

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：24405

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17091

研究課題名(和文) 拡張型心筋症におけるmicroRNAの組織所見・臨床経過に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the effect of microRNA on histological findings and clinical course in dilated cardiomyopathy

研究代表者

柴田 敦 (Shibata, Atsushi)

大阪公立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：60722668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：拡張型心筋症の病態解明を目指すべく、“環境要因・後天性要因によるmicroRNA(miRNA)の発現の変化が、拡張型心筋症の心筋リモデリングに関与する”という仮説を立て研究を計画した。

まず、非虚血性心筋症心筋生検症例のコホート研究を実施し、心筋組織所見を含めたベースラインデータを整備した。このコホート研究から、大腿部の筋肉内脂肪割合と心不全イベントとの関連、心臓周囲脂肪と左室の逆リモデリングとの関連を見出した。

また、拡張型心筋症患者の心筋組織中のmiRNAを抽出し、発現プロファイルの検討を行った。結果、miR-198など複数のmiRNAが左室の逆リモデリングと関与する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

拡張型心筋症の病態解明は不十分であり、そのため治療はこの20年、対症療法から脱却できていない。拡張型心筋症の病態を解明し原因療法へとつなげることが拡張型心筋症治療のブレークスルーには必要である。本研究にて得られた成果から、環境要因・後天性要因によるmiRNAの発現の変化が、拡張型心筋症患者の心筋リモデリングに関与する可能性が示唆された。この成果はmiRNAの制御という観点からみた拡張型心筋症の新規治療標法の開発に繋がるものと考えられ学術的意義は非常に高いと考える。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the pathogenesis of dilated cardiomyopathy, a study was planned based on the hypothesis that "changes in microRNA (miRNA) expression due to environmental and acquired factors are involved in myocardial remodeling in dilated cardiomyopathy.

First, a cohort study of myocardial biopsy cases of nonischemic cardiomyopathy was conducted to develop baseline data, including myocardial tissue findings. From this cohort study, we found an association between thigh intramuscular fat percentage and heart failure events, and between pericardial fat and left ventricular reverse remodeling.

We also extracted miRNAs in myocardial tissue from patients with dilated cardiomyopathy and examined their expression profiles. As a result, we found that several miRNAs, including miR-198, may be involved in left ventricular reverse remodeling.

研究分野：循環器内科学

キーワード：拡張型心筋症 コホート研究 心筋生検組織 microRNA 逆リモデリング 心臓周囲脂肪 筋肉内脂肪

## 1. 研究開始当初の背景

拡張型心筋症は、この20年、対症療法から脱却できておらず、わが国の心臓移植全体の約3分の2を占める疾患となっている。そのため、拡張型心筋症の病態を解明し原因療法へとつなげることが拡張型心筋症治療のブレークスルーには必要である。

拡張型心筋症患者の心筋組織では心筋のリモデリングやミトコンドリアの形態異常が認められるが、その機序の解明は未だ不十分である。拡張型心筋症では先天的な遺伝子異常が認められる症例は限られており、遺伝子発現制御の異常こそが重要ではないかと考える。つまり、環境要因・後天性要因が加わりタンパク発現の異常を来すまでの過程を解明することができれば拡張型心筋症の原因治療につながる可能性があると考えた。

近年、mRNAの制御機構として、microRNA (miRNA/miR) の役割が注目されている。ヒトゲノムには約2700個のmiRNAが存在し、個々のmiRNAには数十から数百の標的遺伝子があり、一つの遺伝子は複数のmiRNAにより制御される。そこで、環境要因・後天性要因によるmiRNAの発現変化による遺伝子発現制御異常がタンパク発現異常へつながり、拡張型心筋症における心筋リモデリングやミトコンドリアの異常などにつながっている可能性を考えた。

## 2. 研究の目的

“環境要因・後天性要因によるmiRNAの発現の変化が、拡張型心筋症患者の心筋リモデリングやミトコンドリアの異常にどのように関与しているのか？”という「問い」を明らかにするために、拡張型心筋症患者の心筋生検サンプルの組織所見と血中および組織中のmiRNA発現との関連、miRNA発現と臨床アウトカムとの相関を解析すること。

