

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2013

課題番号：25893192

研究課題名(和文) microRNAによる糖尿病性血管病変形成のメカニズムの解明

研究課題名(英文) The role of microRNA in diabetes associated vascular dysfunction

研究代表者

山口 宗一 (Munekazu, Yamakuchi)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：60709301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円、(間接経費) 330,000円

研究成果の概要(和文)：「糖尿病性の血管病変形成に血小板と血管内皮細胞のクロストークが必要である」という仮説の第一段階を検証した。マイクロRNA(microRNA)は蛋白合成を制御して細胞の機能を制御する。今回の新しい知見は、血管内皮細胞においてmiR-503が低酸素刺激で誘導され、cyclinDの発現のみならずAktの活性化を制御していることと、血管内皮細胞はmiR-503を放出と取り込みをすることである。血管内皮細胞のmiR-503がどのようにPI3K-Aktシグナルの下流を制御しているか、miR-503を介した血小板と血管内皮細胞の細胞間情報伝達がどのように行われるか、などが、今後の検討課題である。

研究成果の概要(英文)：Diabetes is one of the major public health problem. Dysfunction of endothelial cells are involved in formation of the pathogenesis of this vascular diseases associated with diabetes. Our hypothesis is that cell to cell communication between endothelial cells and platelets would play a pivotal role in diabetic vascular complications. microRNAs (miRNAs) is a non-coding miRNAs that regulates protein synthesis post-transcriptionally. We used miRNAs as key players to organize a series of vascular events under hyperglycemia. We have discovered that miR-503 was induced by hypoxia in cultured endothelial cells and that miR-503 regulates phosphorylation of Akt as well as cyclin D. We also observed that miR-503 is released by wrapping in exosomes under hypoxic condition. In the future studies, we will focus on the downstream target of Akt regulated by miR-503 in endothelial cells and clarify the mechanisms by which endothelial cells transfer the information to platelets.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態検査学

キーワード：マイクロRNA 血小板 血管内皮細胞 糖尿病 エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

【糖尿病研究の方向性】

糖尿病の治療薬の開発は近年飛躍的に進んでいる。GLP1 作動薬、DPP4 阻害剤をはじめ、本年からは尿管をターゲットとした SGLT2 阻害薬も国内で販売され始めた。しかしながら、増加し続ける糖尿病患者と高齢化社会を背景に、糖尿病をいかに厳格に治療するかというよりは、適度な血糖コントロールにより糖尿病合併症をいかに抑えるかに重点が移ってきた。従って、糖尿病による血管合併症の予防と治療の開発は、未だ完成しておらず急務とされる。この糖尿病合併症とは、まさしく糖毒性による血管障害の事である。動脈硬化性血管病変とオーバーラップする面はあるものの、糖尿病性血管病変は独特な病態を複合的に形成するものと考えられている。

【マイクロ RNA 研究の進歩】

近年、細胞機能の制御因子としてマイクロ RNA (microRNA) が注目されている。microRNA はその多数の標的遺伝子の転写後翻訳を抑制する独特な制御形態から、fine tuner としての細胞機能制御が謳われている (図 1)。糖尿病における microRNA の代謝面での働きは精力的に研究されており、例えば、インスリン分泌や脂質代謝に関連する microRNA (miR-375, miR-33 など) は多数報告されている。これら microRNA をノックアウトまたはノックダウンする実験系が確立されつつあり、in vivo において個々の microRNA の生体に果たす役割も検討できるようになってきた。そもそも、microRNA とその標的遺伝子の連関は複雑なネットワークを形成しており、microRNA の総括的な理解は今始まったばかりである。

糖尿病性血管障害に関する microRNA の役割はほとんど議論されていない未知の研究領域であった。

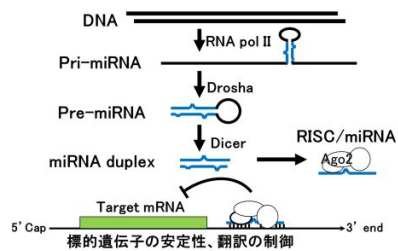


図1 マイクロRNAの生合成とその働き

2. 研究の目的

本研究活動スタート支援の目的は、この糖尿病による血管障害の機序解明の糸口を探り、問題点を明確にし、今後の更なる研究の発展の礎をすることにある。この目標達成のため、糖尿病性血管障害の中でも、糖毒性の影響を直接受けて血管病変の発症、進展の

major player である血管内皮細胞に焦点を絞り、糖尿病による血管内皮細胞の機能と microRNA の関わりを検討した。より具体的な目的は次の通りである。

