

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461045

研究課題名(和文)心房伸展において、炎症が心房リモデリングを惹起するメカニズムの包括的解明

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of the mechanism linking between atrial remodeling and stretch or inflammation in atrium.

研究代表者

笹野 哲郎 (Sasano, Tetsuo)

東京医科歯科大学・保健衛生学研究科・准教授

研究者番号：00466898

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)：高血圧などの生活習慣病は心房細動のリスクとなる。圧負荷による心房伸展刺激に加え、メタボリック症候群や糖尿病がどのように心房細動を引き起こすか、マイクロRNAの関与を中心に検討を行った。マウスを用いて圧負荷・高脂肪食・糖尿病の各モデルを作成し、心房性不整脈の誘発と心房におけるマイクロRNA(miR)の網羅的な発現解析を行い、鍵となるmiRNAを同定した。

さらに、メタボリック症候群モデルマウスにおいて詳細な解析を行い、miR-27bの発現が心房で増加し、心房のギャップ結合チャネルであるCx40の発現を抑制して心房内伝導速度を低下させることで、心房細動を引き起こすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：It has been well known that lifestyle-related diseases like hypertension, metabolic syndrome, and diabetes are the risk of atrial fibrillation. We aimed to clarify the mechanism linking these pathological conditions and atrial arrhythmias using mice model, focusing on the involvement of microRNA (miR). We performed electrophysiological analysis and comprehensive expression analysis of miR, to identify the miRs playing a key role for atrial arrhythmias. We then performed thorough examination in metabolic syndrome model, and found that the expression of miR-27b was increased in atrium. The expression of Cx40, a major gap-junction channel in atrium was regulated by miR-27b. The increased expression of miR-27b caused the conduction disturbance, resulting in the higher inducibility of atrial tachyarrhythmias.

研究分野：不整脈

キーワード：心房細動 細胞外ATP ミクロRNA 高脂肪食 糖尿病 圧負荷 メタボリック症候群 ギャップジャンクション

1. 研究開始当初の背景

心房細動は最も頻度の高い持続性不整脈であり、脳梗塞の合併等により患者 QOL を著しく低下させることが大きな社会問題となっている。加齢・心不全・心房拡大に加えて、糖尿病やメタボリック症候群といった生活習慣病によって発症頻度が増加することから、高齢化社会を迎えたわが国では特にその治療戦略の確立が急務である。

心房細動治療は当初はイオンチャネルをターゲットとする薬物治療が中心であったが、満足できる治療成績を上げるには至らなかった。これに代わる戦略として現在は2つのアプローチがとられている。一つはカテーテルアブレーションであり、特に孤立性心房細動の起源の多くが肺静脈内 myocardial sleeve であることから、肺静脈隔離法は心房細動の治療効果を著しく向上させた。一方、心不全等に合併する心房細動は肺静脈起源でないものも多く、心房筋が心房細動に適応した状態に変化することで生じる。この現象を心房リモデリングと呼ぶ。心房リモデリングは、心房筋のイオンチャネル発現変化による電氣的リモデリングと、心房における線維化を中心とした組織的リモデリングに分けられる。心房リモデリングの抑制が心房細動の治療につながるという考えから、心房リモデリングに介入する“アップストリーム治療”が試みられたが、期待された結果は得られなかった。この原因の一つとして、心房の組織的リモデリングのどの段階で何をターゲットとして治療するか、不明瞭であったことが考えられる。

我々は、心房伸展刺激が心房筋細胞からの細胞外 ATP の一過性放出を惹起し、マクロファージの浸潤を誘導して心房炎症を引き起こすこと、それに引き続いて線維化が生じ、心房リモデリングが生じることを報告した。本研究では、心房伸展刺激に加え、糖尿病やメタボリック症候群といった生活習慣病においての心房リモデリングも含めて、心房細動が進行するメカニズムをより包括的に解明することが望ましいと考えられる。

2. 研究の目的

心房細動はメタボリック症候群や加齢・心不全・心房拡大に合併することが多いと報告されているが、これらのリスク因子と心房細動の直接的な因果関係は解明されていない。メタボリック症候群・糖尿病・高血圧では全身の軽微な炎症があること、炎症が心房細動の危険因子であることから、心房の炎症は重要なファクターであると考えられる。本研究では、心不全・心房拡大やメタボリック症候群における心房炎症と心房リモデリングについて、マイクロ RNA の関与を中心に検討する。

