

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460292

研究課題名(和文) 不整脈基質としてのイオンチャネル異常にかかわるマイクロRNA機能制御の解明

研究課題名(英文) Regulation of microRNAs responsible for ion channel remodeling in atrial fibrillation

研究代表者

小野 克重 (Ono, Katsushige)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：40253778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：心房細動が持続すると電気的リモデリングが生じる。我々はこの電気的リモデリングの主原因の1つがmiR-30dであることを突き止めた。更にこのmiR-30dの発現増加には心筋細胞内のカルシウム(Ca)過負荷が原因であることも明らかにした。心房細動が持続すると頻拍によって細胞内Ca過負荷が生じ、一方ではKACHチャネルの発現を促進すると共に、もう一方ではmiR-30dの発現増加を介してKACHの発現を低下させるという機序が作用しているのである。その中心となるものが細胞内Caの増加に起因するmiR-30であることを我々は明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Atrial fibrillation (AF) begets AF in part due to atrial remodeling. This study was to identify microRNA(s) responsible for electrical remodeling in AF. We identified 39 microRNAs differentially expressed in AF patient's atria, including miR-30d as a candidate responsible for ion channel remodeling by in silico analysis. MiR-30d was significantly up-regulated in cardiomyocytes from AF patients, whereas the mRNA and protein levels of CACNA1C/Cav1.2 and KCNJ3/Kir3.1, postulated targets of miR-30d, were markedly reduced. KCNJ3/Kir3.1 expression was down-regulated by transfection of miR-30 precursor, concomitant with a reduction of the acetylcholine-sensitive inward-rectifier K⁺ current (IK.ACh). KCNJ3/Kir3.1 expression was enhanced by the knockdown of miR-30d. The downward remodeling of IK.ACh is attributed, at least in part, to deranged Ca²⁺ handling, leading to the up-regulation of miR-30d in human AF, revealing a novel post-transcriptional regulation of IK.ACh.

研究分野：Pathophysiology

キーワード：ion channel electrophysiology remodeling atrial fibrillation

1. 研究開始当初の背景

(1) 心房細動は最も罹患率の多い不整脈でありながら成因は解明されておらず、根本的な治療戦略は未だに確立していない。それは心房細動の発症と維持の分子機序が明確でないことに起因する。一方、近年の循環器領域研究において心臓発生や心不全の進行において microRNA の発現異常が存在することが明らかとなった。本研究で心房細動の発症と維持の分子機序として特定の microRNA が関与しているという仮説を立て、ヒト心筋を用いた立証を目的とする。microRNA は蛋白質をコードしていない約 22 塩基の成熟した RNA であり、特定の mRNA の 3' UTR などに結合して標的 mRNA の翻訳を抑制したり、あるいは mRNA の分解を促進したりすることが知られている。近年、microRNA が多様な機能を発揮し、治療の標的となり得ることは、特に癌研究の分野で進んでいる。

(2) 一方、循環器領域では、microRNA の研究は遅れており、殊に不整脈領域においては、その報告は少ない。特に、心房細動との関連を示した報告は始まったばかりであり、microRNA が電氣的不整脈基質の形成をいかに修飾するかに関しては報告がない。心房細動の持続によって、心房筋はイオンチャネルの発現が変化し、不応期が短縮したり伝導が遅延したりし易くなるような電氣的リモデリングを受ける。

(3) 心筋の電氣的リモデリング、あるいはイオンチャネルのリモデリングは、細胞内の Ca イオン(Ca²⁺)が過度に上昇することが引き金となり、特定の蛋白の発現、あるいは分解が上昇、または低下することがそのメカニズムとして知られている。我々の予備実験において、持続性心房細動患者の右心耳に発現する Na⁺(Nav1.5)の mRNA が洞調律を呈する患者より減少していることを既に RT-PCR 法を用いて確認している。しかし、その分子機序は不明であり、よって心房細動の病態の理解を困難にしている。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、ヒト心筋細胞(慢性心房細動を呈する患者の心房筋(右心耳))において、特定の microRNA とイオンチャネル、関連する trafficking 蛋白、更に発現の制御を担う転写因子との機能的連関を証明することを目的とする。microRNA をラット心筋細胞に導入し、更に特定の microRNA ノックアウトラット心筋細胞にパッチクランプ法を用いて microRNA 機能異常を電氣生理学的に評価する。

