

令和元年5月23日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03206

研究課題名(和文) 心臓リハビリテーションによる骨髄老化への有効性の検証

研究課題名(英文) Efficacy of Cardiac Rehabilitation on bone marrow aging and immunosenescence in patients with cardiovascular diseases

研究代表者

磯 良崇 (Iso, Yoshitaka)

昭和大学・大学共同利用機関等の部局等・准教授

研究者番号：60384244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、急性心筋梗塞後における運動耐容能に焦点をあて、バイオマーカーとしてmicroRNA(miR)に着目し、その関連性を検討した。網羅的small RNA解析・定量的RT-PCR解析により、急性心筋梗塞の急性期経過中に大きな変動を示す一群のmiRを同定した。その中で、免疫老化関連miRであるmiR-181cが、急性心筋梗塞例の運動耐容能・換気効率と統計的に相関することが明らかになった。また、心臓リハビリテーションにおける換気効率の改善効果とも関連していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、末梢血miR-181cが、急性心筋梗塞後に発現が上昇し、発現レベルが運動耐容能と相関することを、初めて明らかにした。安静時の末梢血miR-181c測定は、心疾患の病態・病勢・身体活動度を評価する上で、画期的なliquid biopsyとなることが期待される。また、末梢血miR-181cは免疫老化(骨髄老化)と関連していることが報告されている。免疫老化が、心筋梗塞発症後の運動耐容能や心臓リハビリテーションの効果を規定する可能性があり、心・骨髄・骨格筋関連と言う新たな疾患概念が示唆され得る。

研究成果の概要(英文)：Cardiorespiratory fitness (CRF) is associated with severity and mortality in patients with cardiovascular diseases (CVD). It remains controversial whether circulating microRNAs (miRs) could be biomarkers for CVD. Thus, we investigated the link between circulating miRs and CRF in patients after acute myocardial infarction (MI). Quantitative RT-PCR analysis for circulating miRs was performed. The CRF was determined by cardiopulmonary exercise testing. We found that the levels of miR-181c, the immunosenescence-associated miR, significantly correlated to the peak oxygen consumption and ventilatory efficiency in the MI patients. Part of the patients participated in outpatient cardiac rehabilitation program. The miR-181c levels showed the significant association with improvement of ventilatory efficiency from before to after the program. Results of the present study suggested that circulating miR-181c would be a potential biomarker for CRF in patients after acute MI.

研究分野：循環器内科, 心臓リハビリテーション

キーワード：microRNA 運動耐容能 急性心筋梗塞 免疫老化 心臓リハビリテーション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心血管疾患の多くは、生活習慣病・加齢を基盤とした動脈硬化の進行とともに発症する。動脈硬化の発症機序には、単球・マクロファージ系を中心とする骨髄由来の免疫細胞による病態修飾が重要である (Libby P. Nature 2002)。申請者は、これまでにヒト冠動脈生検検体における単球関連因子の発現について報告した (Iso Y, et al. J Cardiol 2003)。また、加齢や急性心筋梗塞における骨髄由来幹細胞の末梢血動員について検討を行ない、加齢による造血幹細胞数の低下や急性心筋梗塞発症後の間葉系幹細胞数の増加を報告し、骨髄幹細胞老化・免疫老化が心血管病に関連することを明らかにした (Iso Y, et al. Stem Cells Transl Med 2012)。

急性心筋梗塞において、心筋逸脱酵素値や心臓超音波で見る心機能よりも、運動耐容能を示す最高酸素摂取量・嫌気性代謝閾値は、患者の予後をより反映することが知られている。心臓リハビリテーションは、運動耐容能を改善し、その冠動脈疾患に対する2次予防の有効性は、循環器病診療ガイドラインでの推奨レベルが高い。慢性腎臓病合併の重症な心筋梗塞においても、運動耐容能の改善を認めた (Iso Y, et al. Int J Cardiol 2015)。

しかしながら、骨髄・免疫機能に関連する因子と運動耐容能指標との関連を示す報告は、これまで皆無である。そのため、心臓リハビリテーションが骨髄・免疫機能に及ぼす影響は不明である。

