

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08179

研究課題名(和文) microRNA過剰発現ラットの作製とそれを用いた新しい不整脈発症機序の解明

研究課題名(英文) MicroRNA overexpression to establish a new arrhythmia model for studying its molecular mechanism.

研究代表者

森島 真幸 (MORISHIMA, Masaki)

徳島大学・病院・特任講師

研究者番号：40437934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では個体レベルでmicroRNA(miR-30d)が心房細動の病態形成にどのように関わるかを解析する目的で、心筋特異的miR-30d過剰発現ラットを作製した。陽性個体が数匹得られたが、miR-30d陽性のオスはより脆弱で短命であるため継代及び系の樹立に時間を要することがわかった。このため、ラットの作製に並行して細胞内カルシウム過負荷病態モデルを作製し、病態心におけるmiR-30dの発現増加メカニズムの解析と病態形成過程における血漿中miR-30d発現量の定量を行った。その結果、miR-30d発現量は血漿中並びに心房筋において病態の悪化に伴い増加することがわかった。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown that miR-30d is up-regulated in cardiomyocytes with persistent atrial fibrillation (AF), in response to cellular Ca²⁺-overload. It is well-known that abnormal Ca²⁺ dynamics may lead to the development of AF, however, mechanisms for microRNA-30d (miR-30d) up-regulation in AF cardiomyocytes have not been elucidated. To investigate whether Ca²⁺ overload regulates miR-30d expression in adult or neonatal rat cardiomyocytes, we infused angiotensin II (Ang II; 1.68 mg/kg/day) or noradrenaline (NA; 5.4 mg/kg/day) for 2 weeks via osmotic minipump into adult Wistar rats, because Ang II and NA are well-known drivers for onset of AF. Acute- or long-term stimulation of cardiomyocytes by Ang II induces elevation of miR-30d expression independently of the changes in blood pressure. The correlation of miR-30d expression between plasma and atrium was positively indicated. Our data would propose circulating miRNA-30d as promise biomarkers and therapeutic targets in AF.

研究分野：生理学、循環器病学、分子生物学

キーワード：microRNA 心房細動 遺伝子改変動物 細胞内カルシウム

1. 研究開始当初の背景

心房細動 (AF) の発症や持続は、イオンチャネル遺伝子の発現異常による心筋電的リモデリングが重要な原因となる。しかし、その詳細な成立機序は解明されていない。申請者らは、持続性 AF ヒト心房筋において microRNA-30d(miR-30d) が過剰発現することを発見した。これまで、AF の治療には既存の抗不整脈が使用されてきたが、実際に電的リモデリングが進行した心臓に対してはこれらの有効性が低いことが問題視されてきた。我々が注目した miR-30d は心房特異的 Kir3.1 チャネルの発現を制御することから、miR-30d をラットに投与して心電図記録を行うことで、心室性不整脈を引き起こすことなく心房特異的に不応期を調節できる核酸創薬として今後臨床応用できる可能性がある。さらに我々はすでに miR-30d を過剰発現させた遺伝子改変ラットを作製中である。これまで持続性 AF の病態を的確に現すモデル動物が存在しなかったため、新規の不整脈治療薬開発のための基盤研究の妨げとなってきたが、本ラットを用いて生理学的解析を行うことで AF の病因に関わる因子の同定につながることを期待される。

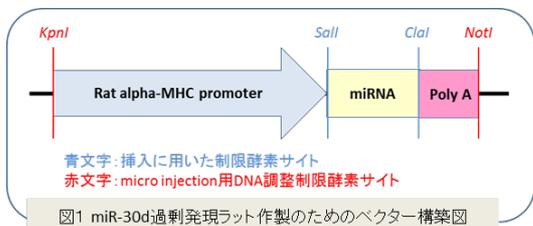
2. 研究の目的

miR-30d の生理作用、及び、その生合成過程や過剰発現トランスジェニックラットの表現系の解析などの未だ解明されていない miR-30d の基礎的問題を解決し、さらに miR-30d を核酸治療薬、あるいは診断マーカーとして臨床応用へと展開するための研究基盤を確立することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 心筋特異的 miR-30d 過剰発現ラットの作製

