

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461138

研究課題名(和文) 震災ストレスによる動脈硬化性疾患感受性遺伝子の制御異常に関する網羅的解析

研究課題名(英文) The great earthquake stress is associated to dysregulation of atherosclerosis-related genes in general population.

研究代表者

佐藤 衛 (Sato, Mamoru)

岩手医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90305996

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)：大規模な自然災害により、冠動脈疾患の発症頻度が増加することが報告されている。東日本大震災後の岩手沿岸被災地住民では、心不全の発症頻度が増加している(Nakamura et al. Am J Cardiol 2012)。本研究では、その機序として、環境・精神的ストレス負荷が、生体のさまざまな動脈硬化性疾患感受性遺伝子の化学的修飾(DNAメチル化)およびsmall RNAを介した遺伝子制御異常を引き起こし、それに伴う細胞や臓器障害が生じ、さまざまな疾患が発症することを探求した。

研究成果の概要(英文)：It has been already known that serial disasters, such as the great earthquake, is relate to an increased number of patients with coronary artery disease. Indeed, the number of patients with failing heart increased after the Great East Japan Earthquake (Nakamura et al. Am J Cardiol 2012). This study has investigated that the earthquake stress induces DNA methylation of atherosclerosis-related genes and abnormal profiling of small non-coding RNAs and then may be involve in the pathogenesis of atherosclerotic diseases.

研究分野：循環器内科

キーワード：DNAメチル化 Small RNA 動脈硬化性疾患 震災ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

災害ストレスによる動脈硬化性疾患の発症：大規模な自然災害により、冠動脈疾患の発症頻度が増加することが報告されている。東日本大震災後の岩手沿岸被災地住民では、心不全の発症頻度が増加している (Nakamura et al. Am J Cardiol 2012)。その機序として、環境・精神的ストレス負荷が、生体のさまざまな動脈硬化性疾患感受性遺伝子、特に免疫応答関連遺伝子 (Toll-like receptor やサイトカイン遺伝子など) に化学的修飾および small RNA を介した遺伝子制御異常を引き起こし、それに伴う細胞や臓器障害が生じ、さまざまな疾患が発症すると推測される。

非翻訳型 small RNA による遺伝子機能の制御：近年、非翻訳型 small RNA は、細胞内に存在する長さ 20~25 塩基ほどの 1 本鎖 RNA を示し、多くの遺伝子の発現制御に関わる新たな重要な機能性 RNA 分子として注目されている。さらに、血液中のエクソゾームやコレステロール粒子には、多種多様な small RNA が存在することが明らかとなり、これらの small RNA は、さまざまな疾患で障害された細胞に由来し、その疾患の病態、病期および予後などを反映し新たなバイオマーカーとして注目されている。すなわち、これらの非翻訳型 small RNA の生物学的意義についての研究は、多くの疾患の発症や進展のメカニズムを解明できるだけでなく、新たな診断・治療への応用が期待されている。

遺伝子多型に伴う遺伝子機能の制御：多くの遺伝子は、SNP 多型による表現型の違いにより、下流領域の蛋白発現制御に差異があることが報告されている。特に、グルココルチコイド遺伝子や自然免疫応答遺伝子 (Toll like receptor やサイトカイン遺伝子) は、その SNP による機能多型が、下流領域の発現を制御していることが明らかとなっている。さらに、自然免疫応答遺伝子では、その機能多型による動脈硬化の進行度や心血管イベントの発生頻度が異なることも報告されている。

しかし、環境・精神的ストレス負荷が、これらの遺伝子の機能多型やその下流領域で

の mRNA や蛋白発現制御に対する効果は明らかとなっていない。

以上より、冠動脈疾患の発症には、自然免疫応答遺伝子などの動脈硬化の進展に関わる遺伝子の SNP などの機能多型による遺伝子制御の変化や非翻訳型 small RNA による下流領域の遺伝子制御の変化が関与していると推測される。しかし、東日本大震災のような大規模な災害による環境・精神的ストレス負荷がこれらに遺伝子機能に及ぼす影響は明らかとなっていない。

### 2. 研究の目的

未曾有な自然災害による心理的ストレス負荷は、生体の遺伝子に対し多様な化学的修飾を起こし、冠動脈疾患の発症頻度の増加に関与していることが推測される。

本研究の目的は以下の 2 項目である。

被災地で発症した冠動脈疾患での非翻訳型 small RNA の発現について次世代シーケンサーを用いて網羅的解析を行い冠動脈疾患での small RNA の発現プロファイルを構築する。