3. 研究の方法

(1) マウス病態モデル

1. 横行大動脈縮窄(transverse aortic constriction; TAC)による心房圧負荷モデル、2. ストレプトゾシン(Streptozocin; STZ)腹腔内投与による糖尿病(DM)モデル、3. 高脂肪食(High fat diet; HFD)投与による肥満モデル、を作成した。各モデルは作成後 8 週間を経過した後に評価を行った。TAC モデルに対しては Sham 手術群、DM モデルに対しては STZ の溶媒(クエン酸ナトリウム溶液)のみを腹腔内投与した群、HFD モデルに対しては通常餌を与えた群をそれぞれコントロール群として用意し、両者の比較検討を行った。

上記モデルに対して、組織学的評価・定量的 RT-PCR および ELISA によりマクロファージ浸潤および炎症性サイトカイン発現の評価を行った。さらに、in vivo の電気生理学的検査または摘出心による optical mapping を行って心房性不整脈の誘発性の評価を行った。

(2) マイクロ RNA の網羅的解析

各病態モデル群と対照群より心房を摘出し、miRvana PARIS (Life Technologies) を用いてマイクロ RNA を含む total RNA を抽出した。逆転写ののち microRNA array card を用いてマイクロ RNA の定量を行った。さらに、網羅的解析により有意に変化したマイクロ RNA の発現変化を定量的 RT-PCR により評価した。

(3) マイクロ RNA のターゲット遺伝子の予測と Luciferase assay による評価

マイクロ RNA が制御する遺伝子については、Web 上のプログラム(TargetScan)を用いて行い、候補遺伝子の 3'-UTR をクローニングしてベクターに入れ、マイクロ RNA と共に遺伝子導入を行って Luciferase assay により発現量の定量を行った。

(4) 培養心房筋細胞でのパルミチン酸負荷によるマイクロ RNA とターゲット遺伝子の発現変化

マウス心房筋細胞である HL-1 細胞を用いて、パルミチン酸負荷を行ってマイクロ RNA とそのターゲット遺伝子の発現変化を評価した。

4. 研究成果

(1) マウス病態モデル

各モデルマウスの心房組織に対し、F4/80 抗体を用いてマクロファージの浸潤を評価した。その結果、いずれのモデルでも心房筋内へのマクロファージの浸潤を認めた(図 1A)。いずれのモデルでもコントロール群ではマクロファージの検出は極めて少なかった。

た。さらに、心房組織において、炎症性サイトカインである IL-18 および IL-6 の mRNA を定量したところ、いずれのモデルにおいても有意な発現増加を認めた (図 1B)。

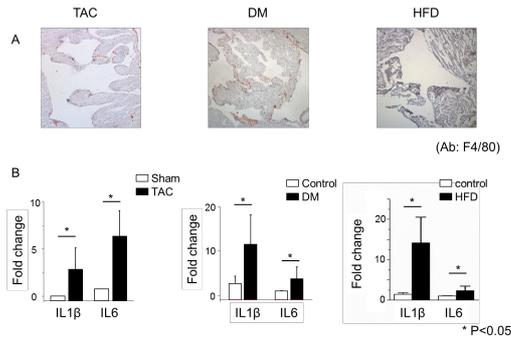


図1 心房炎症モデルマウスにおけるマクロファージ浸潤と炎症性サイトカイン発現

さらに同モデルで心房性不整脈の誘発性を評価した。STZ, HFD モデルマウスに対しては、マウス用 1Fr 4 極カテーテルを右心房・右心室内に挿入・留置し、心房へのプログラム刺激による心房性不整脈の誘発を試みた。また、TAC モデルマウスに対しては、心臓を摘出後にランゲンドルフ還流を行い、電位感受性色素である di 4-ANEPPS を投与して高速 CMOS カメラ (MiCAM Ultima, Brainvision) を用いて評価した。これらの電気生理学的検査における心房頻拍の誘発率を図 2 に示す。TAC および HFD モデルではそれぞれ対照群に比して有意に高値であったが、DM モデルでの誘発率は他のモデルより低かった。