ユニテック社に心筋特異的 miR-30d 過剰発現ラットの作製を依頼し、心筋特異的遺伝子 alpha-MHC のプロモーター (5.4kb) の下流に miR-30d の前駆体を含む領域 (682bp) を連結したベクターを構築した (図 1)。



次にベクターをラットの受精卵へ injection し得られた個体から尻尾を採集しゲノム DNA を抽出後、genotyping を行い過剰発現の確認をした。(図 2) Founder ラット (F0) 獲得後 F1 ラットの 3 系統の導入コピー数をサザンブロットで確定し F1 ラット心臓において miR-30d が発現していることを確認した。

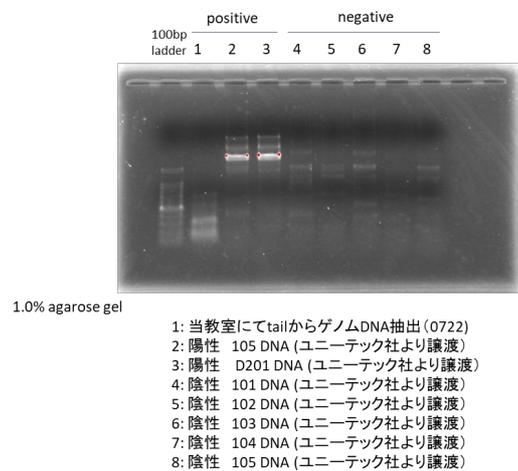


図 2. Genotyping 結果

(2) 細胞内 Ca²⁺過負荷モデルラットの作製 . 雄性 Wistar 系ラット (300-350g) の腹腔内に AngiotensinII (Ang II; 1.68 mg/kg/day) と Noradrenaline (NA; 5.4 mg/kg/day) を注入した浸透圧ポンプ (ALZET, 2ML2) を植え込み、二週間持続投与した。投与前、投与一週間後、投与二週間後に tail-cuff 法により血圧測定を行い、薬剤が有効濃度であることを確認した。投与二週間後に、心エコー検査、採血を行い、心臓組織 (心房筋、心室筋) を採取した。

(3) Ang II 急性投与実験 .

雄性 Wistar 系ラット (300-400g) に Ang II (2 mg/kg/day) を腹腔内投与して 6 時間後に採血・心臓組織 (心房筋、心室筋) の採取を行った。

(4) 心臓組織における 30d の発現解析 .

採取した組織を液体窒素で凍結・粉碎し、TRIzol (Invitrogen) で Total RNA を抽出した。10ng の Total RNA から TaqMan microRNA Reverse transcription Kit (ABI) により 30d と U6 (internal control) の cDNA を合成した。TaqMan Universal Master Mix (ABI) を用いて microRNA 発現量を real-time PCR により定量した。

(5) ラット血漿中における 30d 発現解析 .

EDTA 処理した血漿 250 μl から microRNA Extractor SP kit (Wako) により small RNA 分画を抽出した。血漿中の 30d 発現量は上述と同様の方法で定量した。

(6) 初代培養ラット心筋細胞の単離と培養 .

Wistar 系ラット仔 (day 0-1) の心室筋を摘出し、酵素法により心筋細胞を単離した。心筋細胞の自動拍動を確認した後 Ang II (1 μM)、NA (1 μM) 及び BNP (1 μM) を添加した培養液に交換して一定時間 (3, 6, 24 hr) 培養し、Total RNA の抽出を行った。

(7) 病態刺激後の心筋細胞における 30d の発現解析 .