冠動脈疾患での疾患感受性遺伝子の機能多型解析、エピジェネティクス解析 (後天的 DNA 修飾) および最終産物の発現制御に関するオミックス解析を行い、small RNA の発現との関連を探索する。

### 3. 研究の方法

【平成 25 年度】

#### 1) 目標症例数

疾患コホート：100 例、岩手県沿岸被災地域で発症した冠動脈疾患の症例。

対照コホート：100 例、非被災地あるいは震災前に発症した冠動脈疾患症例および健常人。

#### 2) 血液サンプルの採取・保存

末梢血単核球 (PBMCs) の分離・保存：末梢血液から Ficoll を用いた密度勾配遠心分離により PBMC を分離し、保存バッファーへ懸濁し、調製 PBMCs とし、-80 保存する。

血漿サンプル：上記の遠心後の上清 (血漿) を回収し、-80 保存する。

- 3) 非翻訳型 small RNA の網羅的解析  
次世代シーケンサーを用いた small RNA の網羅的解析を行い非翻訳型 small RNA のプロファイリングを構築する。  
各サンプルに各々特異的なインデックス配列を付加し small RNA ライブラリーを作製し、高速シーケンス解析を行う。ライブラリーとシーケンシングの評価シタグ解析を行う。
- 4) 疾患感受性遺伝子群のオミックス解析：  
ゲノミクス解析、プロテオミクス解析  
疾患関連感受性遺伝子パネル解析：次世代シーケンサーを用いた PBMC での疾患感受性遺伝子の SNP 多型および血中最終産物の発現制御との関連を探求する。  
エピジェネティクス解析：次世代シーケンサーを用いた末梢血単核細胞での疾患感受性遺伝子の DNA のメチル化およびヒストン修飾部位を網羅的に解析する。

【平成 26 年度】

- 1) 昨年度と同様の研究を行い、さらに症例数を増やす。
- 2) Small RNA の機能解析  
上記で同定した microRNA precursor および inhibitor をヒト単球 (THP1 cell) へトランスフェクションし、各 microRNA の up-regulation および down-regulation モデルを作成する。  
Gain-of-function、loss-of-function 実験：トランスフェクション細胞での標的遺伝子の発現を定量測定する。
- 3) バイオインフォマティクス解析：ライブラリーとシーケンシングの評価シタグ解析を行う。miRBase や他のリソースを使用したアプリケーション (Small RNA Analysis Pipeline Tool) を用いて、small RNA 異型の視覚化及び発現解析を行い、さらに、コホート間 (疾患 vs. 対照) での発現を比較し、候補 small RNA の標的遺伝子の発現、ストレスと心血管疾患の発症との関連性を検索する。

【平成 27 年度】

- 1) 追跡調査 (心血管疾患など)  
冠動脈造影の際、冠動脈血管内超音波お

よび冠動脈用光干渉断層映像を施行し血管性状 (血管内皮新生、プラーク量、不安定プラークの有無) を解析する。

- 2) 新たな創薬を検証  
上記で同定した標的遺伝子 (疾患感受性遺伝子：自然免疫応答遺伝子、血管内皮細胞制御遺伝子など) の発現を制御する microRNA に対する antagomir を作成し (Exiqon 社、Krützfeldt J, et al. Nature 2005;438: 685-9)、抗動脈硬化治療薬としての可能性を探究する。

4. 研究成果

岩手県被災地での疾患コホートの構築：

まずは、流血中 microRNA の発現解析に関する論文掲載および健常人を対象とした DNA メチル化解析、トランスクリプトーム解析および実験系の確立およびサンプルの収集を行った。

岩手県沿岸被災地コホートの構築のために、岩手県沿岸被災地域からのサンプルの輸送による白血球の DNA メチル化およびトランスクリプトーム解析に及ぼす影響について、輸送時間、輸送環境 (特に温度管理) および各種保存液による影響などの観点から検証した。具体的には、11 名の健常人からの末梢血液を採取し末梢血単核球を分離保存し、さまざまな温度管理下での岩手県沿岸部までの移送実験を行った。末梢血単核球から DNA および RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた DNA メチル化の網羅的解析および real-time PCR を用いたトランスクリプトーム解析を行った。この研究により、岩手県沿岸被災地域からのサンプルの輸送の影響を受けない実験系を確立することが可能となった。本研究により、岩手県沿岸被災地域からのサンプルの輸送による DNA メチル化およびトランスクリプトーム解析への影響について健常人サンプルを用いて検証し、実験系を確立した。さらに、岩手県沿岸被災地コホートの構築のために気仙地区、久慈地区、釜石地区、宮古地区、矢巾地区に健康調査を行