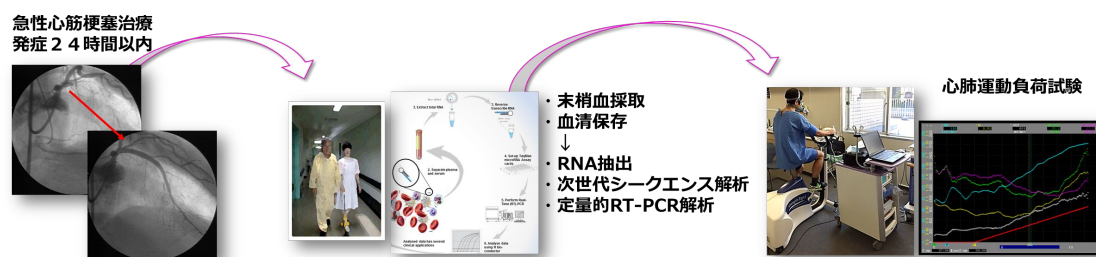
2. 研究の目的

心血管病における身体活動向上・運動療法の、臨床疫学的・生理学的な有効性が明示されながら、改善効果を示す機序としての分子細胞生物学的な検討は十分になされていない。本研究では、“骨髄老化”を心血管病の病態背景と認識し、骨髄・免疫老化のバイオマーカーとして microRNA (miR) に着目し、その変動の同定や、急性心筋梗塞症例の運動耐容能と心リハの効果との関連性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

概要：急性心筋梗塞症例より採取した末梢血を用い、血中由来 miR の網羅的ならびに特異的発現解析を行った。心肺運動負荷試験により、運動耐容能・換気指標を測定した。末梢血 miR 発現の変化ならびに臨床指標との関連性を検討した。

(概要図)



対象：急性心筋梗塞（発症24時間以内に緊急冠動脈形成術を実施）で回復期に心肺運動負荷試験を実施した40例（予定）。臨床背景（冠危険因子、入院後治療経過、使用薬剤）を抽出。除外基準 死亡例、心肺蘇生例、維持血液透析例。

血液採取、RNA抽出・検定：入院時、1、3、7日の末梢血採血後、血清を分離し凍結保存する（一部症例では、心臓リハビリテーションプログラム終了時含）。RNA isolation kitによりRNAを抽出し、NanoDrop・Bioanalyzerで定性・定量判定を行った。

RNA網羅解析：次世代シーケンス解析により、全RNAよりmiRを含む各small RNAの発現を網羅的・半定量的に検出した。種別分類・階層的クラスタリングを行い、統計学的に主

成分分析および k-means 解析を実施した。

定量的 PCR 法：抽出 RNA を用い、標的 miR の Taqman プローベによる定量的 RT-PCR 解析を実施し、発現量測定を行った。実測値として -CT 値で判定し、external control として Cel-miR-39-3p を用い発現量の補正を行った。発現量の群間比較においては、fold change を算出した。

心肺運動負荷試験：発症約 3 週後に、検査を実施。使用機器は、自転車エルゴメータ、運動負荷装置と連続呼気ガス分析装置（ミナト医科学 AE-310S）を用いた。プロトコールは、ウォーミングアップ後、10watt 漸増 ramp 負荷で症候限界性に行った。評価項目は、嫌気性代謝閾値（anaerobic threshold：AT）および最高酸素摂取量（peak V_{O2}）と、換気効率（VE vs V_{CO2} slope）とした。

各種諸検査：血液生化学、心臓超音波検査、血管内皮機能検査を実施。

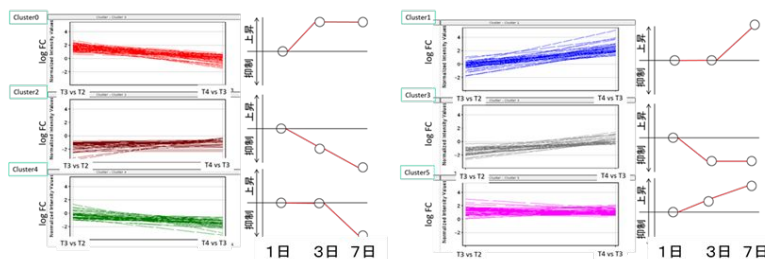
外来心臓リハビリテーションプログラム：参加可能であった症例に対し、心肺運動負荷試験で同定した AT レベルでの仕事率もしくは心拍数により運動処方を決定。運動処方に準じ、週 1 - 3 回で約 1 時間の運動療法を実施した。5 か月のプログラムを実施し、完遂者には終了時に心肺運動負荷試験の再評価を行った。