(2) 不整脈の成因としての microRNA の機能はほとんど知られていない。我々は心房細動患者に特有と思われる microRNA の発現変化を preliminary データとして既に記録している。循環器領域では、心臓の発生や筋肥

大、心不全等において、いくつかの microRNA の発現異常が存在することが報告されていた。その一方、microRNA が不整脈の病態機序として機能することは、今までほとんど報告されていない。我々は、不整脈、特に心房細動の持続、特にイオンチャネルのリモデリングに microRNA の発現異常が関わることを、世界のどのグループより先に解明して情報を発信したい。

(3) ヒト心筋を用いたイオンチャネルリモデリング研究は世界でも少ない。本邦では、心筋のイオンチャネル研究は専ら実験動物を用いて行われてきた。特に、microRNA の機能を評価したイオンチャネルの発現制御研究は、その対象が神経、平滑筋、心筋、骨格筋を問わず、一切認められない。一方、海外における心筋イオンチャネルと microRNA の研究は、2012年10月7日現在、13報だけ報告されている。海外でのヒト心筋細胞を用いた研究は、心移植に伴う不要心筋(繊維性嚢胞症患者の心肺同時移植におけるレシピエント筋)を用いた報告が多い。本研究は本来なら開心術時に廃棄されるヒト心筋細胞を用いて研究するであり、その結果は直接臨床に外挿されるための重要な意味をもつと考えられる。

(4) 心房細動と microRNA 機能を論じた報告は少数存在するが、microRNA の発現変化とイオンチャネルの発現変化を比較するだけであり、心房細動の発症とその維持に関わるイオンチャネルの転写活性を明らかにしたものはない。よって、心房細動を有する心筋の電氣生理学的異常(イオンチャネル発現異常)特に Na⁺チャネル(NaV1.5)、L型 Ca²⁺チャネル(CaV1.2)、Ito チャネル(Kv4.3)、および IK1 チャネル(Kir2.1)の4つの病態責任イオンチャネルの発現制御と microRNA の直接関与の証明は心房細動の病態の解明に大きく貢献する。

3. 研究の方法

(1) ヒト心房筋の全 RNA 回収とイオンチャネル関連遺伝子の解析

患者(家族)より文書により同意を得られた患者から、開心術(あるいは該手術時)において、体外循環回路にて体循環を維持する時に、大血管及び右心房に送血カニューレと脱血カニューレを設置する際に切除され通常は廃棄される数 mm の心房筋組織(右心耳他)を、標本として冷凍保存する。

(2) ヒト心房筋の microRNA の網羅的解析
Universal reference for microRNA research application note(ミルテニーバイオテク株式会社)に委託して、心房細動患者及び対照患者の心房筋組織より得られたサンプルの網羅的解析を行う。引き続き、多変量解析によって、イオンチャネル(あるいは関連蛋白)の増減と相関を示す microRNA を特定する。

(3) ヒト心房筋の全 RNA の網羅的解析

保存している全 RNA 標本を用いて、イオンチャンネル遺伝子を含む全 mRNA の発現を DNA チップ法を用いて解析する。我々はラットに長期間電気刺激を加えてイオンチャンネルのリモデリングを模したモデルを作成し、その全遺伝子発現の解析実験を通して同法の実験手技を既に獲得している。この方法を用いてヒト心房筋の全遺伝子 (RNA) の発現を心房細動群と洞調律群の二群でそれぞれマッチングした 8 症例を比較して心房細動に特異的な遺伝子発現を同定する。