うためにそれぞれサテライトを設置し約4,000名のリクルートを行った。

本邦での代表的ゲノムコホートで採取したDNAサンプルでのDNAメチル化解析の比較とサンプル補正法の確立を行った。さらに、被災地住民での3層のオミックス(網羅的生体分子情報)参照パネルを公開した。岩手県沿岸被災地コホートのゲノムコホート構築のために、本邦での代表的ゲノムコホート(いわて東北メディカルメガバンク機構、東北メディカルメガバンク機構、バイオバンクジャパン、久山町研究、多目的コホート研究JPHC)で一般住民から採取した血液中のDNAサンプルでDNAメチル化解析を行いサンプル間でのデータ補正法を検討した。すなわち、各ゲノムコホートでの対象とする血液細胞の相違、DNA抽出法の相違、保存法の相違などが血液細胞のDNAメチル化およびトランスクリプトーム解析に及ぼす影響について検証した。また、被災地住民100名規模での3層オミックス解析(ゲノム解析、エピゲノム解析およびトランスクリプトーム解析)を行い、参照パネルを構築し、これらのデータを公開した

(<http://imethyl.iwate-megabank.org/>)。

動脈硬化性疾患コホートの構築：

冠動脈疾患を対象とした疾患コホートの構築のために、冠動脈疾患症例60例および非冠動脈疾患症例30例(対照群)から末梢血液の取得および臨床データの収集を行った。この疾患コホートでは、新たなバイオマーカー(特に、非翻訳型small RNAに着目)の探索を目的としている。末梢血液から末梢血単核球および血漿を分離保存し、血漿から遊離small RNAを含むtotal RNAの抽出、microarrayを用いた4,500個のヒトmicroRNAの網羅的解析、さらに、real-time PCRによる発現解析の実験系を確立した。冠動脈疾患群および対照群から血漿を分離し、mirVana™ Paris miRNA isolation kit

(Ambion)を用いてmiRNA分画を含むRNAを抽出する。miR-39をspiked-in controlとして用いた。マイクロアレイ解析：3D-Gene Human miRNA Oligo chips (Toray, Kamakura, Japan)を用いて自然免疫応答で中心的な役割を果たしているToll様受容体4 (TLR4)シグナルを制御するmiRNA群146個のスクリーニング解析を行う。Validation study：上記マイクロアレイ解析の結果をもとにPT-PCR法で候補miRNAの発現を検証した。

岩手県沿岸被災地での疾患コホートおよび住民コホートの症例数を増やすために、各沿岸医療機関および地方自治体との話し合いや広報活動を行う。当大学病院への入院・通院症例についても同様のリクルート活動を行い症例数の増加を目指す。疾患コホートおよび住民コホートで得られた血液サンプルについては、順次、次世代シーケンサーを用いたメチローム解析およびトランスクリプトーム解析、メチル化アレイを用いたメチローム解析を行う。

また、心臓弁膜症での骨化関連microRNAの発現解析に関する論文掲載を行った。

また、動脈硬化性疾患を対象とした疾患コホートの構築のために、大動脈弁硬化症症例46例および非大動脈弁硬化症症例46例(対照群)から末梢血液の取得および臨床データの収集を行った。特に、大動脈の石灰化のメカニズムに着目し、非翻訳型small RNAの探索を目的としている。末梢血液から末梢血単核球を分離保存し、small RNAを含むtotal RNAの抽出、real-time PCRによる発現解析の実験系を確立した。大動脈の骨化関連因子(オステオカルチン)を制御するmiRNA群の発現解析の結果をもとに候補small RNAの発現を検証した。