QIAGEN 社の miRNeasy Mini Kit を用いて心

筋細胞から Total RNA を抽出した。病態刺激後の心筋細胞における 30d 発現動態の解析は上記 (4) と同様の方法で行った。

(8) 心筋細胞における BNP mRNA 発現解析 . 上述の方法により抽出した Total RNA 500 ng から Roche Transcriptor 1st strand cDNA Synthesis Kit を用いて cDNA を合成した。BNP mRNA 発現量は SYBR Premix Ex Taq (TAKARA) を用いて real-time PCR を行い定量した。

(9) microRNA、及びイオンチャネルの解析方法

心房細動患者の右心耳組織を用いた研究は、大分大学医学部ヒトゲノム研究倫理審査委員会による承認(P-14-05)を受け実施した。患者(家族)より文書による同意を得た患者から、開心術(あるいは該当手術時)において、体外循環回路にて体循環を維持する時に、右心耳に脱血カニューレを設置する際に切除され、通常は廃棄される数 mm の心房筋組織(右心耳他)を、摘出後直ちに液体窒素で凍結し保存した。2013 年 3 月までの間に大分大学医学部心臓血管外科にて大動脈瘤や弁置換手術を受けた患者 260 例(文書による同意を得ている)の中から、60~70 歳代の男性をピックアップし、さらに重度の心不全、糖尿病、ステロイド治療、透析、心筋炎、発作性心房細動の既往歴を持つ患者は除外して洞調律群(対照群)19 例、慢性 AF 群 14 例を選出した。採集した心房筋は液体窒素中で粉碎後、miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) により totalRNA を抽出した。Total RNA の精度は Agilent 社製のバイオアナライザーにより解析した。マイクロアレイ (Human miRNA Microarray, 8 x 60K, ID31181, miRBase release 16.0, Agilent Technologies) は、miRNA labeling and hybridization kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) の手順に沿って行った。Array プレートはスキャナーを中心としたシステム (ハイブリダイゼーションオープン/ロータ G2545A, AgilentDNA マイクロアレイスキャナー G2565BA) により解析した。マイクロアレイ実験に関する詳細な情報は NCBI のデータベース [Gene Expression Omnibus (GEO) repository accession number GSE68475

(www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE68475)] に登録した。マイクロアレイデータの解析 (cluster analysis, volcano plot analysis) は、遺伝子解析ソフト (GeneSpring GX software, version 11.5, Agilent Technologies) により行った 9)。

MicroRNA-30 ファミリーの発現確認は Taqman Micro RNA assay kit (アプライドバイ

オシステムズ) を用いて行った。10ng の Total RNA から TaqMan[®] microRNA Reverse transcription Kit (ABI) により miR-30a, 30b, 30c,

Gene	Literature Symbol	Protein
CACNA1C	Cav1.2	L-type Ca ²⁺ channel
SCN5A	Nav1.5	Voltage-gated Na ⁺ channel
KCNJ2	Kir2.1	Inward-rectifier K ⁺ channel
KCNJ3	Kir3.1	Acetylcholine-activated K ⁺ channel
KCNJ5	Kir3.4	Acetylcholine-activated K ⁺ channel
KCNA5	Kv1.5	Shaker-related voltage-gated K ⁺ channel subfamily member 5
KCNH2	hERG	Human ether-a-go-go related gene
MYH6	MHC- α	myosin heavy chain 6
GAPDH	GAPDH	Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase

表 1. Real-time PCR 法により発現確認した遺伝子群

30d, 30e と U6 (internal control) の cDNA を合成した。TaqMan Universal Master Mix (ABI) を用いて microRNA 発現量を real-time PCR により定量した。

(10) miR-30d の心筋細胞導入と電気生理学実験

異常発現する microRNA が心筋細胞の電気活動にどのような影響を及ぼすかを明らかにするために、Anti-miR miRNA inhibitor (Ambion 社) を用いたノックダウン実験や Pre-miR-miRNA molecule (Ambion 社) を用いた発現誘導実験により機能解析する。HEK293 細胞、及びラット心筋細胞に Lipofectamine を用いて microRNA を導入し、心筋細胞の興奮性を制御するかどうかをパッチクランプ法 (HEKA 社製パッチクランプワークステーション) により確認する。

4. 研究成果

(1) 初代培養ラット心筋細胞に α MHC-30d vector を transfection した際の miR-30d 発現量の確認実験 .

