

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659632

研究課題名(和文)重症心不全に対するmicroRNAを応用した治療法の開発

研究課題名(英文)Developing microRNA research in cardiac failure

研究代表者

澤 芳樹(SAWA, Yoshiki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00243220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：慢性心臓疾患のヒト心筋組織におけるMicroRNAの発現に関する報告は少ない。本研究においては、末期的心不全に対して人工心臓植込みを橋渡しとして心臓移植に至った患者の左室心筋、また心房細動に対して外科治療を行った心房組織を用いて、心臓病変や病態とmicroRNAの発現の相関を検討した。末期的心不全患者は人工心臓植込みにより、心機能の向上および心筋血管数の増加が見られた。同時にmiR-23, miR-29bの発現が亢進していた。心房細動においては洞調律に比べて、miR-21およびmiR-208bの発現が亢進しており、特にmiR-21においては心房組織における線維化の程度と有意に相関していた。

研究成果の概要(英文)：Little is known about microRNA expression in the cardiac tissue of chronic cardiac pathologies. In this study, we investigated relationship between microRNA expression and cardiac pathology in the left ventricular tissue of end-stage cardiac failure patients who completed "bridge to transplantation" using mechanical circulatory support and in the right atrial tissue of chronic atrial fibrillation. As a result, mechanical circulatory supported induced cardiac functional recovery, increase of microvascular number and expression of miR-21 and miR-29b. Furthermore, miR-21 was highly expressed in the atrial tissue of atrial fibrillation, compared to that of sinus rhythm and this was significantly correlated with the degree of fibrosis in the atrial tissue. These results possibly indicated important role of microRNA expression in the cardiac tissue in the progression of the pathology.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 胸部外科学

キーワード：重症心不全 心房細動 microRNA

## 1. 研究開始当初の背景

近年 small non-encoding RNA である microRNA の研究が進み、この microRNA が悪性腫瘍や変性疾患など様々な疾病の、発症や進展の機序に深く関与していることが明らかになってきた。しかしながら、慢性心臓疾患と microRNA の関与に対する研究は、比較的遅れているながらも、関与を示唆する知見が発表されつつある。

当科において外科的治療対象となる慢性心臓疾患は、重症心不全と心臓弁膜症、それに伴う慢性心臓細動や大動脈瘤に代表され、いずれも死に直結する重篤な疾患である。それらの内、大動脈瘤と microRNA の発現に関係があることを臨床検体を用いて証明し専門誌に発表したが、重症心不全や慢性心房細動の進行と microRNA の発現との関連に関してはほとんど明らかにされていないのが現状である。

重症心不全においては人工心臓植込みによる左室の減負荷により心機能が向上することが知られており、このメカニズムを応用することにより新規重症心不全治療が開発できると期待されているものの、減負荷と心機能を結びつけるメカニズムが明らかでない。また、慢性心房細動に対してはマクロリントリーを切断する maze 手術あるいは経カテーテル的アブレーションが効果的とされているものの、洞調律へと復帰する成功率が決して高いとはいえず、適応を決定することが重要である。慢性心房細動においては、心房組織の線維化が亢進しており、この線維化の程度とインターベンションの成功率に関係があることが示唆されているものの、組織の線維化を制御していると考えられている microRNA との関連は明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究では、重症心不全左心室の臨床検体を用いて microRNA の発現を網羅的に解析し、組織所見や臨床経過との相関を検討することにより、重症心不全の発症機序に関わる特異的 microRNA を探索する。さらには、心房細動における心房組織に特異的に強発現する microRNA を探索した。

## 3. 研究の方法

### (1) 拡張型心筋症患者の登録

当科にて、人工心臓植込み手術および心臓移植手術を施行し、左室心筋のサンプルの残存している拡張型心筋症患者は、24例であり、この24症例をコホートとして重症心不全に関する検討を行った。

### (2) 心機能評価

拡張型心筋症患者においては、経胸壁心臓エコー検査を人工心臓植込み前、植込み後1か月、3か月、6か月、1年と定期的に施行している。そのデータを電子カルテより抽出

し、解析を行った。

### (3) 慢性心房細動患者の登録

慢性心房細動を伴う心臓弁膜症に対して、外科治療を行った16症例(同時に maze を施行しなかった A 群6例と maze を施行した B 群10例)と、慢性心房細動を有しない手術症例13例を対象に、右心房組織を手術中に採取した。

### (4) 心臓組織における組織学的検討

心臓組織サンプルをパラフィン包埋切片として、HE やマッソントリクローム染色を行い、また組織内の血管を CD31 による免疫組織染色により可視化した。

### (5) 心臓組織からの microRNA の抽出と解析

心臓組織より mirVana miRNA isolation kit を使用して Total RNA を抽出した。Total RNA を逆転写し TaqMan Array Human MicroRNA A Card を用いて MicroRNA の発現を網羅的に検討し、続いてこのアレイ解析にて5倍以上の発現が見られた MicroRNA に関しては、Real-time PCR 法により定量的に発現を検討した。