(4) 心房細動患者特有の発現変化を示す遺伝子の特定

イオンチャンネル関連遺伝子 (Na⁺チャンネル (Nav1.5)、L 型 Ca²⁺チャンネル (Cav1.2)、Ito チャンネル (Kv4.3)、および IK1 チャンネル (Kir2.1))、転写因子関連遺伝子、及びマイクロ RNA の発現を心房細動群と洞調律群間で比較し、コンピューター探索ソフトウェアを用いて 2 群間で有意に発現が異なり、かつ転写制御と発現の関連の強い遺伝子 (RNA 干渉とマイクロ RNA) 同定する。同遺伝子は RT-PCR 法を用いて心房細動心筋に発現することを再確認する。

(5) 心筋細胞への microRNA 導入とパッチクランプ法

組み換えアデノウイルス、及びリポフェクトアミンを用いた microRNA のラット心筋細胞への導入。遺伝子導入心筋細胞の全 RNA を抽出後に RT-PCR 法を用いて、導入 microRNA と目的 RNA (イオンチャンネル、転写因子、分子シャペロン等) の発現を確認する。遺伝子導入心筋細胞にパッチクランプ法を用いて、電気生理学的に細胞膜電流の変化を評価する。具体的には、導入 microRNA の発現と標的イオンチャンネル (転写因子、分子シャペロン等) の機能的発現連関を明らかにして、持続性心房細動に伴うイオンチャンネルの発現増減 (リモデリング) が特定 microRNA によって制御されていることを証明する。

4. 研究成果

(1) 解析に使用した検体は、両群とも 60~70 代男性を選出しているため、性、年齢には有意差はなく、利尿剤の使用率を除き、その他の血圧や心エコー所見などについても両群間で有意差はなかった。microRNA マイクロアレイの結果、355 個の microRNA が心房筋に発現することが分かり、さらに Welch t-test (p<0.05) により 39 個の microRNA が AF 特異的に変動することがわかった。また、クラスター解析を行ったところ、正常洞調律患者 (NSR) と持続性 AF 患者では microRNA の発現プロファイルが異なっており、AF 群において発現が亢進している microRNA が多く存在することがわかった。そこで我々は、39 個の microRNA の中から心筋に豊富に発現し、心筋イオンチャンネルと相互作用を示す microRNA を In silico 解析 (Target Scan6.2, miRanda, DIANA-microT3.1, PicTar,

