

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791469

研究課題名(和文) マイクロRNA解析に基づく急性大動脈解離の発症機序に関する検討

研究課題名(英文) Integrated Analysis of microRNA and mRNA Gene Expression Profiling for Non-syndromic Acute Type A Aortic Dissection

研究代表者

木村 直行 (KIMURA, NAOYUKI)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：20382898

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)：microRNA(miRNA)は長さ20～25塩基ほどの1本鎖non coding RNAで、多くの疾患で発病への関与が示唆されている。本研究では、Agilent社のDNAマイクロアレイを用いて、大動脈解離群(n=6)と移植ドナー群(健常群 n=5)間の上行大動脈における遺伝子発現を網羅的に解析し、miRNAにより発現変動する遺伝子群を同定した(0.3%、138遺伝子/42,545遺伝子)。さらに同定された遺伝子群の発現変動を、リアルタイムPCR法を用いて確認した(各群n=8-9)。本研究により、TGF $\beta$ ・MMP経路などの異常による大動脈壁の慢性炎症が疾患発現に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We performed an integrated gene expression profiling for miRNA and mRNA to identify key molecules driving dissection development. Total RNA including miRNA was isolated from the ascending aorta in patients with acute aortic dissection (AAD) (n=6) and transplant donors (n=5). Comprehensive gene expression analysis was performed using both mRNA and miRNA microarray. Of up/down-regulated mRNA, mRNAs whose gene-expression was regulated by up/down-regulated miRNAs were estimated bioinformatically. 92 miRNAs (6.7%, 92/1368) and 1,669 genes (3.9%, 1,669/42,545) were up/down-regulated in the AAD group. Of the 1,669 genes, 138 (8.3%, 138/1,669) were regulated by the up/down-regulated miRNAs. Pathway analysis revealed genes involved in TGF $\beta$  signaling (TGFB1, BAMBI), MMP (TIMP), and JAK2 (JAK2) were included in the target genes. qRT-PCR confirmed these genes were up/down-regulated in the AAD group. Our results suggested chronic inflammation might be associated with the disease development.

研究分野：成人心臓血管外科学 (胸部大動脈)

キーワード：microRNA 急性大動脈解離 網羅的遺伝子発現解析 DNAマイクロアレイ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 急性大動脈解離は、3層構造(内膜・中膜・外膜)を呈する大動脈壁内の中膜層が変性をきたすことで、内腔からの圧力により内膜に亀裂が発生し、この部分から大動脈壁内に血液が流入する重篤な循環器緊急疾患である。上行大動脈に解離が波及するかどうかでA型とB型に分類されるが、病態・治療成績(急性期・遠隔期)及びその発病の機序は十分に解明されていない。

(2) microRNA(miRNA)は、細胞内に存在する長さ20~25塩基ほどの1本鎖のnon coding RNAで、複数の蛋白質と複合体を形成し、標的となるメッセンジャーRNA(mRNA)に作用し翻訳を抑制する。様々な遺伝子の発現に関与することが注目を集めており、その調節機能は、細胞増殖・アポトーシス・発生と分化・代謝など多岐にわたり、現在までに数百のmiRNAが同定されている。循環器領域でも、虚血性心疾患や胸部大動脈瘤の発病との関連性が示唆されてきた。大動脈解離においても、DNAマイクロアレイを使用した遺伝子解析研究で、miRNAが大動脈解離の発病に関与していることが報告された(引用文献)。しかしながら、これまで同一検体を使用して、mRNAとmiRNAの遺伝子発現を同時に網羅的に解析した研究はなく、ほとんど本疾患におけるmiRNAの関与は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、まず急性A型大動脈解離手術症例の術前状態を調査するとともに、早期・遠隔期治療成績と初期の病態との関連性を、周術期の画像データの解析を交えて、多角的に検討することを目的とした。

(2) miRNAの影響下に発現が変動し、かつ急性A型大動脈解離の発病に関与している大動脈壁(内膜・中膜組織)の遺伝子群を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 当センターが開設した1990年~2014年までに緊急手術を施行した急性A型大動脈解離手術症例を対象として、術前状態(性別・年齢・遺伝背景・併存疾患・生活習慣・循環動態・臓器灌流障害の有無・大動脈解離の形態と伸展範囲・血液データなど)とともに、手術因子(術式・手術時間・出血量・輸液量など)と早期治療成績(生存死亡・在院日数・合併症発生率)を調査した。さらに、生存退院した症例を対象に、電話及び文章(手紙)での、術後の健康状態に関する予後調査を、本人・家族もしくは外来担当医に対して実施した。