【血管内皮細胞の microRNA の役割】

血管内皮細胞の機能は microRNA により制御されている。miR-126 は血管内皮細胞に特異的に発現し、接着因子 VCAM1 の発現を直接制御することで、血管の炎症反応をコントロールしている (図 2)。また、miR-34a は外界の刺激により発現が増強し、老化に関与することが証明した。正常な血管内皮細胞は様々な外界刺激にตอบสนองして、抗血栓、抗酸化、抗炎症作用を発揮する。

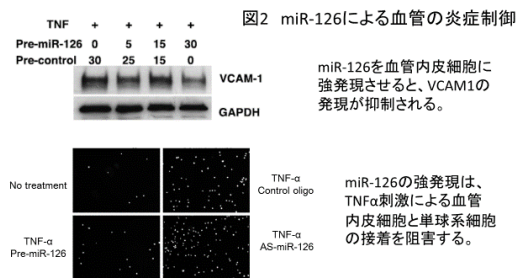


図2 miR-126による血管の炎症制御

低酸素刺激による microRNA の応答を血管内皮細胞で検討した。HUVEC の低酸素刺激により、miR-210, miR-503, miR-424 をはじめとする一連の miRNA が発現することをマイクロアレイで確認した。特に miR-210 は、低酸素刺激で著増するが、癌研究分野において、癌の進行、転移の観点から精力的に研究がされている。今回注目したのは、miR-210 の次に発現が増強した miR-503 である。

【血管内皮細胞の microRNA の分泌形態】

microRNA は細胞から分泌される。その分泌 microRNA は、二重脂質膜に包まれた 100nm 程度のマイクロパーティクル (エクソソーム) に包まれるか、キャリア蛋白に結合するか、いずれかの方法で存在する (図 3)。血中に放出された microRNA は、標的細胞に取り込まれる事も報告されている。従って、microRNA は、細胞と細胞の情報伝達のツールとして機能している可能性がある。

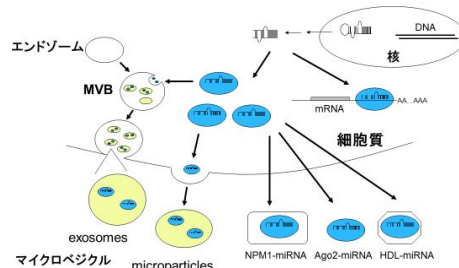


図3 microRNAは細胞外へ分泌される

血管内皮細胞からの microRNA の放出と取り込みを確認し、血小板との microRNA の受け渡しを証明する基礎データの取得を目的とする。

3. 研究の方法

培養血管内皮細胞の HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) と HAEC (ヒト大動脈内皮細胞) を用いて、以下の実験手法を用いた。

【低酸素、高血糖で血管内皮細胞の miR-503 の発現、機序の検討】 miRNA の発現は細胞より RNA を抽出し、Taqman microRNA assay で qPCR を行った。HIF-1 のノックダウンは siRNA を lipofectamine で細胞にトランスフェクションした。プロモーター解析はプロメガ社の luciferase plasmid を使用した。

【血管内皮細胞における miR-503 の役割の検討】 HUVEC に、precursor-miRNA と antisense-miRNA (Life Technologies より購入) を lipofectamine で導入した。Cyclin D, Akt, phosphor-Akt の発現は、細胞溶解液を使用しウエスタンブロット法にて検出した。また、細胞の増殖能測定は、MTT 試薬を用いて細胞の相対数を計測し、検討した。

【血管内皮細胞の miR-503 の放出、取り込みの検討】 細胞培養液中のエクソゾームの回収は、段階的な超遠心を用いて分離した。エクソゾームの細胞への取り込みは、エクソゾームを Dil ラベルし細胞と共培養した後、共焦点顕微鏡下で行った。

4. 研究成果

【1】低酸素刺激による miR-503 の発現

miR-503 は低酸素刺激により発現が増強することを qPCR で確認した (図 4 左)。Desferoxamine や塩化コバルトなどの刺激でも miR-503 の発現増強を確認した。低酸素刺激は hypoxia inducible factor (HIF) 複合体により下流の遺伝子群が変化する。ここでは HIF-1 をノックダウンして miR-503 発現を検討した結果、その低酸素刺激による発現は HIF-1 により制御されていることを見出した (図 4 右)。これは、miR-503 のプロモーター解析の結果でも裏付けられた。