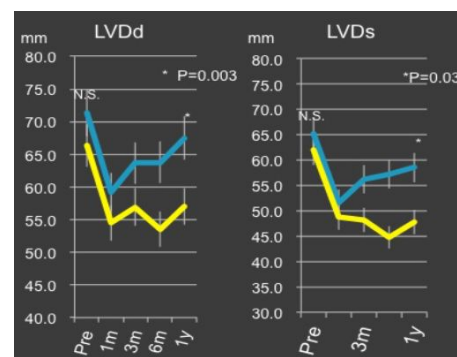
### (6) 統計学的検討

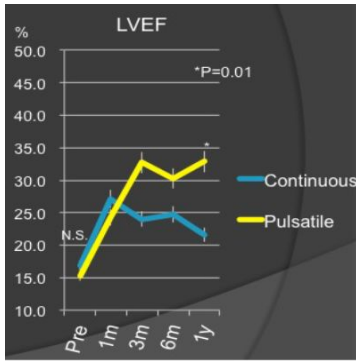
時系列のある2群の比較を2-way ANOVA 法により比較した。2群の相関についてはスピアマンの比較検討を行った。P 値が0.05未満を統計学的有意差ありとした。

## 4. 研究成果

### (1) 植込み型人工心臓装着により末期的拡張型心筋症の心機能が向上する

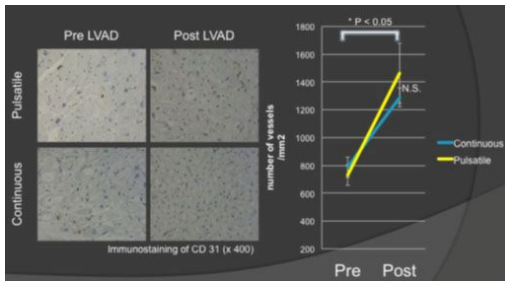
末期的拡張型心筋症に対して、拍動型あるいは非拍動型の植込み型人工心臓を装着し心臓移植に到達した24症例の、人工心臓装着中の心機能を心臓超音波検査にて計測し、その変化を統計学的に解析したところ、程度の差はあるものの拍動型、非拍動型ともに、左心室駆出率の増加、左心室内腔の狭小化が認められた【下図】。





(2) 植込み型人工心臓装着により心筋微小血管数が増加する

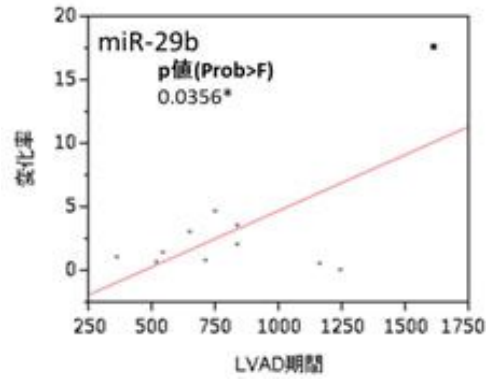
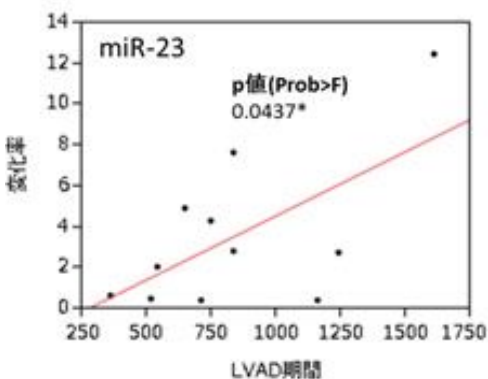
これらの症例の人工心臓装着時および心臓移植時の心筋を採取し、免疫染色後に顕微鏡検査を行い微小血管の数を測定したところ、人工心臓補助中に血管数が顕著に増加することが判明した【下図】。



すなわち、人工心臓を装着し心臓への負荷を減らすことにより、心臓を還流する血流が増加しこれが心機能向上をもたらすと考えられた。

(3) 心機能向上と microRNA 発現との間に相関が存在する

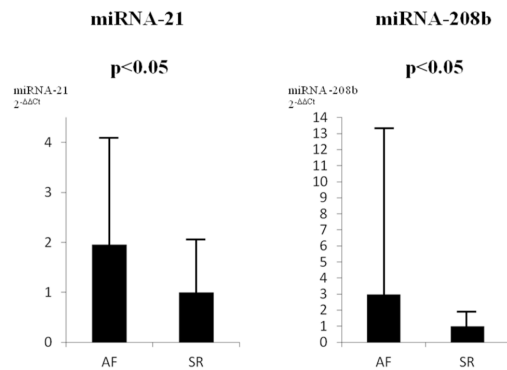
同様に人工心臓装着前後における、microRNA の発現を MicroArray 法および real-time PCR 法にて計測しその変化率と、人工心臓装着期間との関係を解析すると、miR-23p, miR-29b において統計学的に有意な相関を示した【下図】。