(2) 疾患群(急性A型大動脈解離群)とコントロール群(移植ドナー群:共同研究機関である米国Stanford大学から供与)の上行大動脈組織からmiRNAを含んだtotal RNAを抽出し、網羅的遺伝子解析を施行した。尚、研

究予算の関係上、当初予定していた次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析ではなく、DNAマイクロアレイ法による遺伝子発現解析に変更した。

phenotypeが均一(非血栓閉塞型・DeBakey I型・上行~弓部大動脈にエントリーが存在・内膜の動脈硬化なし・非高齢者)な急性A型大動脈解離手術症例6例(46歳~63歳)と、年齢をマッチさせた移植ドナー(34歳~56歳)5例を対象とした。上行大動脈の内膜~中膜組織から、Qiagen RNA抽出キットを使用してmiRNAを含むtotal RNAを抽出した後、DNAマイクロアレイ法による遺伝子発現解析をそれぞれ施行した(mRNA: Agilent SurePrint G3 Human GE 8 x 60K, miRNA: Agilent, SurePrint G3 Human miRNA 8 x 60K, Agilent Technologies, Palo Alto, CA)。有意に発現変動する遺伝子とmiRNAをそれぞれ同定した後に、バイオインフォマティクス解析により、発現変動したmiRNA群により発現調整を受ける遺伝子群を絞りこみ、解析対象となる遺伝子群を同定した。その後、gene ontology解析/pathway解析を施行し、大動脈解離の発症に関与する可能性が高い生体反応系を選定し、定量的リアルタイムPCR法(疾患群8例 vs. コントロール群9例)で確認した。

## 4. 研究成果

(1) 急性A型大動脈解離の治療成績に関する検討

循環不全や臓器灌流障害が治療成績に及ぼす影響

急性A型大動脈解離は心タンポナーゼなどを合併しショック状態を呈する症例が多い。また、解離の波及により、臓器灌流障害(脳・腸管・腎臓・四肢など)を高頻度に認める。急性大動脈解離の分類は、これまで形態分類であるStanford分類とDeBakey分類が使用されてきたが、循環動態や臓器灌流障害を反映した分類法は存在しなかった。2009年に患者状態を反映した新分類法(ペンシルベニア大学分類: Penn分類)を同大学Augustidesらが発表したが(引用文献)、この分類法を評価した論文はこれまでほとんど認めなかった。今回、当科で1997年~2011年までに手術を施行した急性A型大動脈解離351例を対象として、このPenn分類を用いて4群(Aa群: 循環不全・臓器灌流障害なし、Ab群: 臓器灌流障害あり、Ac群: 循環不全あり、Abc群: 循環不全・臓器灌流障害ともあり)に分類し、早期・遠隔期治療成績を解析した。循環不全群(Ac群・Abc群)は在院死亡率が有意に高く、遠隔生存率も低値であり、Penn分類の有用性が証明された。本研究結果は第39回米国西部胸部外科学会総会で発表(学会発表)するとともに研究論文として発表した(発表論文)。

術後の循環コントロールが治療成績に及ぼす影響

急性 B 型大動脈解離では発症後早期の循環管理（血圧・心拍数コントロール）が遠隔生存率を改善させるとの報告がなされてきたが、急性 A 型大動脈解離術後早期の循環管理が予後に及ぼす影響を解析した報告はこれまでのところなかった。当科で 1991 年～2011 年までに手術を施行した急性 A 型大動脈解離 434 例を対象として、術後 1 週間の平均心拍数が 70/分未満・70-79/分・80-89/分・90/分以上の 4 群に分類し、在院死亡率・遠隔生存率・大動脈イベント回避率との関連性を解析した。結果は予想に反し、急性 A 型大動脈解離術後の早期・遠隔期治療成績は、術後早期の心拍数コントロールによる影響を受けなかった。本研究結果は第 42 回米国集中治療学会で発表（学会発表）するとともに、研究論文として発表した（発表論文）。