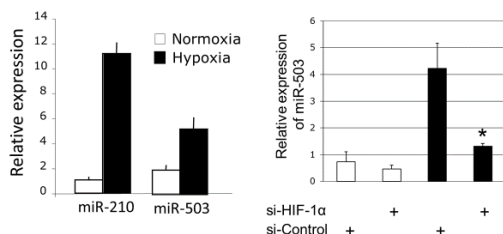


図4 HUVECを低酸素刺激(1%O₂)で刺激して、qPCRでmiRNAの発現を解析した(左)。HUVECのHIF-1をノックダウンして、miR-503の発現を調べた(右)。

【2】miR-503 の標的遺伝子の探索

miR-503 の直接結合する標的遺伝子は、in silico 解析で TargetScan や miRanda などのコンピュータープログラムを用いて探索している。その中の cyclin D 遺伝子群につ

いての検討を行った。HUVEC に miR-503 を過剰発現させると、その標的遺伝子である cyclin D1, cyclin D3 の発現が減少し、内因性の miR-503 を抑制すると、cyclin D1, D3 の発現が増強した (図 5)。

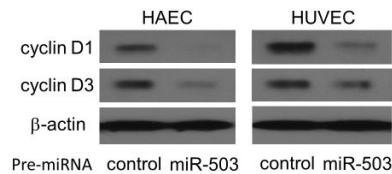


図5 miR-503をHUVEC、HAECに過剰発現させると、cyclin D1, cyclin D3の発現が減少する。

また、miR-503 は血管内皮細胞の Akt の活性を制御していることを見出した。Akt のタンパク量は変化がないが、Akt のセリン 473 のリン酸化が miR-503 の過剰発現により低下した (図 6)。Akt のセリン 308 のリン酸化は変化しなかった。さらに、miR-503 を HUVEC に過剰発現すると、血管内皮細胞の細胞増殖活性を抑えることを MTT アッセイにより確認した。

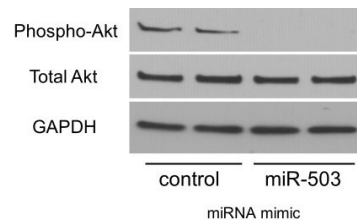


図6 miR-503をHUVECに過剰発現させると、Aktのser-473のリン酸化が低下する。

【3】miR-503 の細胞外動態

miR-503 が分泌されて、血中に存在することを qPCR で確認した。HUVEC を低酸素刺激下で 24 時間培養すると、その培養上清中の miR-503 の量は増加する (図 7)。ほかの miRNA の培養上清中の存在、増加と同時に検討して、miR-503 の特異性を検討していく。

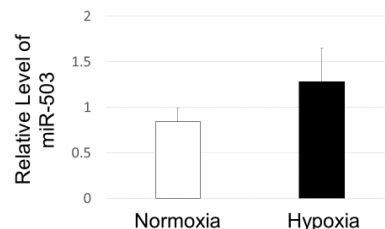


図7 24時間の低酸素刺激により、HUVECの培養液中のmiR-503放出量が増加する。

この培養液中に増加する miR-503 は、脂質膜に包まれて放出されるのか、すなわちエクソゾーム中に miR-503 が検出できるのかを検討中である。その実験に先立って HUVEC の上清からエクソゾーム分画を超遠心により単離してきた。単離してきたエクソゾームが

ら RNA を抽出して HUVEC に多量に含まれる miR-126 は qPCR で検出することが出来た。

次に血管内皮細胞に上清中の microRNA は取り込まれるかを調べた。エクソゾームを蛍光ラベルした後、HUVEC に添加すると、その取り込みを共焦点顕微鏡で確認できた。エクソゾームの HUVEC への取り込みが存在するので、その内容物の取り込みも肯定的であるが、次に蛍光ラベルした microRNA の細胞内への取り込みの検討中である。

【4】今後の展望

次の目的は、miR-503 の高血糖による血管生物学的変化を具体的に検討していくことである。結果で記載したように、半年にわたる本研究において、このテーマの鍵を握る重要な成果を得ることが出来た。

高血糖刺激による miR-503 の発現に関しては、まさに研究中であり近日中に成果を発表しようと思われるが、血管内皮細胞における miR-503 の重要性は、低酸素刺激による miR-503 の応答を見れば明らかである。

この研究による大きな成果は、miR-503 が増殖シグナルである PI3K 経路を制御する可能性が見出されたことである。この PI3K - Akt シグナル系を中心に miR-503 の血管内皮細胞機能変化への関与を模索していく予定である。

