

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07011

研究課題名(和文) 剖検心の網羅的遺伝子解析による心不全の新規バイオマーカー探索

研究課題名(英文) Search for novel biomarkers of heart failure by comprehensive genetic analysis of autopsy heart

研究代表者

吉田 誠 (Yoshida, Makoto)

秋田大学・医学系研究科・講師

研究者番号：70637553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではControlを含む全12例の剖検心でRNA-seq解析を行った。心不全群とコントロール群との比較から発現が亢進もしくは低下している遺伝子が全部で6826個確認された。その中にはANPやCRPといった心不全で見られるタンパクをコードする遺伝子が確認された。この結果から、選択した剖検心が心不全症例として矛盾しないものと考えられた。RT-PCRで検証を行い、解析の結果と同様に発現の亢進および減弱が確認できた。その中で、NADPHオキシダーゼの触媒サブユニットである、NOX1-5、DUOX1、2の3つが発現していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界全体で心不全に罹患している患者は多く、心不全治療は現在でも臨床現場におけるトピックの一つである。心不全の病態解明、治療への応用のためには心不全時心筋の分子生物学的解析が必要とされるが、心臓はその特殊性から網羅的遺伝子解析による知見の蓄積が非常に乏しい。本研究では心不全症例の剖検心で網羅的遺伝子発現解析を行い、心不全患者の心筋における遺伝子発現を明らかとした。その中から新規の心不全指標となりうる遺伝子が同定された。新たな心不全の指標となりうるかについてはさらなる解析が必要だが、心不全を早期で捉え、早期治療介入や治療ターゲット、創薬への応用として期待され、その社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, RNA-seq analysis was performed on 12 autopsy hearts including Control. From the comparison between the heart failure group and the control group, a total of 6286 genes whose expression were up-regulated or down-regulated were confirmed. Among them, genes encoding proteins found in heart failure such as ANP and CRP were confirmed. From this result, it was considered that the selected autopsy heart was consistent with the heart failure cases. Some genes were picked up, and verified by RT-PCR. The gene expression were confirmed same as the results of RNA-seq analysis. Among them, it was found that three catalytic subunits of NADPH oxidase, NOX1-5 and DUOX1, 2, were up-regulated. Currently, we are investigating the correlation between the NOX1 gene expression and the ejection fraction of the left ventricle, which is an index of heart failure.

研究分野：循環器病理学

キーワード：心不全 網羅的遺伝子発現解析 RNA-seq バイオマーカー

1、研究開始当初の背景

心不全の多くは左室収縮能の低下を背景としており、臨床では心臓超音波検査で左室収縮能を評価し、血中 BNP 値をもとに心不全の重症度を評価するのが一般的である。しかし、いずれも左室心筋細胞に生じている分子生物学的変化を直接捉えるものではなく、心不全時の心筋細胞に起きている分子生物学的変化を正確に捉えることはできていない。その理由の一つとして、心筋組織を採取する機会が乏しいことがあげられる。心筋生検は左室心筋細胞を組織学的に評価する限られた機会の一つであるが、現状では左室収縮能を反映するバイオマーカーが同定されていないため、病理組織検体から心筋の収縮能を評価することは極めて困難である。そのため、心筋バイオマーカーを探索する研究が望まれるが、そもそも心筋は組織サンプルを採取することが難しいという事情がある。生前に豊富な心筋サンプルを採取できるのは心臓移植が施行された症例に限られるが、心臓移植の適応となるのは末期重症心不全のみで、本邦では症例数自体が少ない。既報研究も少数例の心臓移植症例を対象としたもののみである。

ここで、我々は日常業務として病理解剖を行っており、心筋サンプルを採取することが可能である。申請者はこの剖検症例の中の心不全症例に着目し、心不全症例での心筋オミックス研究に取り組むこととした。

2、研究の目的

本研究では、心機能正常群(Control 群)の心筋と、心不全群(CHF 群)を比較し、収縮能の低下に伴って発現が変化する遺伝子やマイクロ RNA、疾患特異的な発現異常を示す遺伝子を絞り込み、左室収縮能低下を反映する新たなバイオマーカーの確立を目指す。