## 3. 研究の方法

### (1) 非虚血性心筋症心筋生検症例のコホート研究を実施し、心筋組織所見を含めたベースラインデータを整備する

自施設で非虚血性心筋症の診断目的に心筋生検を行った患者を全例前向きコホート研究に組み入れる、追跡調査を実施する。その中で、右室心筋組織に対して、画像解析ソフトを用いて心筋組織所見(心筋細胞の長径と短径、心筋細胞面積、線維化面積など)を数値化しデータベースに組み入れた。

また、心筋生検時に診断に使用した組織の残余組織を凍結保存し、下記研究の方法(2)に用いた。

### (2) 血液・心筋生検サンプルを用いたmiRNA解析と組織所見との関連検討

凍結保存した心筋組織からのmiRNAを抽出。抽出したmiRNAの発現プロファイルを網羅的に検討し、拡張型心筋症患者群で有意に発現が変化したmiRNAをリストアップした。また、miRNA解析結果と(1)で評価した組織所見の関連を検討した。

本研究で得られた結果の臨床応用を考える場合、すべての患者に侵襲的な心筋生検を行いmiRNAの発現をチェックするのは非現実的であり、採血などで簡便に測定できる系の確立が望ましいと考え、血中のmiRNAを評価し、心筋組織中のmiRNAとの相関を検討することを試みた。血中のmiRNAは単独では極めて不安定のため、エクソソームに内包されていると考えられており、患者血清よりエクソソーム画分を抽出・精製した上で、エクソソームに含まれるmiRNAを、キットを用いて抽出する方法を試みた。

### (3) 血中・心筋組織中のmiRNAと臨床アウトカムの関連の検討

(2)で得られた心筋組織中のmiRNAが、その後の臨床経過に及ぼす影響を検討した。特に、左室の逆リモデリングが認められた症例と認められなかった症例との間でmiRNAの発現を比較することで、左室の逆リモデリングに関与するmiRNAの検討を行った。

コホート研究を用い横断的な検討を行うことで、予後改善に結びつくmiRNAを見出すことが目的である。

## 4. 研究成果

### (1) 非虚血性心筋症心筋生検症例のコホート研究の実施

非虚血性心筋症心筋生検症例のコホート研究を実施し、心筋組織所見を含めたベースラインデータを整備した。このコホート研究では画像による体組成の評価、血液サンプルの凍結保存、心筋生検時の心筋残余組織の凍結保存も含んでいる。このコホート研究から、左室収縮能が低下した非虚血性心筋症患者において大腿部の筋肉内脂肪割合が多いと心不全関連イベントが多くなることを見出した(図1)。また、同じく、左室収縮能が低下した非虚血性心筋症患者において心臓周囲脂肪が多いと左室の逆リモデリングが生じやすいことを見出した(図2)。更に、大腿部の筋肉内脂肪割合を筋肉の構造的な質として捉えたときに、

筋肉の分泌器官としての質の重要性も考慮された。そこで凍結血液サンプルから、筋肉線維で生成され、放出されるペプチドで分泌効果を発揮するものとされる各種マイオカインの測定を行った。結果、マイオカインの一つであり心保護効果が期待されている Brain derived neurotropic factor (BDNF) と筋肉内脂肪割合を組み合わせることで、非虚血性心筋症患者のイベント発生予測能が向上することを見出した。