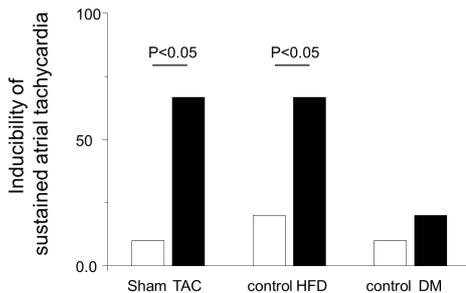


図2 各病態モデルマウスにおける心房頻拍誘発率

(2)マイクロ RNA の網羅的解析

続いて、我々は microRNA array card (Life Technologies) を使用して心房内のマイクロ RNA の網羅的解析を行った。各病態モデル群と対照群より心房を摘出し、762 の主要なマイクロ RNA の発現量を定量した。各病態モデルにおいて心房で発現が増加していたマイクロ RNA の数は、TAC モデルで 21、HFD モデルで 24、DM モデルで 11 個であった。また、発現が低下していたマイクロ RNA の数は、TAC モデルで 8、HFD モデルで 6、DM モデルで 37 個であった。各々のモデルにおいて共通して変化しているマイクロ RNA を検索した結果を図 3 に示す。発現が増加していたマイクロ RNA に関しては、TAC モデルと DM モデルで共通していたも

のが 1 個、TAC モデルと HFD モデルで共通していたものが 2 個であった。また、発現が低下していたマイクロ RNA については、3 つのモデルで共通して低下していたものが 1 個認められた。

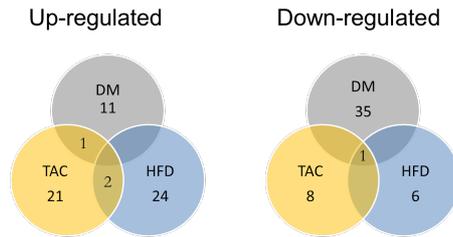


図3 TAC, DM, HFDモデルにおいて共通して変化の見られたマイクロRNA

(3)マイクロ RNA のターゲット遺伝子の予測と Luciferase assay による評価

(2)で同定されたマイクロ RNA のうち、HFD モデルで発現が増加していた miR-27b に着目して以降の実験を進めた。HFD モデルを作成し、in vivo での電気生理学的検査を行うと、(1)の検討同様に HFD モデルでは心房頻拍の誘発率が有意に高かった (図 4A, B)。

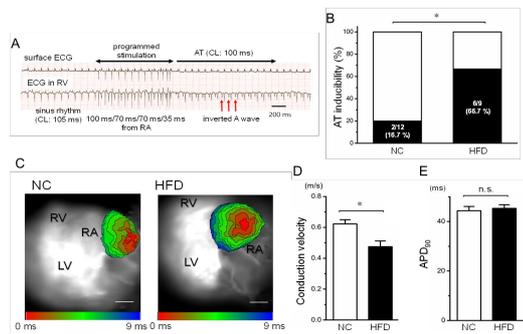


図4 高脂肪食(HFD)モデルにおける心房頻拍の誘発と、心房内伝導遅延

さらに、ランゲンドルフ還流下に摘出した心臓を電位感受性色素で染色し、洞調律時の右心房興奮伝導を観察したところ、HFD では心房の活動電位持続時間には変化が見られなかったが、有意な伝導速度の低下が認められた (図 4C-E)。

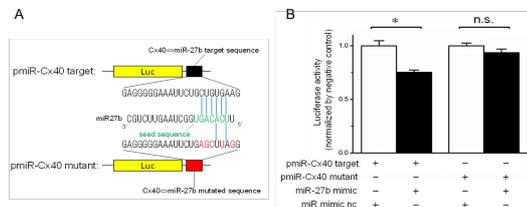


図5 miR-27bによるCx40の発現抑制

miR-27b がターゲットとする遺伝子を TargetScan で探索したところ、心房の主要なギャップジャンクションチャンネルである Connexin-40 (Cx40) が候補として同定された。このため、Cx40 の 3'-UTR 配列の中から、miR-27b の結合予測配列を作成してルシフェラーゼベクターに入れ、miR-27b と共にト

ランスフェクションして Cx40 の発現を検討した。miR-27b は有意に Cx40 の発現を抑制し、結合予測配列に遺伝子変異を導入するとこの抑制は消失した(図 5)。