心筋特異的 miR-30d 過剰発現ラット構築のために作成したプラスミドが、実際の細胞内で work するかどうかについて確認する実験を行った。初代培養ラット心筋細胞に同プラスミドを遺伝子導入すると、vector 濃度依存的に miR-30d 発現量が増加することが確認できた。vector 濃度 2-5 μ g になると死細胞が増えたため、1 μ g が適切な条件と考えられた。 α MHC-30d vector 1 μ g を心筋細胞に transfection することで miR-30d 発現量は 2 倍程度増加する結果が再現された。また、miR-30d の Target gene の発現の抑制も認められた (図 3)。

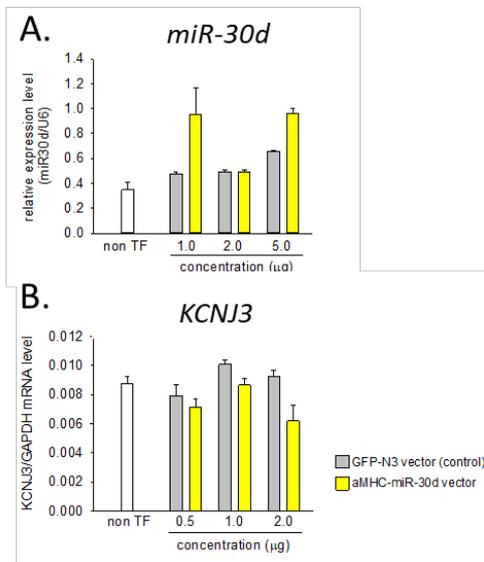


図3. miR-30d過剰発現プラスミド導入後のmiR-30d発現量(A)と標的遺伝子KCNJ3 mRNA発現量

(2) 細胞内 Ca²⁺過負荷モデルラットを用いた検討.

Ang II と NA の持続投与群では、投与後1週間から収縮期血圧の有意な上昇が確認され、Ang II と NA の投与量が有効濃度であることを確認した。解剖時の心体重量比は Ang II 群で有意に増加し肥大を呈していることが判明した。持続的に Ang II, NA を負荷したラットの心房筋では Ang II 群のみで 30d 発現量の有意な増加が認められた。また、Ang II の急性投与では心房筋の 30d 発現量は増加傾向にあった。血漿 Ang II により急性、及び持続投与では 30d の発現量を著しく増加させた。さらに、血漿中の 30d 発現量は心房筋の発現量と正の相関を示した (図 4)。

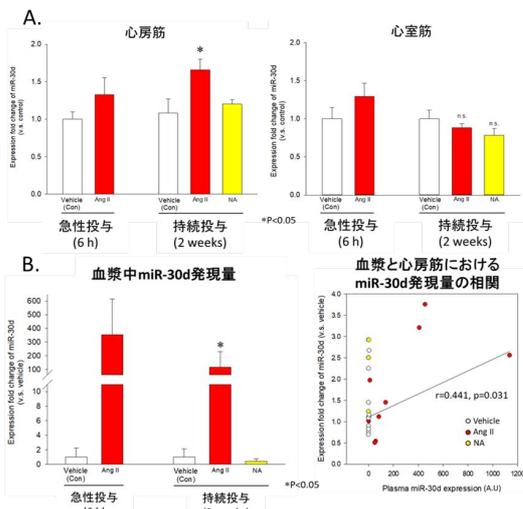


図4. AngII・NA投与ラットの心房、心室組織(A)、及び血漿におけるmiR-30d発現量(B)。Ang II持続投与により心房筋並びに血漿miR-30d発現量は有意に増加した。さらに、血漿中miR-30d発現量は、心房筋miR-30d発現量と正の相関を示した。

(3) AngII, NE 負荷実験 (In vitro)

心筋細胞の培養液中に Ang II を添加すると 30d 発現量は 3, 6, 24 時間のすべての時間帯

で有意に増加した。また、同サンプルで Ang II 刺激 6 時間、24 時間で BNP 発現量が有意に増加することを確認した。そこで、BNP が 30d 発現を増加させるかどうかについて検討を行ったところ、心筋細胞に BNP を作用させると、濃度依存的、時間依存的に 30d 発現量が増加することが判明した。このことから、Ang II 刺激(6, 24 h)による 30d 発現量の増加は BNP 産生を介する可能性が示唆された。