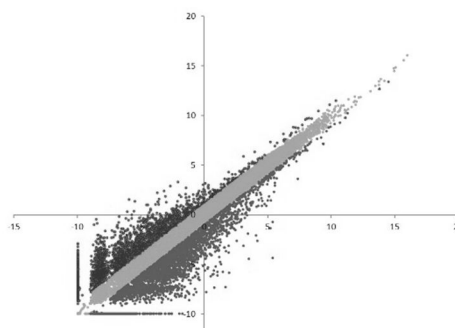


図1 CHF 群と Control 群の遺伝子発現の亢進と減弱

3、研究の方法

本研究では、病理解剖において採取された左室心筋凍結検体を用いて、網羅的遺伝子発現解析(RNA-seq 解析)を施行する。既に CHF を含む約 20 例分の左室心筋凍結検体の蓄積があり、この中から Control 群と CHF 群とに分けて解析を行う。得られた結果から、Control 群と CHF 群との比較解析を行うことで、心筋収縮能低下に伴って発現が変化する遺伝子、疾患特異的な変化を示す遺伝子を同定する。続いて、バイオマーカーの候補に関して、心筋における蛋白レベルでの発現を免疫組織化学的に評価する。ホルマリン固定された既存の病理組織検体を活用し、臨床病理学的な意義を検討することで、心筋生検の病理診断に応用可能な免疫組織化学マーカーを確立する。

4、研究成果

本研究では Control 群を含む全 12 例で RNA-seq 解析を行った。CHF 群と Control 群との比較解析により、遺伝子発現が亢進もしくは減弱していた遺伝子が計 6826 個確認できた(図 1)。その中には ANP や CRP といった臨床の場でも CHF 症例に見られるタンパクをコードしている遺伝子の発現が確認された。この結果から選択した剖検心が CHF 症例として矛盾しないものと考えられた。

この研究の過程で、拡張型心筋症（DCM）と診断された症例で VCL 遺伝子の低下をきたしていた。VCL 遺伝子がコードしている Vinculin は心筋においては介在板に限局してみられるタンパクであり、介在板の構造を維持するために重要である。VCL 遺伝子は DCM の発症に関与している可能性が示唆されている (Mazzarotto et al. Circulation, 4;141(5):387-398,

2020)。申請者らは、以前から DCM の介在板における変化に着目して研究を継続しており、DCM において介在板の N-cadherin 染色が低下し、介在板の構造が崩壊することを発見していた (図 2, 3)。本研究の結果から介在板に関連する VCL 遺伝子の低下が認められ、介在板に関連するタン

パクを中心に RT-PCR で検証を行った。その結果を図 4 に示す。図 4 は Control 群、CHF 群、DCM 群の 3 群に分けて解析したものである。Control 群に比して CHF 群、DCM 群で発現の低下は見られたが、統計学的有意差は見られなかった。そのほかの介在板関連タンパクについても遺伝子発現について有意差は見られなかった。今回の研究では DCM 症例が 3 例と少なかったため、今後症例数を増やして検討する必要がある。申請者らは、この DCM における介在板の変化、特に N-cadherin 染色の有用性について論文としてまとめ、報告した (Ito Y, Yoshida M, Scientific reports, 2021)。

現在、得られた結果の中からバイオマーカーとして注目している遺伝子が NOX1 である。活性酸素種 (ROS) は心血管系の疾患のみならず種々の疾患の発症・進展に関与する一方、生体の恒常性維持においても重要な役割を果たすことが知られている (Iwata K. et al. Free Radical Biology and Medicine, 120(20), 277-288, 2018)。その ROS を産生する酵素の 1 つである NADPH オキシダーゼは細胞質の NADPH から受け取った電子により酸素分子を還元してスーパーオキシドを生成する。NOX はこの NADPH オキシダーゼの触媒サブユニットであり、NOX1-5, DUOX1, 2 の 7 つのサブタイプが存在することが知られている。本解析から NOX1, DUOX1, 2 の 3 つが発現していることが分かった。この中でも特に NOX1 はアンジオテンシン II による血圧上昇, 大動脈乖離, アテローム性動脈硬化症および心虚血再灌

流障害等種々の心血管系疾患における増悪因子としての役割が明らかとなっている。現在は NOX1 を中心に遺伝子発現と、心不全の指標となる左室駆出率との相関を検討している。