(4) 培養心房筋細胞でのパルミチン酸負荷によるマイクロ RNA とターゲット遺伝子の発現変化

心房筋細胞(HL-1)に対して、培地中に 200 μ M のパルミチン酸を加えて miR-27b と Cx40 の発現を検討した。パルミチン酸負荷

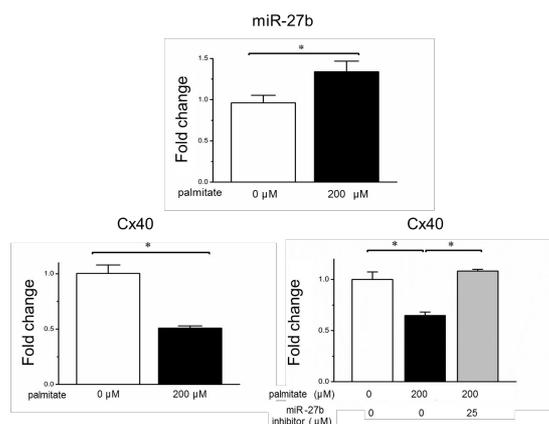


図6 パルミチン酸負荷におけるmiR-27bとCx40の発現変化

は有意に miR-27b の発現を増加させ、Cx40 の発現量を減少させた。これに対して、miR-27b の inhibitor を加えてパルミチン酸負荷を行うと、Cx40 の減少は消失した。このことから、パルミチン酸負荷は miR-27b を介して Cx40 を抑制していることが明らかとなった。

(5)まとめ

心房圧負荷および生活習慣病のモデルマウスにおいて、心房の炎症性変化と催不整脈性を確認した。さらにマイクロ RNA の網羅的解析により、これらの病態に共通するマイクロ RNA の候補を同定した。

さらに、高脂肪食モデルにおいて miR-27b に着目して詳細な検討を行い、miR-27b はパルミチン酸刺激によって増加し、Cx40 を減少させることで心房の伝導遅延を起こして心房性不整脈の誘発性を上げることが明らかとなった。

(6)派生した他の研究

心房細動研究を進める過程で、心房細動に伴う心原性脳梗塞の重要性を考慮し、上記テーマとは異なるが、血液凝固能の高感度な評価を試みた。ソニー株式会社の実験用試作機である誘電コアグロメーターを用いて、全血の凝固能を評価する方法を確立し、この指標が微量な凝固能亢進・低下とともに定量的に評価可能であることを明らかにした。

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 17 件)

1. Takahashi K, Sasano T, Sugiyama K, Kurokawa J, Tamura N, Soejima Y, Sawabe M, Isobe M and Furukawa T. High-fat diet increases vulnerability to atrial arrhythmia by conduction disturbance via miR-27b. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;90:38-46 (査読あり).
2. Yoshikawa S, Usami T, Kikuta J, Ishii M, Sasano T, Sugiyama K, Furukawa T, Nakasho E, Takayanagi H, Tedder TF, Karasuyama H, Miyawaki A and Adachi T. Intravital imaging of Ca²⁺ signals in lymphocytes of Ca²⁺ biosensor transgenic mice: indication of autoimmune diseases before the pathological onset. *Sci Rep.* 2016;6:18738 (査読あり).
3. Nakamura T, Hachiya H, Yagishita A, Tanaka Y, Higuchi K, Kawabata M, Sasano T and Hirao K. The Relationship between the Profiles of SVC and Sustainability of SVC Fibrillation Induced by Provocative Electrical Stimulation. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2016;39:352-60 (査読あり).
4. Sugiyama K, Sasano T, Kurokawa J, Takahashi K, Okamura T, Kato N, Isobe M and Furukawa T. Oxidative Stress Induced Ventricular Arrhythmia and Impairment of Cardiac Function in Nos1ap Deleted Mice. *Int Heart J.* 2016;57:341-9 (査読あり).
5. Koizumi A, Sasano T, Kimura W, Miyamoto Y, Aiba T, Ishikawa T, Nogami A, Fukamizu S, Sakurada H, Takahashi Y, Nakamura H, Ishikura T, Koseki H, Arimura T, Kimura A, Hirao K, Isobe M, Shimizu W, Miura N and Furukawa T. Genetic defects in a His-Purkinje system transcription factor, IRX3, cause lethal cardiac arrhythmias. *Eur Heart J.* 2016;37:1469-1475 (査読あり).
6. Hasegawa Y, Hamada S, Nishimura T, Sasaki T, Ebana Y, Kawabata M, Goya M, Isobe M, Koyama T, Furukawa T, Hirao K and Sasano T. Novel dielectric coagulometer identifies hypercoagulability in patients with a high CHADS2 score without atrial fibrillation. *PLoS One.* 2016;11:e0156557 (査読あり).
7. 笹野 哲郎、小泉 章子、古川 哲史：His-Purkinje 特異的な転写因子の機能異常と J 波症候群の関連 - J 波症候群の新たな原因・修飾遺伝子の可能性 - 循環器専門医 2014; 22: 223-230 (査読なし).
8. 笹野 哲郎、古川 哲史：心房頻拍モデルマウスおよび心房細動患者における、心房炎症とマイクロ RNA 発現の網羅的解析 循環