4. 研究成果

(1) 末梢血 RNA の網羅的 smallRNA 解析と定量的 miR 発現解析：

急性心筋梗塞症例において、発症後 1 日、3 日、7 日の末梢血より RNA を採取し、次世代シーケンスにより全 smallRNA の発現を解析した (n=4)。1 日 vs 3 日と 3 日 vs 7 日と 1 日 vs 7 日のうち、少なくとも 1 つ以上の解析で発現変動が有意であった遺伝子 324 遺伝子をリストアップし、発現変動遺伝子を 6 クラスターに分類した (図)。1 日から 7 日かけて発現上昇するクラスター 0・1・5 で、発現変化量が上位の miR と免疫関連 miR を選定し、定量的 RT-PCR による発現解析を実施した。

k-means 解析 6 クラスター



(図) 急性心筋梗塞発症後 1 日、3 日、7 日における末梢血中の smallRNA 発現変化パターン変化によるクラスター分類。

選定した miR は、miR-18a, -30c, -146a, -155, -181a/b/c, -186, -214, -484 となった。

急性心筋梗塞症例において、各 miR を定量的 RT-PCR 法で発現解析を行った (解析済み 15 例)。また、心疾患のない健常コントロール 5 例より抽出した末梢血 RNA を用い、同様の miR 発現解析を行った。コントロールと比較して、急性心筋梗塞 7 日後は、miR-155, 181a, 181c, 186 が有意に発現上昇していた。特に、miR-181c は、fold change が約 1:20 で、急性心筋梗塞での高発現が明らかとなった (p<0.01)。市販の各臓器 RNA で、miR-181c 発現を検討したところ、心臓を基準にして、免疫細胞ならびに肥大心で高発現を認めた。

(2) 末梢血 miR-181c と心筋梗塞後運動耐容能との関連性：

末梢循環 miR-181c は、コントロールより心筋梗塞後 1 日で発現量が多く、経日的に増加し 7 日が頂値となることが明らかとなった。上述の通り、7 日後には、かなりの高発現を認めた。

心肺運動負荷試験は、発症後約 3 週間で実施した。急性心筋梗塞症例は、最高酸素摂取量 17.3 ± 3.8 ml/min/kg、平均 % 予測値 74% と低運動耐容能であった。最高酸素摂取量は、心疾患患者の予後予測因子であり、心機能とは相関しない。本研究でも、心筋逸脱酵素や心臓超音波での

心機能指標は、相関を認めなかった。一方で、末梢循環 miR-181c 発現量（7日）は、心肺運動負荷試験で得られる最高酸素摂取量・嫌気性代謝閾値と正相関を認めた（表）。一方で、同じく予後指標である換気効率（高値なほど悪い）とは、負の相関を認めた。重症度のカットオフ値で分けると、コンディション不良群（酸素摂取量・換気効率）は、有意に miR-181c が低値であった。

(表) miR-181 (7日)

		miR-181a		miR-181b		miR-181c	
		r	p	r	p	r	p
心筋逸脱酵素	Peak CK	0.050	0.866	0.069	0.816	-0.117	0.690
	Peak CK-MB	0.154	0.598	0.167	0.569	0.069	0.815
	Peak Tnl	0.098	0.740	-0.028	0.923	-0.037	0.899
心エコー	EF	-0.319	0.266	-0.149	0.612	-0.130	0.659
	LVDd	-0.078	0.791	-0.059	0.840	-0.250	0.389
心肺運動負荷試験	AT	0.265	0.360	0.337	0.238	0.557	0.039
	Peak VO2	0.365	0.199	0.377	0.184	0.639	0.014
	%PPVO2	0.274	0.344	0.388	0.171	0.567	0.035
	VEvsVCO2slope	-0.225	0.439	-0.374	0.187	-0.698	0.006

(3) 末梢血 miR は心臓リハビリテーションの効果に関連するか？：

急性心筋梗塞 15 例中 8 例が、外来心臓リハビリテーションプログラムを完遂し、終了時に心肺運動負荷試験による再評価を行った。運動耐容能は増加し、換気効率指標は低下（改善）を認めた。末梢循環 miR-181c 発現量（7日）は、換気効率の変化量と負の相関を認めた。すなわち、発症初期の miR-181c の高発現は、その後の心臓リハビリテーションの効果予測し得る可能性が示された。