また、細胞外の miR-503 が血管内皮細胞と血小板の橋渡し役を持ちうるかの検討が、次の課題である。血小板と miR-503 についての実験も進行中であるが、ここでは概念だけにとどめる。

miR-503 は、刺激誘導型 microRNA であり、高血糖下の血管内皮細胞機能障害から動脈硬化性変化にいたる過程で、その進展過程に関与するという概念の中心分子として位置付けていきたい。

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 4 件)

1. Huang J, Huffman JE, Yamakuchi M, Trompet S, ...Lowenstein CJ, Strachan DP, O'Donnell CJ; CHARGE Consortium Hemostatic Factor Working Group. Genome-wide association study for circulating tissue plasminogen activator levels and functional follow-up implicates endothelial STXBP5 and STX2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 May;34(5):1093-101 査読有

2. Hashiguchi T, Yamakuchi M. Post-marketing surveillance of thrombomodulin alfa, a novel treatment of disseminated intravascular coagulation - Safety and efficacy in 1,032 patients with

hematologic malignancy *Thrombosis Research* 133 (2014) 364-370 査読有

3. Takenouchi K, Shrestha B, Yamakuchi M, Yoshinaga N, Arimura N, Kawaguchi H, Nagasato T, Feil R, Kawahara K, Sakamoto T, Maruyama I, Hashiguchi T. Upregulation of non-Cell-derived Vascular Endothelial Growth Factor A Increases Small Clusters of Insulin-producing Cells in the Pancreas. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2014 May;122(5):308-15 査読有

4. Shrestha C, Ito T, Kawahara K, Shrestha B, Yamakuchi M, Hashiguchi T, Maruyama I. Saturated fatty acid palmitate induces extracellular release of histone H3: a possible mechanistic basis for high-fat diet-induced inflammation and thrombosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Aug 9;437(4):573-8 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

(国内学会)

1. 清水利昭、竹之内和則、山口宗一、橋口照人：アディポネクチンは新規炎症性アディポサイトカイン HMGB1 の分泌を JNK 経路で阻害する 第 59 回日本臨床検査医学会九州地方会 第 25 回日本臨床化学会合同プログラム 2014 年 3 月 15 日 熊本市医師会館

2. 郡山豊泰、森明日華、古城剛、福山竜子、松下昌風、山口宗一、橋口照人：Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)法を用いた *Clostridium difficile* toxin の検討 第 59 回日本臨床検査医学会九州地方会 第 25 回日本臨床化学会合同プログラム 2014 年 3 月 15 日 熊本市医師会館

3. 山口宗一、清水利昭、竹ノ内和則、大山陽子、郡山豊康、橋口照人：マイクロ RNA による直腸がん細胞の低酸素応答制御 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会 2013 年 10 月 31 日～11 月 3 日 神戸国際会議場

(国際学会)

4. Toshiaki Shimizu, Munekazu Yamakuchi, Shingo Yamada, Masanori Nakata, Teruto Hashiguchi, and Ikuro Maruyama New adipocytokine HMGB1 inhibits insulin signaling in adipocyte and adiponectin suppresses this effect. The Merinoff world Congress 2013 (9-11 October, 2013) New York, USA

〔図書〕(計 2 件)

1. 橋口照人、Binita Shrestha、伊藤隆史、山口宗一：Iron Regulatory Protein 1 / HIF2 軸 鉄代謝調節メカニズムの新展開 臨床化学会 第 43 巻第 1 号 P69 2014 年 1

月

2. 山口宗一：デオキシチミジンキナーゼ
臨床検査ガイド 2013～2014 文光堂 1128
頁 2013年3月

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ

<http://www2.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~mdio/list/j/j1/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 宗一 (MUNEKAZU YAMAKUCHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・
准教授

研究者番号：60709301

(2)研究分担者

本研究スタート支援に関する研究分担者は
申請時に計画されていない。

(3)連携研究者

本研究スタート支援に関する連携研究者は
申請時に計画されていない。

(4)研究協力者

橋口 照人 (HASHIGUCHI TERUTO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・
教授

研究者番号：70250917

清水 利昭 (SHIMIZU TOSHIKI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・
助教

研究者番号：50468055

大山 陽子 (OYAMA YOKO)

鹿児島大学・医学部・歯学部付属病院・
特任助教

研究者番号：20583470

竹之内 和則 (TAKENOUCHI KAZUNORI)

鹿児島大学・医学部・歯学部付属病院・
医員

研究者番号：30646758