他 9 件

〔学会発表〕(計 31 件)

1. Hamada S, Hasegawa Y, Nishimura T, Furukawa T, Isobe M, Hirao K, Sasano T: Novel dielectric blood coagulometry can evaluate factor Xa and thrombin activity individually. 第 80 回日本循環器学会 仙台国際センター 仙台 平成 28 年 3 月 20 日

2. Hasegawa Y, Hamada S, Shiohira S, Yoshitake T, Nishimura T, Sasaki T, Kawabata M, Goya M, Isobe M, Furukawa T, Hirao K, Sasano T: Dielectric blood coagulometry can identify the hypercoagulability in patients with high CHADS₂-Vasc score without atrial fibrillation. 第 80 回日本循環器学会 仙台国際センター 仙台 平成 28 年 3 月 18 日

3. Takahashi K, Sasano T, Sugiyama K, Orui Y, Isobe M, Furukawa T: Contribution of pannexin-1 to cardioprotection and arrhythmogenicity induced by preconditioning against ischemia/reperfusion injury. 第 80 回日本循環器学会 仙台国際センター 仙台 平成 28 年 3 月 18 日

4. Sasano T, Koizumi A, Kimura W, Nogami A, Fukamizu S, Sakurada H, Hirao K, Isobe M, Kimura A, Aiba T, Miyamoto Y, Shimizu W, Miura N, Furukawa T: IRX3, a His-Purkinje system specific transcription factor is related with ventricular tachyarrhythmia. Asia-pacific Heart Rhythm Society meeting. Melbourne Convention and Exhibition Center, Melbourne, Australia, 2015 Nov. 22

5. Sasano T, Takahashi K, Ihara K, Sugiyama K, Nishimura T, Shirai Y, Tao S, Sasaki T, Kawabata M, Goya M, Hirao K, Isobe M, Furukawa T: Comprehensive analysis identifies common microRNA expression involved in murine models of atrial remodeling and clinical specimen. Asia-pacific Heart Rhythm Society meeting. Melbourne Convention and Exhibition Center, Melbourne, Australia, 2015 Nov. 22

6. Sasano T: Gene Therapy for Post-Myocardial Infarction Related Ventricular Tachycardia. Asia-pacific Heart Rhythm Society meeting. Melbourne Convention and Exhibition Center, Melbourne, Australia, 2015 Nov. 21

7. Sugiyama K, Sasano T, Tamura N, Okamura T, Kato N, Isobe M, Furukawa T: Oxidative stress induced ventricular arrhythmias and impaired cardiac function in Nos1ap deleted mice. Asia-pacific Heart Rhythm Society meeting. Melbourne

Convention and Exhibition Center, Melbourne Convention and Exhibition Center, Melbourne, Australia, 2015 Nov. 21

8. Hamada S, Hasegawa Y, Nishimura T, Sumi Y, Koyama T, Furukawa T, Hirao K, Sasano T: Novel Dielectric Blood Coagulometry Can Evaluate Factor Xa Activity and Reduced Coagulability by Dalteparin. Asia-pacific Heart Rhythm Society meeting. Melbourne Convention and Exhibition Center, Melbourne, Australia, 2015 Nov. 20

