阪大学・承認番号：12025、大阪市立大学・承認番号：1744）。

表1 禁煙治療開始前の患者背景

(n=11)	
年齢	49.3 ± 4.2
性別	男性：8 女性：3
BMI(kg / m ²)	22.2 ± 0.6
収縮期血圧(mmHg)	113.4 ± 3.6
拡張期血圧(mmHg)	68.3 ± 2.8
心拍数(bpm)	57.7 ± 3.4
eGFR(ml/分/1.73m ²)	74.7 ± 4.2
HbA1c(%)	5.1 ± 0.1
LDL(mg/dl)	92.5 ± 8.0
中性脂肪(mg/dl)	116.4 ± 18.3
HDL(mg/dl)	50.1 ± 3.7

禁煙治療前の患者背景を表1に示す。平均年齢は49.3±4.2歳であった。全例で禁煙補助薬としてバレニクリンが使用されたが、治療開始四週の時点で脱落例は認められなかった。

禁煙治療前後での各種パラメーターの計測結果を表2に示す。FMDの変化率は禁煙前と比較し、禁煙後に改善傾向を認めたが有意差はなかった。

表2 禁煙治療前後の変化

	禁煙前	禁煙後4週間	p値
FMD(%)	4.24±0.81	4.80±0.56	n.p
PTX3 (ng/mL)	2.60±1.07	2.50±1.17	n.p
HMBG1(ng/mL)	1.65±0.59	1.08±0.29	n.p
TSP-1(μg/ml)	51.15±28.62	41.17±29.94	n.p
IL-6	1.28±0.43	3.55±1.89	n.p
VEGF	11.26±1.68	7.76±2.05	n.p
miR126/miR103	3.73±1.24	3.46±1.12	n.p
miR92a/miR103	29.32±15.72	7.48±2.58	n.p
miR34/miR103	0.010±0.004	0.012±0.004	n.p
miR21/miR103	0.047±0.026	0.044±0.016	n.p
miR29b/miR103	計測不能	計測不能	n.p

血管炎症を反映するバイオマーカーとして知られるPTX3に関して禁煙治療前後で減少傾向を認めたが有意差は得られなかった。またHMBG1、TSP1なども炎症時に増加することが報告されているが、有意差はないものの禁煙治療後には減少傾向を認めた。一方で慢性関節リウマチ症の活動性だけではなく、あらゆる炎症状態を反映するバイオマーカーとして知られるIL6に関しては禁煙治療により、有意差はないものの、むしろ増加傾向にあった。VEGFは血管内皮機能と逆相関することが知られているが²、禁煙治療によって有意差はないものの減少傾向にあった。

血管内皮細胞に特異的に発現することで知られるmiR126は禁煙治療前後で変化は認められなかった。血流変化に応答して発現量が変化することが報告されているmiR92aは禁煙治療により低下する傾向にあったが有意差は認められなかった。また同様にmir21も血流変化で発現が制御されることが報告されているが、禁煙治療前後で変化は認められなかった^{3,4}。また細胞や個体老化に関連するmiR34も禁煙治療による有意な介入効果は認められなかった。主に平滑筋細胞や線維芽細胞において発現が確認されているmiR29bについては本研究では測定ができなかった⁵。

考 察

癌領域では、血清中の特定のmiR発現解析は、簡便に診断可能な腫瘍マーカーとして、あ

るいは予後予測マーカーとして期待されている⁶。また、その手法は循環器領域にも広がりを見せている⁷。我々は血管病変の進展に深く関係する血中miRを検討した。

本研究では禁煙治療によりFMDの変化率は増加傾向にあったが、有意差は認められなかった。心血管イベントの既往がなく、喫煙以外に動脈硬化のリスク因子を有さない症例を対象にしていたことから動脈硬化性病変の有病率が低い母集団を対象としていたため、禁煙治療による内皮機能改善効果が検知しにくい状況であった可能性がある。また、禁煙治療開始から4週間の時点で禁煙前と比較したため、治療介入期間が短かったことも結果に影響した可能性がある。

血中VEGF濃度の上昇は高血圧症や動脈硬化性疾患との関連が指摘されており、FMDの血管拡張率により評価された内皮機能障害と逆相関することが報告されている²。その一方で、動脈硬化性病変が比較的少ないことが予測される喫煙者と非喫煙者を対象とした研究では、両群間の血中VEGF濃度に差がなかった⁸。本研究では禁煙治療により血中VEGFは低下傾向にあったが、有意差は認められなかった。動脈硬化が進展している症例では血中VEGF濃度は内皮機能と逆相関するが、動脈硬化性病変が限定的である場合には、喫煙という強力な脳心血管イベント危険因子が介在しても血中VEGF濃度は内皮機能を十分に反映しない可能性がある。

PTX3は、IL-1やTNFの刺激で、動脈硬化と密接な関連をもつ血管内皮細胞や血管平滑筋マクロファージや、白血球などから直接産生される。そのため、主にIL-6の刺激により肝臓で産生されるCRPと比べ、より鋭敏に血管局所の炎症を反映すると考えられている⁹。しかし、本研究では禁煙治療によってPTX3の減少傾向は認められたものの有意差はなかった。その他の炎症を反映する血中タンパクについても喫煙治療の結果、有意差を示すものはなかった。