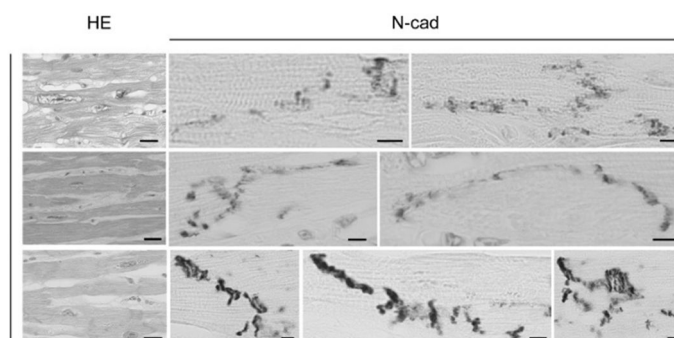


図 2 DCM 症例の介在板の組織学的変化

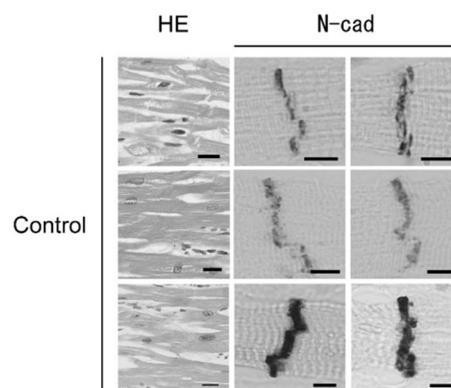


図 3 Control 症例の介在板組織

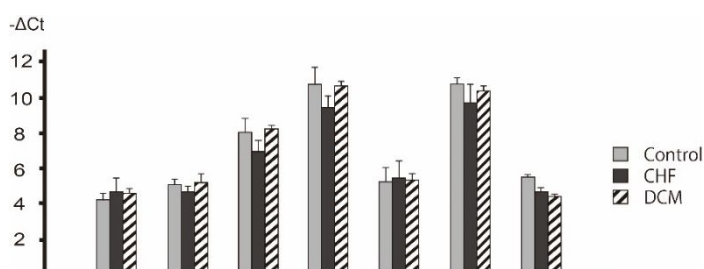


図 4 介在板関連遺伝子の遺伝子発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ito Yukinobu, Yoshida Makoto, Masuda Hirotake, Maeda Daichi, Kudo-Asabe Yukitsugu, Umakoshi Michinobu, Nanjo Hiroshi, Goto Akiteru	4. 巻 11
2. 論文標題 Disorganization of intercalated discs in dilated cardiomyopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-90502-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ito Yukinobu, Yoshida Makoto, Sugiyama Tatsuo, Masuda Hirotake, Mori Mitsuo, Kimura Noriyuki, Umakoshi Michinobu, Miyabe Ken, Kudo-Asabe Yukitsugu, Goto Akiteru	4. 巻 47
2. 論文標題 Multiple ulcerations and perforation in the small intestine after steroid treatment in eosinophilic granulomatosis with polyangiitis: a case report and literature review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cardiovascular Pathology	6. 最初と最後の頁 107193-107193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.carpath.2019.107193	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takai E, Maeda D, Li Z, Kudo-Asabe Y, Totoki Y, Nakamura H, Nakamura A, Nakamura R, Kirikawa M, Ito Y, Yoshida M, Inoue T, Habuchi T, Ikoma S, Katoh H, Kato M, Shibata T, Ishikawa S, Yachida S, Goto A.	4. 巻 7
2. 論文標題 Post-mortem Plasma Cell-Free DNA Sequencing: Proof-of-Concept Study for the "Liquid Autopsy".	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports.	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-59193-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Umakoshi, M., Miyabe, K., Ishii, H., Kudo-Asabe, Y., Ito, Y., Yoshida, M., Maeda, D., Sageshima, M. and Goto, A.	4. 巻 10
2. 論文標題 A case of Russell body gastritis with multifocal lesions.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 SAGE Open Med Case Rep.	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/2050313X20923840.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ito, Y., Minerva, D., Yoshida, M., Suzuki, T. and Goto, A.
2. 発表標題 The Time Change of VEGFA Concentration Gradient Leads Neovasculature to Stair-like Groth
3. 学会等名 Vascular Discovery 2020 Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ito, Y., Minerva, D., Tasaki, S., Nakamura, N., Yoshida, M., Goto, A. and Suzuki, T.
2. 発表標題 The Time Change of VEGF-A Concentration gradient leads neovasculature to Stair-like Growth; Mathematical modeling
3. 学会等名 SPS Core-to-Core Program “Establishing International Research Network of Mathematical Oncology” (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田 誠
2. 発表標題 高度の右左シャントをともなう肺毛細血管拡張を呈した一剖検例
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	前田 大地 (Maeda Daichi) (30585500)	大阪大学・医学系研究科・特任教授(常勤) (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------