MirTarget) により検索した。その結果、L 型 Ca²⁺チャンネル (Cav1.2) とアセチルコリン感受性 K⁺チャンネル (Kir3.1) を標的遺伝子とする miR-30d が検出された。次にマイクロアレイの結果を検証するために検体数を増やして miR-30d 発現を real-time PCR 法により解析した。その結果、miR-30d 発現量は AF 群で有意に増加することが確認された。さらに、miR-30d の標的遺伝子である CACNA1C (Cav1.2) mRNA と KCNJ3 (Kir3.1) mRNA 発現量を調べた結果、正の相関関係が認められた。さらに、Kir3.1 タンパク発現量は AF 群で有意に減少することが分かった。以上の結果から、持続性 AF 心筋において、miR-30d が過剰発現することでアセチルコリン感受性 K⁺チャンネル (Kir3.1) 発現、電流 (I_{K,ACh}) が有意に抑制される可能性が示唆された。そこで、我々は心筋細胞における miR-30d の機能を調べた。初代培養ラット心筋細胞に miR-30d オリゴを導入しターゲット遺伝子の発現変化を調べた。miR-30d の予想ターゲット遺伝子のひとつである Cav1.2 mRNA 発現は、miR-30d を過剰発現させてもノックダウンしても変化せず miR-30d との相互作用は認められなかった。一方、もうひとつの予想ターゲット遺伝子である Kir3.1 は、mRNA、タンパク発現共に miR-30d のオリゴ濃度依存的に有意に抑制され miR-30d と Kir3.1 の interaction が認められた。さらに、Anti-miR30d オリゴを用いてノックダウン実験を行ったところ KCNJ3 mRNA、及びタンパク発現は有意に増加した。以上の結果より、miR-30d は Kir3.1 の発現を転写後レベルで制御することが確認された。また、Pre-miR-30d により miR-30d を過剰発現させると、Kir3.1 の機能としての I_{K,ACh} 電流が減少することが確認された。多数例においても、I_{K,ACh} 電流は内向き、外向きともに減少したことからこの電気生理学的変化は Kir3.1 発現の減少によるものだと考えられた。次に我々は、AF 心筋でなぜ miR-30d が発現亢進していたのかを調べるため、細胞内 Ca²⁺過負荷状態を心筋細胞で再現して miR-30d と標的遺伝子 Kir3.1 mRNA 発現をみた。Ca²⁺イオノフォアである A23187 を用いて細胞内 Ca²⁺濃度を増加させると、濃度依存的に miR-30d 発現は増大し、標的遺伝子 Kir3.1 mRNA 発現は減少したことから細胞内 Ca²⁺過負荷がこの制御機構の上流に存在することが示唆された。そこで、細胞内 Ca²⁺濃度の増加と miR-30d の発現にどのような経路が関与するかを調べた。まず Ca²⁺-NFAT 経路の阻害剤を用いて miR-30d 発現の変化をみたところ、A23187 による miR-30d の増加はカルシニューリンの阻害剤 (CyclosporinA, FK506) を作用させても抑制されなかったことから、Ca²⁺過負荷による miR-30d 発現増加経路に NFAT シグナルは関与しない可能性が示唆された。一方、プロテインキナーゼ C (PKC) 阻害薬である Chelerythrine、Ca²⁺依存性 PKC 阻害薬である Gö6976 の投与は A23187 による miR-30d 発現

増加を抑制することが分かった。さらに、PKC activator である PMA を添加すると Ca²⁺過負荷と同様の miR-30d 発現増加が認められたことから、miR-30d 発現に Ca²⁺-PKC 経路が関与することが示唆された。以上の結果から、持続性 AF 患者の心筋で増大していた miR-30d は細胞内 Ca²⁺濃度の増大に伴った PKC の活性化に起因し、増大した miR-30d が標的遺伝子である Kir3.1 チャンネルの発現を抑制するという新しい転写後制御機構が明らかとなった。

(2) これまで、AF の治療には既存の抗不整脈が使用されてきたが、実際に電氣的リモデリングが進行した心臓に対してはこれらの有効性が低いことが問題視されてきた。我々が注目した miR-30d は心房特異的 Kir3.1 チャンネルの発現を制御することから、miR-30d をラットに投与して心電図記録を行い in vivo で microRNA の作用を検証することで、心室性不整脈を引き起こすことなく心房特異的に不応期を調節できる核酸創薬として今後臨床応用できる可能性がある。現在我々は miR-30d を過剰発現させた遺伝子改変ラットを作製中である。これまで持続性 AF の病態を的確に現わすモデル動物が存在しなかったため、新規の不整脈治療薬開発のための基盤研究の妨げとなってきたが、本ラットを用いて生理学的解析を行うことで AF の病因に関わる因子の同定につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

Masaki Morishima, Eriko Iwata, Chisato Nakada, Yoshiyuki Tsukamoto, Hiroki Takanari, Shinji Miyamoto, Masatsugu Moriyama, Katsushige Ono; *Circulation Journal* 80; 1346-1355, 2016. Atrial fibrillation-mediated up-regulation of miR-30d regulates myocardial electrical remodeling of G-protein-gated K⁺ channel, I_{K,ACh}. (査読あり)