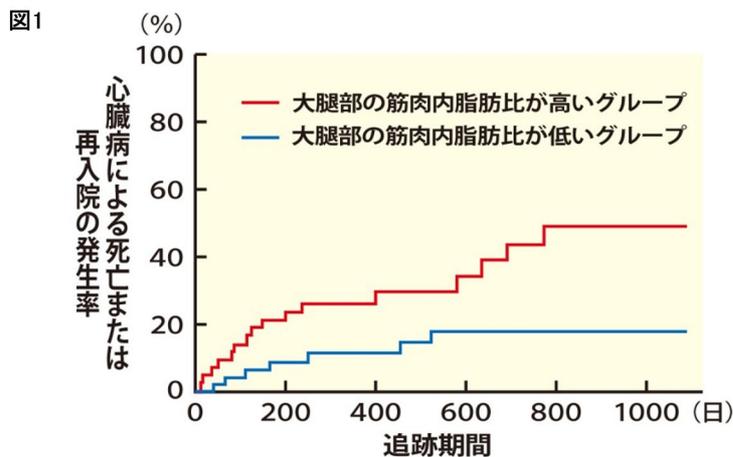


図2

### 左室逆リモデリングの予測因子の検討(多変量解析)

	Multivariate Analysis					
	Model 1			Model 2		
	OR	(95% CI)	P value	OR	(95% CI)	P value
年齢				0.972	0.933-1.012	0.171
安静時拡張期血圧, mmHg	1.038	1.0000-1.077	0.050	1.029	0.990-1.070	0.151
Log BNP, pg/ml				0.880	0.274-2.825	0.829
左室拡張末期径, mm	0.915	0.845-0.991	0.021	0.911	0.836-0.993	0.035
心臓周囲脂肪, cm <sup>2</sup>	1.009	1.001-1.017	0.010	1.010	1.001-1.019	0.036

CI, confidence interval; OR, odds ratio.

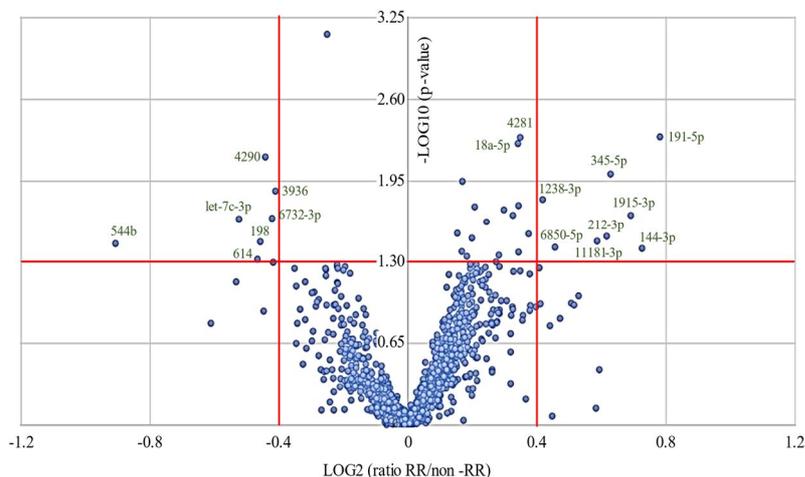
➤ 心臓周囲脂肪が多い方が、6か月後の心機能改善が良好であった。

#### (2) 心筋生検サンプルを用いた miRNA 解析

コホート研究から最終診断が拡張型心筋症であった患者を抽出し、6か月後の評価で心機能改善が得られた症例と得られなかった症例に分け、心筋組織中の miRNA の評価を行った。18名(心機能改善群9名、心機能非改善群9名)で心筋組織中の miRNA を抽出し、発現プロファイルは miRNA PCR array にて網羅的に検討を行った。結果、過去に左室収縮能の低下した心不全のバイオマーカーとなりうる可能性が示されている、miR-19b-3p、miR-30c-5p、miR-206、miR-221-3p、miR-328-5p、miR-375-3p、miR-424-5p に関しては2群間で有意差を認めなかった。一方で、