#### 術後の下行大動脈以下に残存する開存偽腔が遠隔成績に及ぼす影響

急性 A 型大動脈解離手術の目的は、破裂や心タンポナーゼの原因となりうる解離した上行大動脈の切除であり、通常初回手術で解離した大動脈を全て切除することはできない。急性 A 型大動脈解離術後の下行大動脈の形態を造影 CT から計測・解析して、残存する偽腔開存が、遠隔期予後（大動脈イベント及び遠隔生存）に及ぼす影響を解析した。リスク因子調整後の多変量解析の結果では、残存する偽腔開存は遠隔期大動脈イベントと遠隔死亡の独立危険因子であり、術後の偽腔開存を減らす術式の工夫の重要性が示唆された。本研究結果は 2014 年度米国胸部外科学会で発表（学会発表）するとともに、研究論文として発表した（発表論文）。

#### (2) 急性 A 型大動脈解離の網羅的遺伝子発現研究 (miRNA の疾患発現への関与)

##### DNA マイクロアレイ

これまで mRNA のみ、もしくは miRNA のみの遺伝子発現解析を行った研究はいくつか報告されてきたが、今回は miRNA を含めた total RNA を抽出することにより、同一検体を用いて mRNA（図 1）/miRNA の双方で DNA マイクロアレイ実験を実施した。尚、

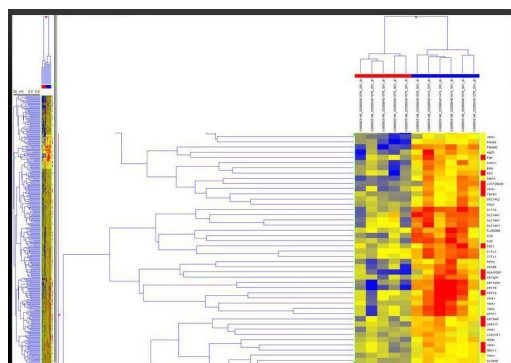


図 1 : DNA マイクロアレイのヒートマップイメージング

共通の phenotype を有する疾患群を作製するため、2013 年～2015 年までの期間に、合計 27

症例から急性 A 型大動脈解離の緊急手術施行時に上行大動脈検体を採取した。

疾患群とコントロール群間で、有意な発現変動を認めた遺伝子群は 42545 遺伝子中 1669 遺伝子 (3.9%) (疾患群で発現減弱: 337 遺伝子・発現増強: 1332 遺伝子) であり、同様に有意な発現変動を認めた miRNA は 1368 miRNA 中 92miRNA (6.7%) (疾患群で発現減弱: 84miRNA・発現増強: 8miRNA) であった (図 2)。

Up in the disease group, n=84				Down in the disease group, n=8
hsa-miR-7-1-3p	hsa-miR-34a-3p	hsa-miR-193a-5	hsa-miR-564	
hsa-miR-16-5p	hsa-miR-99b-5p	hsa-miR-193b-5	hsa-miR-574-3p	
hsa-miR-21-3p	hsa-miR-100-5p	hsa-miR-194-5p	hsa-miR-590-5p	
hsa-miR-21-5p	hsa-miR-103a-3	hsa-miR-195-3p	hsa-miR-598	
hsa-miR-22-3p	hsa-miR-107	hsa-miR-197-3p	hsa-miR-628-5p	hsa-miR-198
hsa-miR-22-5p	hsa-miR-125a-5	hsa-miR-199a-3	hsa-miR-664a-3	hsa-miR-199b-5p
hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-125b-5	hsa-miR-199a-5	hsa-miR-744-5p	hsa-miR-3196
hsa-miR-23b-3p	hsa-miR-130b-3	hsa-miR-210	hsa-miR-769-5p	hsa-miR-3679-5p
hsa-miR-24-1-5	hsa-miR-140-3p	hsa-miR-214-5p	hsa-miR-1271-5	hsa-miR-3926
hsa-miR-24-3p	hsa-miR-140-5p	hsa-miR-215	hsa-miR-1305	hsa-miR-4298
hsa-miR-25-3p	hsa-miR-142-3p	hsa-miR-216a-5	hsa-miR-3651	hsv1-miR-H6-5p
hsa-miR-26a-3p	hsa-miR-143-3p	hsa-miR-221-3p	hsa-miR-4284	hsv2-miR-H6-5p
hsa-miR-26b-5p	hsa-miR-145-5p	hsa-miR-222-3p	hsa-miR-4291	
hsa-miR-27a-3p	hsa-miR-148b-3	hsa-miR-340	hsa-miR-4317	
hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-149-5p	hsa-miR-365a-3	hsa-miR-4324	
hsa-miR-29b-3p	hsa-miR-151a-3	hsa-miR-369-5p	hsa-miR-4328	
hsa-miR-29c-5p	hsa-miR-151a-5	hsa-miR-374a-5		
hsa-miR-30a-3p	hsa-miR-152	hsa-miR-374b-5		
hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-181a-2	hsa-miR-374c-5		
hsa-miR-30b-5p	hsa-miR-181c-3	hsa-miR-425-5p		
hsa-miR-30c-5p	hsa-miR-181d	hsa-miR-454-3p		
hsa-miR-30e-3p	hsa-miR-185-5p	hsa-miR-484		
hsa-miR-34a-3p	hsa-miR-193a-3	hsa-miR-605-3p		