森島真幸; 日本病態生理学会雑誌 Vol.24 No.3, 2015. ヒト心房細動心筋において過剰発現する microRNA の機能的意義の解析. (査読あり)

Shimaoka Toru, Wang Yang, Morishima Masaki, Miyamoto Shinji, Ono Katsushige; *Pathophysiology* 22: 87-93, 2015. Hypomagnesemic down-regulation of L-type Ca²⁺ channel in cardiomyocyte as an arrhythmogenic substrate in rats. (査読あり)

Ma Fangfang, Takanari Hiroki, Masuda Kimiko, Morishima Masaki, Ono Katsushige; Short- and long-term inhibition of cardiac inward-rectifier

potassium channel current by an antiarrhythmic drug bepridil. *Heart Vessels* 2015 Oct 26. [Epub ahead of print] (査読あり)

Kawano Y, Tamura A, Ono K, Kadota J; *Journal of Cardiology*, 63: 69-72, 2014. Association between obstructive sleep apnea and premature supraventricular contractions. (査読あり)

Uchino Tomoko, Isomoto Shojiro, Noguchi Takayuki, Ono Katsushige. *Heart Vessels* 28(5): 658-666, 2013. Window current through the T-type Ca²⁺ channel triggers the mechanism for cellular apoptosis via mitochondrial pathways. (査読あり)

Nakano S, Ikebe E, Tsukamoto Y, Wang Y, Matsumoto T, Mitsui T, Yahiro T, Inoue K, Kawazato H, Yasuda A, Ito K, Yokoyama S, Takahashi N, Hori M, Shimada T, Moriyama M, Kubota T, Ono K, Fujibuchi W, Jeang K T, Iha H, Nishizono A; *PLOS ONE* 8(9): e73205, 1-12, 2013. Commensal microbiota contributes to chronic endocarditis in TAX1BP1 deficient mice. (査読あり)

[学会発表](計 14 件)

Haruyama T, Morishima M, Takanari H, Ono K: Role of apelin in human atrial tissue with persistent atrial fibrillation. "第 92 回日本生理学会大会 2015.3.20-23, 神戸国際会議場(兵庫県、神戸市)"

Takahashi M, Takanari H, Morishima M, Ono K: Influence of high-cholesterol on arrhythmogenicity in mouse atrium. "第 92 回日本生理学会大会 2015.3.20-23, 神戸国際会議場(兵庫県、神戸市)"

森島真幸, 岩田英理子, 中田知里, 塚本善之, 高成広起, 宮本伸二, 守山正胤, 小野克重: 心房細動におけるイオンチャンネルリモデリングを制御する microRNA. "第 65 回西日本生理学会 2014.10.23-24, 琉球大学国際会議場、(沖縄県、西原町)"

Morishima M, Fujita T, Osagawa S, Ono K: BDNF/TrkB signaling modulates T-type Ca²⁺ channel expression in cardiomyocytes exposed to hypoxic condition. "第 30 回日本不整脈学会学術大会・第 32 回日本心電学会学術集会 2015.7.29, 京都国際会議場(京都府、京都市)"

馬芳芳, 高成広起, 増田季美子, 森島真幸, 小野克重; ペプリジルの短期的、及び長

期的作用による心筋細胞内向き整流カリウム電流の抑制. "第 25 回日本循環薬理学会 2015.12.4 東大寺総合文化センター(奈良県、奈良市)"

Takanari H, Houtman M, Stary-Weinzinger A, Ono K, van der Heyden M: The interaction of new IK1 blocker (PA-6) with intracellular spermine and magnesium. "第 91 回日本生理学会大会 2014.3.16-18, 鹿児島大学工学部キャンパス (鹿児島県、鹿児島市)"

Morishima M, Osagawa S, Inagaki T, Tsuchimochi H, Shirai M, Ono K: Role of T-type Ca^{2+} channel expression in cardiomyocytes exposed to hypoxic condition in the heart. "第 91 回日本生理学会大会 2014.3.16-18, 鹿児島大学工学部キャンパス (鹿児島県、鹿児島市)"