内皮細胞特異的マイクロRNAであるmiR126の誘導には血流によって誘導される転写因子のklf2aが必要であり、miR126はVEGFシグナル伝達を阻害するSpred1の抑制によってVEGFシグナル伝達と血管新生を促進する¹⁰。本研究では禁煙治療で血中VEGF濃度が有意差はないものの低下傾向にあったが、miR126にも同様にほとんど影響はなかった。

我々は以前にタバコと主要成分の一つであるニコチン投与により、内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞のいずれにおいてもmiR21の発現が亢進することを確認している¹¹。本研究では禁煙補助薬として全例でバレニクリンを使用している。バレニクリンは $\alpha 4 \beta 2$ ニコチン受容体の部分作動薬作用であり、その刺激作用はニコチンより弱いですが、本研究においてはmiR21の発現に何らかの影響を与えた可能性がある。

miR34はDNA損傷やテロメラーゼの短縮を抑制するPNUTSを主な標的とし、老化に関連することが報告されている¹²。また、miR34を抑制することで急性心筋梗塞後の線維化を抑制し、心機能を保つことができる。しかし本研究では禁煙治療後で血中のmiR34に有意な変化は認められなかった。これまでに喫煙とmiR34の関連の報告はない。

本研究で喫煙治療によりもっとも影響を受けていたのはmiR92 aであった。禁煙治療によ

りその発現は低下傾向にあった。成体の血管においてはKLFはeNOSの発現に関与し、内皮細胞の正常機能の維持に重要と考えられている。また層流によって発現誘導される一方で、分岐部などの層流が維持できない部位では発現が低下し、動脈硬化が促進する。このKLFはmiR92aを介して発現が抑制的に制御していることが報告されている³。本研究では有意差はなかったものの、禁煙によりmiR92aの発現が抑止されることからFMDとともに内皮機能を反映しうるバイオマーカーとしての資質を持ち合わせている可能性がある。但し、本研究では症例数が少なかつたため、統計的に有意差を検出できなかった可能性がある。そのため今後も引き続き症例数を増やしていく予定である。

血漿中のmiRNA測定により血管初期病変を予測できるようになれば、設備的な制約によりFMDが行われなかった層にも検査が汎用されることにつながる。血管初期病変をこれまで以上に的確に診断し、早期に治療へと導くことが可能性になる。その結果、超高齢化社会を迎える日本の抱える問題である、介護、医療経済の両面から貢献できると思われる。

要 約

超高齢化社会を迎えようとしている本邦では動脈硬化病変をより早期に捉え、重症化する前に予防・治療を行うことは、個人のQOLの向上という面はもちろん医療経済面からも重要な課題である。

近年、血管内皮機能検査（FMD）は心・血管関連イベントをもっとも早期に予測できるサロゲートマーカーとしてその地位を確立してきた。しかし、FMDの一般検診への応用は困難であることから、本研究では採血等で簡便に血管内皮機能を評価できる新たなバイオマーカーとして血中microRNA（miR）に着目した。喫煙は心血管イベントの強力なリスク因子であるため、ニコチン依存症症例を対象とし、禁煙治療前後でFMDや血中miRに及ぼす影響を検討した。

血中miRを喫煙者における血管早期病変の予測因子として診断に応用できれば、動脈硬化性疾患の予防および治療効果の判定に有用で医学的・社会的意義が高いと考えられる。

文 献

1. Skog, J. et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* 10, 1470–6 (2008) .
2. Tsai, W.-C. et al. Plasma vascular endothelial growth factor as a marker for early vascular damage in hypertension. *Clin. Sci. (Lond)* . 109, 39–43 (2005) .
3. Wu, W. et al. Flow-Dependent Regulation of Kruppel-Like Factor 2 Is Mediated by MicroRNA-92a. *Circulation* 124, 633–41 (2011) .
4. Banjo, T. et al. Haemodynamically dependent valvulogenesis of zebrafish heart is mediated by flow-

- dependent expression of miR-21. *Nat. Commun.* 4, 1978 (2013) .
5. Maegdefessel, L. et al. Inhibition of microRNA-29b reduces murine abdominal aortic aneurysm development. *J. Clin. Invest.* 122, 497–506 (2012) .
 6. Mitchell, P. S. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 10513–8 (2008) .
 7. Creemers, E. E., Tijssen, A. J. & Pinto, Y. M. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ. Res.* 110, 483–95 (2012) .
 8. Schmidt-Lucke, C. et al. Soluble vascular endothelial growth factor, soluble VEGF receptor Flt-1 and endothelial function in healthy smokers. *Int. J. Cardiol.* 100, 207–12 (2005) .
 9. Jylhävä, J. et al. Pentraxin 3 (PTX3) is associated with cardiovascular risk factors: the Health 2000 Survey. *Clin. Exp. Immunol.* 164, 211–7 (2011) .
 10. Nicoli, S. et al. MicroRNA-mediated integration of haemodynamics and Vegf signalling during angiogenesis. *Nature* 464, 1196–200 (2010) .
 11. Maegdefessel, L. et al. Induction of microRNA-21 inhibits abdominal aortic aneurysm development and nicotine-augmented expansion . *Vascular* 1–51
 12. Boon, R. A. et al. MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature* 495, 107–10 (2013) .