(4) ヒト心房筋における miR-30d 発現量解析

マイクロアレイの結果を検証するために検体数を増やして miR-30d 発現を real-time PCR 法により解析した。その結果、miR-30d 発現量は AF 群で有意に増加することが確認された(図 5)。さらに、miR-30d の標的遺伝子である CACNA1C (Cav1.2) mRNA と KCNJ3 (Kir3.1) mRNA 発現量を調べた結果、正の相関関係が認められた。さらに、Kir3.1 タンパク発現量は AF 群で有意に減少することが分かった。以上の結果から、持続性 AF 心房筋において、miR-30d が過剰発現することでアセチルコリン感受性 K⁺チャネル (Kir3.1) 発現、電流 ($I_{K,ACh}$) が有意に抑制される可能性が示唆された。

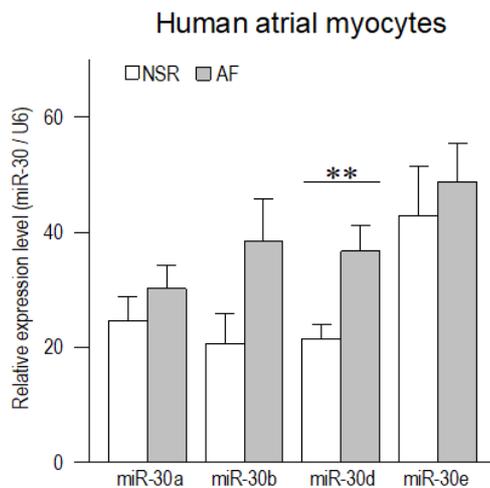


図5. ヒト心房筋における miR-30 family 発現量 (Real-time PCR)

NSR: 正常洞調律群(n=19), AF: 持続性 AF 群(n=14)

**p<0.01, vs. NSR.

(5) miR-30d 過剰発現、及びノックダウン実験

心筋細胞における miR-30d の機能を調べた。初代培養ラット心筋細胞に miR-30d オリゴを導入しターゲット遺伝子の発現変化を調べた。miR-30d の予想ターゲット遺伝子のひとつである Cav1.2 mRNA 発現は、miR-30d を過剰発現させてもノックダウンしても変化せず miR-30d との相互作用は認められなかった。一方、もうひとつの予想ターゲット遺伝子である Kir3.1 は、mRNA、タンパク発現共に miR-30d のオリゴ濃度依存的に有意に抑制さ

れ miR-30d と Kir3.1 の interaction が認められた。さらに、Anti-miR30d オリゴを用いてノックダウン実験を行ったところ KCNJ3 mRNA、及びタンパク発現は有意に増加した。以上の結果より、miR-30d は Kir3.1 の発現を転写後レベルで制御することが確認された。また、Pre-miR-30d により miR-30d を過剰発現させると、Kir3.1 の機能としての $I_{K,ACH}$ 電流が減少することが確認された(図 6)。多数例においても、 $I_{K,ACH}$ 電流は内向き、外向きともに減少したことからこの電気生理学的変化は Kir3.1 発現の減少によるものだと考えられた。

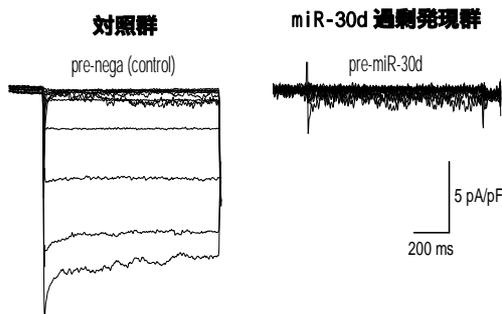


図 6. ラット心筋細胞におけるアセチルコリン感受性 K^+ チャンネル電流($I_{K,ACH}$)。

両群ともカルバコール(20 μ M)添加後の電流を示す。

対照群；negative control オリゴ(30 nM)導入。
miR-30d 過剰発現群；Pre-miR-30d(30 nM)導入

本研究から、Ang II は心房筋、血漿中の 30d 発現を増加させる因子であることがわかった。30d 発現量増加の経路としては、RAS 活性化による急性作用と BNP の産生を介した亜急性・長期作用のふたつの経路が存在することが初めてわかった。さらに、血圧増加という単独因子では 30d 発現は変化しないことも示された。また、Ang II 負荷ラットの血中 30d 発現量は心房筋における発現量を反映することが、今回の研究で初めて明らかになった。このことから、先行研究で発見したヒト心房細動心筋で過剰発現する 30d は、心房細動の発症予測や持続を反映するバイオマーカーとして今後、有用となる可能性が示唆された。