Masuda K, Wang Y, Ma FF, Morishima M, Takanari H, Ono K: Testosterone abbreviates QT intervals and up-regulates KvLQT1 channel in cardiomyocytes through genomic pathway. "第 91 回日本生理学会大会 2014.3.16-18, 鹿児島大学工学部キャンパス (鹿児島県、鹿児島市)"

Morishima M, Iwata E, Nakada C, Tsukamoto Y, Takanari H, Miyamoto S, Moriyama M, Ono K: Micro RNA-dependent regulation of K^{+} channel remodeling in human cardiomyocytes with persistent atrial fibrillation. "第 29 回日本不整脈学会学術大会・第 31 回日本心電学会学術集会 合同学術大会 2014.7.22-25, 東京プリンスホテル (東京都)"

馬芳芳, 増田季美子, 森島真幸, 高成広起, 小野克重: 新生獣ラット心室筋の内向き整流カリウムチャンネルに対するベプリジルの長期作用. "第 24 回日本病態生理学会大会 2014.8.8-10, 北九州国際会議場 (福岡県、北九州市)"

高成広起, 高橋正起, 馬芳芳, 増田季美子, 近藤秀和, 森島真幸, 高橋尚彦, 小野克重: 炎症と脂質負荷が心房細動発症に及ぼす影響. "第 24 回日本循環薬理学会 2014.12.5, 山形テルサ (山形県、山形市)"

森島真幸, 藤田崇史, 小野克重: 脳由来神経栄養因子 BDNF とその受容体 TrkB の低酸素環境下心筋における発現動態. "第 23 回日本病態生理学会大会 2013.8.2-4, 東京慈恵会大学 1 号館、(東京都)"

増田季美子, 王岩, 馬芳芳, 森島真幸, 小野克重: ゲノム作用を介したテストステロ

ンの心筋カリウムチャンネルの発現と QT 間隔に対する影響. "第 23 回日本病態生理学会大会 2013.8.2-4, 東京慈恵会大学 1 号館、(東京都)"

増田季美子, 王岩, 馬芳芳, 森島真幸, 小野克重: テストステロンの長期作用による心筋 K^{+} チャンネルの発現制御と心電図 QT 間隔の短縮. "第 64 回西日本生理学会 2013.10.18-19, 産業医科大学ラマティーニホール、(福岡県、北九州市)"

〔図書〕(計 5 件)

小野克重他編・著、シンプル循環器学
南江堂、2015、総ページ p447.

井上 博, 小野克重, 中谷晴昭, 平岡昌和編、循環器薬物治療実践シリーズ
ベプリジルの基礎と臨床 - 上手に使うコツ -、ライフメディコム、2013、総ページ p126.

新 博次, 矢坂正弘, 小野克重, 平岡昌和編、循環器薬物治療実践シリーズXI、抗血栓治療薬の現状と未来。ライフメディコム、2013、総ページ p78.

小野克重、ベプリジルの Na^{+} チャンネルと Ca^{2+} チャンネルに対する作用、循環器薬物治療実践シリーズ . ベプリジルの基礎と臨床 - 上手に使うコツ - (井上 博, 小野克重, 中谷晴昭, 平岡昌和 編) p19-37, ライフメディコム, 2013.

小野克重、一過性外向き電流 (I_{to}) の性差、 Na 電流における貫壁性の違い、虚血と一過性外向き電流 (I_{to})、興奮収縮連関要素の貫壁性での不均一性、J 波症候群 (森博愛, 丸山徹 編) ps18, 45, 179, 184、医学出版社、2013.

〔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

<http://www.med.oita-u.ac.jp/pathophysiology/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

研究代表者

小野 克重 (ONO, Katsushige)

大分大学 医学部病態生理学講座 教授

研究者番号: 4 0 2 5 3 7 7 8