図 2 : 疾患群で発現変動を認めた miRNA

さらに、今回同定された疾患群で発現変動する 92miRNA により、発現の調整を受ける遺伝子群を、GeneSpring software (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) の TargetScan 機能を用いて同定した。この結果、発現変動を示した 1669 遺伝子中、miRNA による修飾を受ける遺伝子群を 8.3% (138/1669) 認めた。最終的に今回の解析対象となった遺伝子群は 0.3% (138/42545) であり、その内訳は疾患群で発現増強 25 遺伝子・疾患群で発現減弱 113 遺伝子であった。これら 138 遺伝子に対して、pathway 解析及び gene ontology 解析を実施し、大動脈解離の発現に関与しうる遺伝子群を推測した。この結果、transforming growth factor (TGF) - $\beta$  シグナル関連遺伝子 (TGFB1・BAMBI; BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog which functions to limit TGF $\beta$  signaling) matrix metalloproteinase (MMP) 活性関連遺伝子 (TIMP4; tissue inhibitor of metalloproteinase 4) JAK2 (janus kinase 2) 関連遺伝子 (JAK2)、成長因子関連遺伝子 (PDGFA; platelet-derived growth factor subunit A)、接着因子関連遺伝子 (SELE; selectin E) が、疾患関連候補遺伝子として同定された。

##### 定量的リアルタイム PCR

上記バイオインフォマティクス解析の結果同定された疾患関連候補遺伝子の大動脈壁組織における発現変動を、DNA マイクロアレイで使用した患者検体に、さらにそれぞれの群で新規症例由来の検体を加え、定量的リアルタイム PCR 法により確認した。

その結果、上記 6 遺伝子全てで有意差を持って、2 群間の発現変動が確認された。TGFB1 と PDGFA は疾患群で発現が増強しており、これに対し JAK2・BAMBI・TIMP4・SELE

では発現が減弱していた(図3)。BAMBIは、TGF- $\beta$ の発現抑制機能を有し、TIMP4もMMP活性を抑制する。これらの結果は、大動脈壁内におけるTGF- $\beta$ シグナルやMMP活性の増強として特徴づけられる慢性炎症が、非マルファン症候群症例の大動脈解離発症に関連することを示唆するものである。また、昨年度中国から報告されたDNAマイクロアレイを使用した網羅的遺伝子発現解析研究でも、急性A型大動脈解離症例でのJAK2経路の発現抑制が報告されており(引用文献)、本研究結果はこの研究報告と一致する。

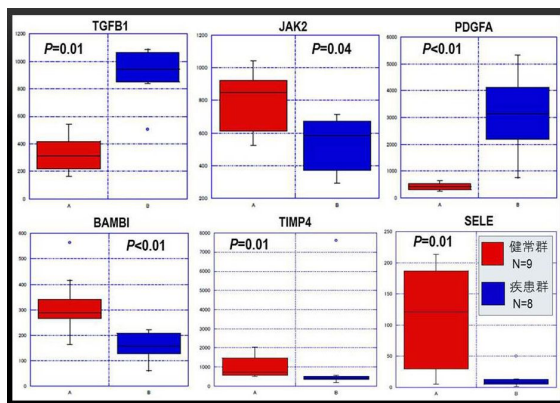


図3：定量的リアルタイムPCR結果

これら・の研究成果は2016年度の米国胸部外科学会で発表予定であり、現在発表論文を作製している。今後は、本研究で同定された疾患関連遺伝子と大動脈解離発症との関連性を、大動脈平滑筋細胞を使用した*in vitro*の実験や、血液検体での遺伝子発現解析などを行い、多角的に検証していく予定である。

#### <引用文献>

Liao M, et al. A microRNA profile comparison between thoracic aortic dissection and normal thoracic aorta indicates the potential role of microRNAs in contributing to thoracic aortic dissection pathogenesis. *J Vasc Surg.* 2011;53:1341-49.