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 5 件)

1. Masuda K, Takanari H, Morishima M, Ma F, Wang Y, Takahashi N, Ono K. Testosterone-mediated upregulation of delayed rectifier potassium channel in cardiomyocytes causes abbreviation of QT intervals in rats. *J Physiol Sci*. 2018 Jan 13. doi:

10.1007/s12576-017-0590-4. 査読有

2. Morishima M, Iwata E, Nakada C, Tsukamoto Y, Takanari H, Moriyama M, Miyamoto S, Ono K. Atrial fibrillation-mediated up-regulation of miR-30d regulates myocardial electrical remodeling of G-protein-gated K^+ channel, $I_{K,ACH}$. *Circ J*. 80(6):1346-55, 2016. doi: 10.1253/circj.CJ-15-1276. 査読有

3. Ma F, Takanari H, Masuda K, Morishima M, Ono K. Short- and long-term inhibition of cardiac inward-rectifier potassium channel current by an antiarrhythmic drug bepridil. *Heart Vessels* Jul;31(7):1176-84, 2016. doi: 10.1007/s00380-015-0762-1. 査読有

4. 森島真幸: ヒト心房細動心筋において過剰発現する microRNA の機能的意義の解析. *日本病態生理学会雑誌* 第 24 巻 3 号 34 - 39, 2015 年 査読有

5. Shimaoka T, Wang Y, Morishima M, Miyamoto S, Ono K. Hypomagnesemic down-regulation of L-type Ca^{2+} channel in cardiomyocyte as an arrhythmogenic substrate in rats. *Pathophysiology* 22: 87-93, 2015. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Masaki Morishima, Kazuki Horikawa, Makoto Funaki. Development of in vitro NASH Model with Mechanically Compliant Substrate. 78th America Diabetes Association 第 78 回米国糖尿病学会、2018/6/22-25, (米国オランダ)

2. 森島真幸, 堀川一樹、船木真理. 生体環境に類似した肝細胞培養システムを利用した非アルコール性脂肪肝炎の in vitro モデルの作成. 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会 2018/5/23-25 (東京国際フォーラム、東京都)

3. Masaki Morishima, Kazuki Horikawa, Makoto Funaki. Mechanically Physiological Microenvironment Sensitizes Primary Cardiomyocytes to Glucotoxicity; New In Vitro Diabetic Heart Research Model. 第 77 回米国糖尿病学会、2017/6/9-13, (米国サンディエゴ)

4. 森島真幸, 堀川一樹、山崎幸、堤理恵、阪上浩、船木真理. 生体環境に類似した心筋細胞培養システムを用いた高グルコース負荷応答の評価. 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会 2017/5/18-20, (名古屋国際会議場、愛知県名古屋市)

5. 岩田英理子、森島真幸、高成広起、宮本伸二、小野克重. ヒト心房細動心筋において過剰発現する miR-30d の機能解析. 第 26 回日本病態生理学会 2016/8/5-7, (金沢医科大学、石川県河北郡内灘町)

6. Yabusaki M, Morishima M, Takanari H, Ono K. A novel pathway for up-regulation of microRNA expression in cardiomyocytes exposed to angiotensin II. 第 93 回日本生理学会大会、2016/3/23-25, (札幌コンベンションセンター、北海道札幌市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：細胞の in vivo での特性を反映した細胞の応答の評価
発明者：森島真幸、船木真理
権利者：メカノジェニック株式会社
種類：特許
番号：特願 2017-074020
出願年月日：2017 年 3 月 15 日
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

森島 真幸 (MORISHIMA, Masaki)

徳島大学・病院・特任講師

研究者番号：40437934