一部の症例において、急性期と心臓リハビリテーションプログラム終了時（5か月）の末梢血 RNA を用い、次世代シーケンス解析を行った。対照として、心臓リハビリテーション非参加の急性心筋梗塞症例で、同時期に採血を行ったものを用いた。その結果、心臓リハビリテーション参加と非参加で、相反する変動を示す miR が、6 候補あったが、この中に、miR-181 は含まれておらず、詳細な解析を継続中である。

(4) 国内外における位置づけとインパクト：

心疾患における末梢血 miR のバイオマーカーとしての有用性は、まだ議論が多く、結論を得ていない (Tijssen AJ, et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2012)。本研究は、急性心筋梗塞後における運動耐容能に焦点をあて、末梢血 miR との関連性を検討した。心疾患において、心肺運動負荷試験で測定される運動耐容能や換気効率は、再発や生命予後の予測指標であり、この観点からの報告は、国内外において皆無である。また、miR 変動と運動耐容能の関連を明らかにする事は、心臓リハビリテーションの効果の機序を示す可能性があると考えられた。

miR-181 family member は、従来、リンパ球・骨髄球の分化や免疫活性を制御することが知られ、近年、血管細胞における炎症に関与していることも報告されている (Sun X, et al. Trends Cardiovasc Med. 2014)。しかしながら、心筋梗塞との関連は、これまで報告はなかった。本研究では、末梢血 miR-181c が、発症後に発現上昇すること、7日目の発現レベルが、回復期初期の運動耐容能・換気効率と相関すること、心臓リハビリテーションの換気効率への効果を予測する可能性があること、を世界に先駆け、初めて明らかにした。安静時の末梢血 miR-181c 測定は、急性心筋梗塞症例の重症度評価とともに、心リハ参加基準を示す指標になり得る点で、画期的な liquid biopsy となると期待される。

また、末梢血 miR-181c の発現低下は、免疫老化（骨髄老化）に関連することが報告されている (Seeger T, et al. Eur J Heart Fail 2013)。本研究との結果と合わせると、miR-181c で反映される免疫老化の状態が、心筋傷害度や心機能と関係なく、心筋梗塞発症後の運動耐容能

や心臓リハビリテーションの効果を規定する可能性があることが示唆された。このことは、心疾患の病態・病勢・身体活動度を評価する上で、心・骨髄・骨格筋連関と言う新たな重要な概念を創出すると考えられた。

(5) 今後の展望：

本研究での膨大な末梢血 small RNA 解析により、骨髄老化関連 miR である miR-181c の心疾患の運動耐容能における重要性が示された。しかしながら、この知見を確定させるために、より多くの対象を要する。また、心臓リハビリテーションの効果を予測する miR と、心臓リハビリテーションにより変動する miR は異なると考えられ、この検討は、今後の課題となった。さらに、miR-181c の末梢血動員の機序や生物学的活性について、基礎的検討により明らかにしていく必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 21 件)

Iso Y, Suzuki H, et al. Prevalence and Significance of Sleep-Disordered Breathing in Adolescent Athletes. *European Respiratory Journal Open Research* 2019 11;5. pii: 00029-2019. doi: 10.1183/23120541.00029-2019. (査読あり)

Iso Y, Suzuki H, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibit vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia after arterial injury in rats. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2018;16:79-87. doi: 10.1016/j.bbrep.2018.10.001. (査読あり)

Iso Y, Suzuki H, et al. Therapeutic potential of cycling high-intensity interval training in patients with peripheral artery disease: A pilot study. *IJC Heart and Vasculature*. 2018; 18:30-32. doi: 10.1016/j.ijcha.2018.02.002. (査読あり)

高橋哲也、磯良崇. 理学療法と臓器連関. *理学療法ジャーナル*, 51(8):651-656, 2017. NAID: 40021274398 (査読あり)

高橋哲也、磯良崇. 周術期における心臓リハビリテーション：最新の動向と課題. *循環制御*, 38(2):89-95, 2017. doi: 10.11312/ccm.38.89. (査読あり)

Sasai M, Iso Y (2 番目), Suzuki H, et al. Potential contribution of the hepcidin-macrophage axis to plaque vulnerability in acute myocardial infarction in human. *Int J Cardiol*. 2017;227:114-121. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.11.147. (査読あり)