9. Hasegawa Y, Hamada S, Nishimura T, Shirai Y, Tao S, Sasaki T, Kawabata M, Goya M, Sumi Y, Isobe M, Hirao K, Sasano T: Novel Dielectric Blood Coagulometry Can Detect Increased Coagulability in Subjects with High CHADS₂ Score. 日本不整脈学会・心電学会合同学術集会 国立京都国際会館 京都 平成 27 年 7 月 29 日

10. Hasegawa Y, Hamada S, Nishimura T, Shirai Y, Tao S, Sasaki T, Kawabata M, Goya M, Isobe M, Koyama T, Sumi Y, Hirao K, Sasano T: Novel dielectric coagulometer identifies the increased coagulability in patients with high CHADS₂ score. Heart Rhythm Society meeting, Boston Convention and Exhibition Center, Melbourne Boston, USA, 2015 May 15.

11. Sasano T, Takahashi K, Zhang P, Ihara K, Sugiyama K, Tamura N, Nishimura T, Shirai Y, Tao S, Sasaki T, Kawabata M, Goya M, Hirao K, Isobe M, Furukawa T: Comprehensive Analysis Linking MicroRNA and Atrial Inflammation in Mouse and Human. 第 79 回日本循環器学会 大阪国際会議場 大阪 平成 27 年 4 月 24 日

12. Takahashi K, Sasano T, Sugiyama K, Isobe M, Furukawa T: High-Fat Diet Increases Vulnerability to Atrial Arrhythmia by Conduction Disturbance via MicroRNA. 第 79 回日本循環器学会 大阪国際会議場 大阪 平成 27 年 4 月 24 日

13. Sugiyama K, Sasano T, Tamura N, Okamura T, Kato N, Isobe M, Furukawa T: Oxidative Stress Induced Ventricular Arrhythmias and Impaired Cardiac Function in Nos1ap Deleted Mice. 第 79 回日本循環器学会 大阪国際会議場 大阪 平成 27 年 4 月 25 日

14. Sasano T, Orui Y, Takahashi K, Zhang P, Sugiyama K, Furukawa T: Involvement of Pannexin-1 for Cardioprotection and Ventricular Arrhythmia in Ischemia/Reperfusion Injury and Ischemic Preconditioning and Postconditioning. 日本不整脈学会・心電学会合同学術集会 ザ・プリンスパークタワー東京 東京 平成 26 年 7 月 25 日

15. Takahashi K, Sasano T, Sugiyama K,

Furukawa T. High-Fat Diet Increases Vulnerability of Atrial Arrhythmia by Conduction Disturbance via MicroRNA. 日本不整脈学会・心電学会合同学術集会 ザ・プリンスパークタワー東京 東京 平成 26 年 7 月 24 日

16. Oya M, Ishihara Y, Shirai Y, Ihara K, Tao S, Sasaki T, Kawabata M, Yokoyama Y, Hirao K, Sasano T.: Dominant frequency analysis of the left atrium utilizing high-sensitive vector magnetocardiography. Heart Rhythm Society meeting, Moscone Center, San Fransisco, USA, 2014 May 8.

17. Takahashi K, Sasano T., Sugiyama K, Orui Y, Isobe M, Furukawa T.: High-fat diet increases vulnerability of atrial arrhythmia by conduction disturbance via microRNA. 第 78 回日本循環器学会 東京国際フォーラム 東京 平成 26 年 3 月 21 日

18. Sasano T., Koizumi A, Kimura W, Nogani A, Fukamizu S, Sakurada H, Hirao K, Isobe M, Kimura A, Miyamoto Y, Shimizu W, Miura N, Furukawa T.: Genetic Defects in a His-Purkinje System-Specific Transcription Factor as a Cause of J Wave Syndrome. 第 78 回日本循環器学会 東京国際フォーラム 東京 平成 26 年 3 月 21 日

他 13 件

〔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〕

東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科
生命機能情報解析学ホームページ

<http://www.tmd.ac.jp/gradh/bi/index.html>

東京医科歯科大学難治疾患研究所生体情報
薬理学ホームページ

<http://www.tmd.ac.jp/mri/cph/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

笹野 哲郎 (SASANO TETSUO)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究
科・准教授

研究者番号：00466898

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

古川 哲史 (FURUKAWA TETSUSHI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号：80251552

(4)研究協力者
なし