図3 左室の逆リモデリングの有無とmiRNA の発現

miR-18a-5p および miR-198 など複数の miRNA が2群間で有意な発現量の差を認めた(図3)。この2群間で有意な発現量の差を認めた miRNA に関しては、引き続き miRNA が制御する遺伝子と分子間の相互作用ネットワークであるパスウェイ解析を進め、心機能改善のメカニズムの解明を目指す方針である。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Shibata Atsushi, Izumiya Yasuhiro, Yamaguchi Yumi, Kitada Ryoko, Iwata Shinichi, Ehara Shoichi, Izumi Yasukatsu, Hanatani Akihisa, Yoshiyama Minoru	4. 巻 8
2. 論文標題 Increased oxidative stress during exercise predicts poor prognosis in patients with acute decompensated heart failure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ESC Heart Failure	6. 最初と最後の頁 3885 ~ 3893
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ehf2.13538	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 Yoshida Toshitake, Shibata Atsushi, Tanihata Akiko, Hayashi Hiroya, Yamaguchi Yumi, Kitada Ryoko, Ehara Shoichi, Izumiya Yasuhiro, Yoshiyama Minoru	4. 巻 169
2. 論文標題 Thigh Intramuscular Fat on Prognosis of Patients With Nonischemic Cardiomyopathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The American Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 113 ~ 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.amjcard.2021.12.059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamaguchi Yumi, Shibata Atsushi, Yoshida Toshitake, Tanihata Akiko, Hayashi Hiroya, Kitada Ryoko, Ehara Shoichi, Izumiya Yasuhiro, Fukuda Daiju	4. 巻 -
2. 論文標題 Epicardial adipose tissue volume is an independent predictor of left ventricular reverse remodeling in patients with non-ischemic cardiomyopathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijcard.2022.03.051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okada Natsumi, Shibata Atsushi, Tanihata Akiko, Kitada Ryoko, Ehara Shoichi, Izumiya Yasuhiro	4. 巻 -
2. 論文標題 A case of hypertrophic cardiomyopathy with right ventricular outflow tract and left midventricular obstruction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology Cases	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jccase.2022.02.010	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 Shimada Yuki, Shibata Atsushi, Ishikawa Hirotooshi, Yamaguchi Yumi, Kitada Ryoko, Ehara Shoichi, Izumiya Yasuhiro, Yoshiyama Minoru	4. 巻 60
2. 論文標題 Organizing Pneumonia as the First Presentation in a Patient with Takayasu Arteritis: A Report of Rare Complication	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 1887 ~ 1891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.6316-20	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 Kure Yusuke, Okai Tsukasa, Izumiya Yasuhiro, Shimizu Masashi, Yahiro Ryosuke, Yamaguchi Tomohiro, Ogawa Mana, Kishimoto Noriaki, Shibata Atsushi, Ito Asahiro, Takahashi Yosuke, Ehara Shoichi, Shibata Toshihiko, Yoshiyama Minoru	4. 巻 79
2. 論文標題 Kihon checklist is useful for predicting outcomes in patients undergoing transcatheter aortic valve implantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 299 ~ 305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jjcc.2021.09.014	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13件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 山口祐美, 柴田敦, 吉田俊丈, 谷畑慧子, 林浩也, 市川佳誉, 石川裕敏, 北田諒子, 江原省一, 泉家康宏, 葭山稔
2. 発表標題 心臓周囲脂肪は非虚血性心筋症患者における左室収縮能改善の予測因子である
3. 学会等名 第7回日本心筋症研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 泉家康宏, 柴田敦, 吉田俊丈, 北田諒子, 江原省一
2. 発表標題 心不全の治療標的としての骨格筋を考える
3. 学会等名 第69回日本心臓病学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田敦
2. 発表標題 心不全患者の診察の基本
3. 学会等名 第27回日本心臓リハビリテーション学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口祐美, 柴田敦, 吉田俊丈, 谷畑慧子, 林浩也, 市川佳誉, 石川裕敏, 北田諒子, 江原省一, 泉家康宏, 葭山稔
2. 発表標題 心肺運動負荷試験を用いた心アミロイドーシスにおける運動時生体反応の検討
3. 学会等名 第27回日本心臓リハビリテーション学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toshitake Yoshida, Atsushi Shibata, Akiko Tanihata, Hiroya Hayashi, Yumi Yamaguchi, Ryouko Kitada, Shoichi Ehara, Yasuhiro Izumiya
2. 発表標題 The Combination of Skeletal Muscle Imaging and Functional Evaluation could Predict the Prognosis in Non-ischemic Cardiomyopathy
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yumi Yamaguchi, Atsushi Shibata, Toshitake Yoshida, Akiko Tanihata, Hiroya Hayashi, Ryouko Kitada, Shoichi Ehara, Yasuhiro Izumiya
2. 発表標題 Epicardial Adipose Tissue Volume is Independent Predictor of Ventricular Reverse Remodeling in Patients with Non-ischemic Cardiomyopathy
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2022年