Mizukami T, Iso Y (2 番目), Suzuki H, et al. Priming with Erythropoietin Enhances Cell Survival and Angiogenic Effect of Mesenchymal Stem Cell Implantation in Rat Limb Ischemia. *Regenerative Therapy* 2016;4:1-8. doi: 10.1016/j.reth.2016.01.004. (査読あり)

Kitai H, Suzuki H, Iso Y (8 番目), et al. Therapeutic impact of cardiac rehabilitation exercise on cardiac Fabry woman treated with enzyme replacement therapy. *Int J Cardiol Metabolic and Endocrine*. 2016;13:23-25. doi: 10.1016/j.ijcme.2016.09.007. (査読あり)

磯良崇、野木彩香. 末梢動脈疾患の予防に向けた病態解明 心臓リハビリテーション(JJCR). 22:136-141. 2016. NAID: 40021145919 (査読あり)

磯良崇、北井仁美. 心肺運動負荷試験による心疾患のコンディション評価. *バイオメカニクス研究*. 20:93-99. 2016. NAID: 40020995117 (査読あり)

[学会発表](計 20 件)

Iso Y, Takahashi T, Koba S, Suzuki H, et al. Circulating MicroRNA-181c levels are Associated with Cardiorespiratory Fitness in Patients after Myocardial Infarction. 第 83 回日本循環器学会学術集会 (2019 年 3 月、横浜)

Iso Y. Electrical and Structural Adaptation of Athlete's Heart in Japanese Adolescents. 第 83 回日本循環器学会学術集会 トピック 23 (2019 年 3 月、横浜)

磯良崇、ほか. 大血管疾患リハビリテーションと運動機能障害合併例. 第 2 回日本リハビリテーション医学会秋季学術集会(日本心臓リハビリテーション学会ジョイントシンポジウム) (2018 年 11 月、仙台)

磯良崇、ほか. 心臓リハビリテーションから見るアスリート診療. 第 24 回日本心臓リハビリテーション学会学術集会(シンポジウム)(2018 年 7 月、横浜)

磯良崇、高橋哲也、木庭新治、鈴木 洋. 急性心筋梗塞後の運動耐容能と末梢循環 microRNA. 第 24 回日本心臓リハビリテーション学会学術集会(シンポジウム)(2018 年 7 月、横浜)

磯良崇、他. STEMI with CKD における phase-II 心臓リハビリの有効性. 第 8 回日本腎臓リハビリテーション学会(ジョイントシンポジウム)(2018 年 3 月、仙台)

Kyuno E, Iso Y, Suzuki H, et al. Exercise-based cardiac rehabilitation improved long-term outcome in ST-elevation myocardial infarction regardless of reperfusion time on admission. American Heart Association Scientific Session 2017 (アナハイム (米国))
磯 良崇、鈴木 洋. 末梢動脈疾患における cycle ergometer interval training の可能性.
第22回日本心臓リハビリテーション学会学術集会 (シンポジウム) (2016年7月, 東京)
磯 良崇、ほか. 心不全に対する戦略的包括的チーム医療. 第22回日本心臓リハビリテーション学会学術集会 (シンポジウム) (2016年7月, 東京)
磯 良崇、鈴木 洋. 末梢動脈疾患 (成因・治療). 第22回日本心臓リハビリテーション学会学術集会 (シンポジウム) (2016年7月, 東京)

〔図書〕(計 1 件)

磯 良崇 (分担執筆) 伊東春樹・百村伸一 (監修) 高橋哲也 (編) わかる! できる! 心臓リハビリテーション Q&A (2018年) 医歯薬出版

〔その他〕

メディア

日刊ゲンダイ 平成29年5月16日発刊号

元気になる健康ワイド特集 p12 「有名病院 この診療科イチ押し治療」
心臓病のリハビリー昭和大学藤が丘リハビリテーション病院/循環器内科
インタビュー: 磯 良崇

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 鈴木 洋

ローマ字氏名: SUZUKI, hiroshi

所属研究機関名: 昭和大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号 (8桁): 90266106

研究分担者氏名: 木庭新治

ローマ字氏名: KOBA, shinji

所属研究機関名: 昭和大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号 (8桁): 20276546

研究分担者氏名: 高橋哲也

ローマ字氏名: TAKAHASHI, tetsuya

所属研究機関名: 昭和大学

部局名: 医学部

職名: 客員教授

研究者番号 (8桁): 00461179

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。