以上より、人工心臓装着により減負荷された左心室は収縮機能が向上し、その減負荷と心機能の変化との間に特異的な microRNA (miR-23 や miR-29b) が関与していることが示唆された。

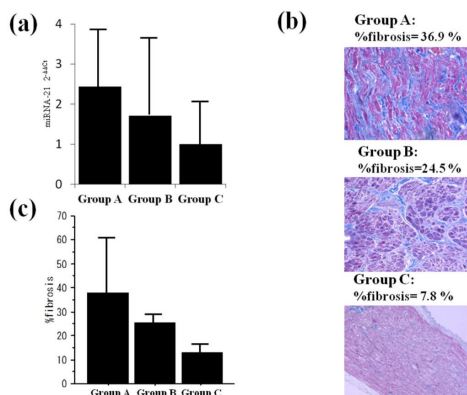
(4) 慢性心房細動の心房組織においては特異な miRNA が発現している

洞調律(SR)と心房細動(AF)の心房組織における microRNA 発現の違いを microRNA array にて検索したところ、miR-21, miR-23b, miR199b, miR-208b という四つの microRNA が心房細動において3倍以上に発現亢進していた。これらをそれぞれ real-time PCR により定量化すると、miR-21 および miR-208b の二つの microRNA が有意に発現亢進していた(下図)。



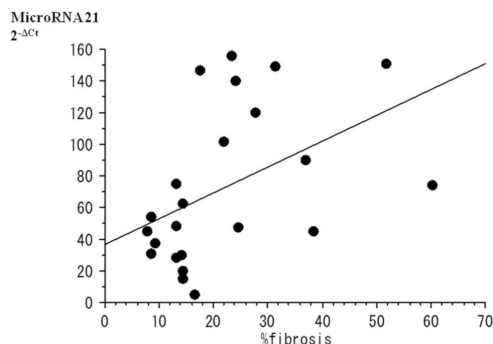
(5) 慢性心房細動の重症度と miR-21 の発現や線維化の程度が相関する

慢性心房細動持続例(A群)慢性心房細動治癒例(B群)洞調律例(C群)に分けて、それぞれの心房組織における miR-21 の発現と線維化の程度を定量化したところ、A群、B群、C群の順に、miR-21 発現、線維化の程度ともに、亢進していた(下図)。



(6) 心房組織における miR-21 発現と線維化に相関関係が存在する

心房組織における miR-21 および miR-208b の発現と、線維化の程度を統計的に解析したところ、miR-21 に有意な相関が見られた(下図)。



以上の検討により、特異的な miR の発現が重症心不全および慢性心房細動の病変および病態と相関を示しており、これらの発現が病変の進行を制御している可能性が考えられた。本研究では到達できなかったが、今後、検討を重ねることにより miR を標的とした介入治療の開発が望まれる。

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3件)

- (1) Kin K, Miyagawa S, Fukushima S, Shirakawa Y, Torikai K, Shimamura K, Daimon T, Kawahara Y, Kuratani T, Sawa Y. Tissue- and plasma-specific microRNA signatures for atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. *J Am Heart Assoc.* 2012; **1**:e000745
- (2) Nishi H, Sakaguchi T, Miyagawa S, Yoshikawa Y, Fukushima S, Saito S, Ueno T, Kuratani T, Sawa Y. Impact of microRNA expression in human atrial tissue in patients with atrial fibrillation undergoing cardiac surgery. *PLoS One.* 2013;

8:e73397

- (3) Saito T, Miyagawa S, Nishi H, Yoshikawa Y, Fukushima S, Yoshioka D, Harada A, Toda K, Sawa Y. Effect of continuous-flow mechanical support on microvasculature remodeling in the failing heart. *In preparation.*

〔学会発表〕(計1件)

- (1) Saito T, Miyagawa S, Nishi H, Yoshikawa Y, Fukushima S, Yoshioka D, Harada A, Toda K, Sawa Y. Effect of Continuous-Flow Mechanical Support on Microvasculature Remodeling in the Failing Heart. 第77回日本循環器学会学術集会 2013年3月15日横浜

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等: 特になし

6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
澤 芳樹 (SAWA, Yoshiki)  
大阪大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 00243220

- (2) 研究分担者  
宮川 繁 (MIYAGAWA, Shigeru)  
大阪大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号: 70544237

吉川 泰司 (YOSHIKAWA, Yasushi)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 40570594

福嶋 五月 (FUKUSHIMA, Satsuki)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 80596867

西 宏之 (NISHI, Hiroyuki)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 00529208