1 . 発表者名 Toshitake Yoshida, Atsushi Shibata, Akiko Tanihata, Hirotoishi Ishikawa, Shoichi Ehara, Yasuhiro Izumiya, Minoru Yoshiyama
2 . 発表標題 Thigh Intramuscular Fat Predicts the Prognosis in Patients in Non ischemic Cardiomyopathy with Reduced Ejection Fraction
3 . 学会等名 ESC Congress 2020 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Hirotoishi Ishikawa, Yasuhiro Izumiya, Atsushi Shibata, Toshitake Yoshida, Hiroya Hayashi, Yoshitaka Ichikawa, Yumi Yamaguchi, Ryoko Kitada, Shoichi Ehara, Minoru Yoshiyama
2 . 発表標題 Regional muscle-adipose distribution is different in patients with heart failure with preserved or reduced ejection fraction
3 . 学会等名 ESC Congress 2020 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Hirotoishi Ishikawa, Yasuhiro Izumiya, Atsushi Shibata, Toshitake Yoshida, Akiko Tanihata, Hiroya Hayashi, Yoshitaka Ichikawa, Yumi Yamaguchi, Ryoko Kitada, Shoichi Ehara, Minoru Yoshiyama
2 . 発表標題 Regional Muscle-adipose Distribution is Different in Patients with Heart Failure with Preserved or Reduced Ejection Fraction
3 . 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Toshitake Yoshida, Atsushi Shibata, Akiko Tanihata, Hiroya Hayashi, Yoshitaka Ichikawa, Hirotoishi Ishikawa, Shoichi Ehara, Yasuhiro Izumiya, Keitaro Ogawa, Minoru Yoshiyama
2 . 発表標題 Thigh Intramuscular Fat is Associated with Exercise Intolerance and Predicts the Prognosis in Patients with Non-ischemic Cardiomyopathy
3 . 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会
4 . 発表年 2020年

1. 発表者名 Toshitake Yoshida, Atsushi Shibata, Akiko Tanihata, Hiroya Hayashi, Yoshitaka Ichikawa, Yumi Yamaguchi, Ryouko Kitada, Shoichi Ehara, Yasuhiro Izumiya, Minoru Yoshiyama
2. 発表標題 Thigh Intramuscular Fat Predicts the Prognosis in Patients In Non-ischemic Cardiomyopathy With Reduced Ejection Fraction
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川 裕敏, 泉家 康宏, 柴田 敦, 吉田 俊丈, 谷畑 慧子, 江原 省一, 葭山 稔
2. 発表標題 左室駆出率が低下している心不全と保たれた心不全で全身の筋肉・脂肪分布は異なり運動耐容能に關与する
3. 学会等名 第6回日本心筋症研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田 俊丈, 柴田 敦, 谷畑 慧子, 石川 裕敏, 江原 省一, 泉家 康宏, 葭山 稔
2. 発表標題 大腿部筋肉内脂肪は左室収縮の低下した 非虚血性心筋症患者の予後予測因子となる
3. 学会等名 第6回日本心筋症研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>94人の患者を対象に検証 心不全患者一人一人に適切な運動量の決定に光  <a href="https://www.osaka-cu.ac.jp/ja/news/2021/210802">https://www.osaka-cu.ac.jp/ja/news/2021/210802</a>          筋肉内脂肪が多いと心不全予後が悪くなることを明らかに 筋肉量や筋力以外に筋肉の質も心不全に影響  <a href="https://www.omu.ac.jp/info/research_news/entry-00438.html">https://www.omu.ac.jp/info/research_news/entry-00438.html</a></p>
--

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------