Augoustides JG, et al. Observational study of mortality risk stratification by ischemic presentation in patients with acute type A aortic dissection: the Penn classification. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2009;6:140-6.

Pan S, et al. JAK2-centered interactome hotspot identified by an integrative network algorithm in acute Stanford type A aortic dissection. *Plos One.* 2014;9:e89406.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Kimura N, Ohnuma T, Itoh S, Sasabuchi Y, Asaka K, Shiotsuka J, Adachi K, Yuri K,

Matsumoto H, Yamaguchi A, Sanui M, Adachi H. Utility of the Penn classification in predicting outcomes of surgery for acute type A aortic dissection. *Am J Cardiol.* 査読有 2014;113:724-30.

Ohnuma T, Kimura N, Sasabuchi Y, Asaka K, Shiotsuka J, Komuro T, Mouri H, Lefor AT, Adachi H, Sanui M. Lower heart rate in the early postoperative period does not correlate with long-term outcomes after repair of type A acute aortic dissection. *Heart Vessels.* 査読有 2015;30:355-61.

Kimura N, Itoh S, Yuri K, Adachi K, Matsumoto H, Yamaguchi A, Adachi H. Reoperation for enlargement of the distal aorta after initial surgery for acute type A aortic dissection. *J Thorac Cardiovas Surg.* 査読有 2015;149 (2 Suppl):S91-8.e1.

Rylski B, Siepe M, Beyersdorf F, Kari FA, Grün L, Desai ND, Szeto WY, Milewski RK, Adachi H, Kimura N, Bavaria JE. Should bicuspid aortic valve resuspension be prohibited in acute type A aortic dissection patients? *Ann Thorac Surg.* 査読有 in press.

[学会発表](計4件)

Kimura N, Itoh S, Morita H, Kimura C, Adachi K, Yuri K, Matsumoto H, Yamaguchi A, Adachi H. The treatment outcomes of acute type A aortic dissection analyzed with the DeBakey classification. 21<sup>st</sup> Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular Surgery. Kobe, Japan. 2013.4.4-7.

Kimura N, Itoh S, Morita H, Adachi K, Yuri K, Matsumoto H, Yamaguchi A, Adachi H. Utility of the Penn classification in the prediction of the treatment outcome for acute type A aortic dissection. 39<sup>th</sup> Annual Meeting Western Thoracic Surgical Association. Coeur d'Alene, Idaho, USA. 2013. 6. 26-29.

Ohnuma T, Kimura N, Sasabuchi Y, Asaka K, Shiotsuka J, Komuro T, Mouri H, Lefor A, Adachi H, Sanui M. Postoperative heart rate does not correlate with long-term mortality or the incidence of aortic events after repair of Type A acute aortic dissection. Society of Critical Care Medicine's 42th Critical Care Congress. San Juan, Puerto Rico. 2013.1.19-23.

Kimura N, Itoh S, Yuri K, Adachi K, Matsumoto H, Yamaguchi A, Adachi H. Reoperation for enlargement of the distal aorta after initial surgery for acute type A aortic dissection. AATS, Aortic Symposium 2014. New York, NY, USA. 2012.4.24-25.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

〔その他〕  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 直行 (KIMURA Naoyuki)  
自治医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 20382898

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし

(4) 研究協力者

中江 進 (NAKAE Susumu)  
東京大学医科学研究所システム疾患モデル  
研究センター・准教授  
研究者番号: 60450409

松本 健治 (Matsumoto Kenji)  
国立成育医療研究センター研究所免疫アレル  
ギー/感染研究部・部長  
研究者番号: 60181765

二村 恭子 (Futamura Kyoko)  
国立成育医療研究センター研究所免疫アレル  
ギー/感染研究部・研究員  
研究者番号: 60596956

Michael P. Fischbein  
米国スタンフォード大学心臓胸部外科・講師