##### 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18件)

1. Satoh M, et al. Cellular and molecular mechanisms of statins: an update on pleiotropic effects. *Clin Sci (Lond)*. 2015;129:93-105.
2. Satoh M, et al. Circulating Toll-like receptor 4-responsive microRNA panel in patients with coronary artery disease: results from prospective and randomized study of treatment with renin-angiotensin system blockade. *Clin Sci (Lond)*. 2015;128:483-91.
3. Nakajima Y, Itoh T, Metal allergy to everolimus-eluting cobalt chromium stents confirmed by positive skin testing as a cause of recurrent multivessel in-stent restenosis. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2015 May 22.
4. Itoh T. How can we predict reduced fractional flow reserve using coronary lesion characteristics? *Circ J*. 2015;79:751-3.
5. Itoh T, et al. Clinical and pathological characteristics of homogeneous and nonhomogeneous tissue of in-stent restenosis visualized by optical coherence tomography. *Coron Artery Dis*. 2015;26:201-11.
6. Kimura T, Itoh T, et al. A honeycomb-like structure in the right coronary artery visualized by three-dimensional optical coherence tomography. *Coronary Artery Dis*. 2015;26:356-60.
7. Shiwa Y, et al. Genome Sequences of Three Strains of *Lactobacillus paracasei* of Different Origins and with Different Cholate Sensitivities. *Genome Announc*. 2015;3: e00178-15.
8. Ohmomo H, Hachiya T, Shiwa Y. Reduction of systematic bias in transcriptome data from human peripheral blood mononuclear cells for transportation and biobanking. *PLoS One*. 2014;9:e104283.
9. Satoh M, et al. NLRP3 inflammasome activation in coronary artery disease: results from prospective and randomized study of treatment with atorvastatin or rosuvastatin. *Clin Sci (Lond)*. 2014;126:233-41.
10. Miura S, Maesawa C, et al. Immunohistochemistry for histone h3 lysine 9 methyltransferase and demethylase proteins in human melanomas. *Am J Dermatopathol*. 2014;36:211-6.
11. Oikawa H, Maesawa C, et al. A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) mediates epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II on hepatic stellate cells. *Life Sci*. 2014;97:137-44.
12. Tian J, Dauerman H, Toma C, Samady H, Itoh T, et al. Prevalence and characteristics of TCFA and degree of coronary artery stenosis: an OCT, IVUS, and angiographic study. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64:672-80.
13. Itoh T, et al. Impact of the Japan earthquake disaster with massive Tsunami on emergency coronary intervention and in-hospital mortality in patients with acute ST-elevation myocardial infarction. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. 2014;3:195-203.
14. Niiyama M, Tanaka F, Nakajima S, Itoh T, Population-based incidence of sudden cardiac and unexpected death

- before and after the 2011 earthquake and tsunami in Iwate, northeast Japan. J AHA. 2014;3:e000798.
15. Koeda Y, Itoh T, et al. A unique stenosis in saphenous vein graft visualized by optical coherence tomography. Heart Vessels. 2014;29:278-81.
  16. Okumura K, Saito M, Isogai E, Aoto Y, Hachiya T, et al. Meis1 regulates epidermal stem cells and is required for skin tumorigenesis. PLoS One. 2014;9:e102111.
  17. 佐藤 衛. 冠動脈動脈硬化と micro RNA. Annual review 循環器 2014 血管医学. (2014)
  18. Koeda C, Tashiro A, Itoh T, et al. Mild renal dysfunction on admission is an important prognostic predictor in patients with infective endocarditis: a retrospective single-center study. Intern Med. 2013;52:1013-8.
- [学会発表](計 7件)
1. Nasu T, et al. Expression of MiR-23a Induces Telomere Shortening by Inhibiting Telomeric Repeat Binding Factor 2 in Patients with Coronary Artery Disease 第 80 回日本循環器学会 ; 2016 ; 仙台 .
  2. Takahashi K, et al. Dysregulation of ossification-related miRNAs in circulating osteogenic progenitor cells obtained from patients with aortic stenosis. 第 80 回日本循環器学会 ; 2016 ; 仙台 .
  3. 佐藤 衛. Elevated Senescence-associated MicroRNAs reduce Sirt1 Activity in Coronary Artery Disease: Randomized Study of Aggressive or Moderate Therapy with Pitavastatin. 第 79 回日本循環器学会 学術総会. 2015 年 3 月. 大阪
  4. Satoh M, et al. Circulating Toll-like receptor 4-responsive microRNA panel is a biomarker for coronary artery disease: Results from a randomized study of treatment with renin-angiotensin system blockades. The European Society of Cardiology Congress 2014. Aug. Barcelona.
  5. 佐藤 衛. Circulating toll-like receptor 4-responsive microRNA as a biomarker for coronary artery disease: A randomized study of treatment with RAS inhibitors. 第 78 回日本循環器学会 ; 2014 ; 東京都 .
- 6 . 研究組織
- (1)研究代表者  
佐藤衛 ( SATOH, Mamoru )  
岩手医科大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 90305996
- (2)研究分担者  
伊藤 智範 ( ITOH, Tomonori )  
岩手医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 30347851  
前沢 千早 ( MAESAWA, Chihaya )  
岩手医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 10326647  
石川 有 ( ISHIKAWA, Yuh )  
岩手医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 20583537  
八谷 剛史 ( HACHIYA, Tsuyoshi )  
岩手医科大学・いわて東北メディカル・メガバンク機構・准教授  
研究者番号 : 20580088  
志波 優 ( SHIWA, Yu )  
岩手医科大学・いわて東北メディカル・メガバンク機構・講師  
研究者番号 : 00647753