

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592362

研究課題名(和文)敗血症病態による頻脈性不整脈におけるmicro-RNAの影響についての研究

研究課題名(英文)Effect of micro-RNA on tachyarrhythmia in septic condition.

研究代表者

畠山 登(Hatakeyama, Noboru)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：70251907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症病態に伴う心房細動の発生について、心房筋細胞のイオンチャネルリモデリングに対するmicro-RNAの影響について検討した。心房筋細胞において全身性炎症では、L型カルシウムイオンチャネルの発現抑制、ならびに遅延整流型カリウムチャネルの発現増大が観察された。また炎症に伴う誘導型一酸化窒素の合成促進が観察された。一方で、敗血症病態に伴い、血液内におけるmicro RNAを含むmicro particleの出現が観察されたが、これらチャネルリモデリングとの関係を見いだすことはできず、チャネルリモデリングは炎症性サイトカインの直接作用によると推察された。

研究成果の概要(英文)：Effect of micro-RNA on channel remodeling in atrial cardiac myocyte on atrial fibrillation in septic condition was investigated. Septic condition was induced by the injection of lipopolysaccharide, and in this model, expression of L-type calcium channel was inhibited, but expression of delayed rectified potassium channel was enhanced. At the same time, expression of inducible nitric oxide was enhanced. In the blood, micro particles that contain micro RNA were observed, but direct relationship between micro-RNA and channel remodeling could not find. It was suspected that channel remodeling in septic condition might be a direct effect of inflammatory cytokines.

研究分野：麻酔科学，薬理学

キーワード：敗血症 頻脈性不整脈

1. 研究開始当初の背景

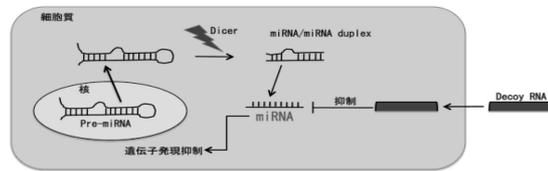
全身性炎症反応症候群 (SIRS: Systemic Inflammatory Response Syndrome) は、感染症をはじめ、外傷、手術、膵炎、熱傷、および Bacterial Translocation の発生を機に発症することが知られている。このうち、感染症を合併する SIRS のことを敗血症と呼ぶ。SIRS の診断基準として、以下の4項目のうち2項目以上を満たすことが求められており、頻脈性不整脈もこれら項目に含まれる (Crit Care Med 20:864-874, 1992)。

a. 呼吸 20 回 / 分以上, PaCO₂ < 32mmHg, b. 脈拍 90 回 / 分以上 (頻脈性不整脈) c. 体温 < 36 , > 38 , d. 白血球数 > 12,000/mm³ or < 4,000/mm³ (幼若型 > 10%)

一方、これまで申請者の研究により、心筋での炎症反応や酸化ストレスなどの病態が心房筋における活動電位持続時間の短縮を引き起こし、相対的不応期の短縮により頻脈性不整脈が発生しやすくなることが明らかとなった。さらにその機序として主として iNOS の過剰発現に伴う心房筋でのカルシウムおよびカリウムチャネル発現変化 (リモデリング) および、機能異常が引き起こされ、AF をはじめとする頻脈性不整脈を発生させることを明らかにしてきた。しかしながら、これらの引き金となる病態が心筋細胞内の遺伝子情報伝達をどのように変化させて頻脈性不整脈を発症されるかは依然として不明である。おそらくこれには、今までの不整脈研究が、個体全体での発生頻度や予後に関するものか、摘出心筋細胞を用いた電気生理実験によるもので行われてきた経緯が関係しているものと考えられる。したがって、頻脈性不整脈発生に關与する遺伝子制御の解析やその理解には大きな遅れがあると思われる。

遺伝子制御の研究は近年その発展が目覚ましく、その中で、miRNA と呼ばれる、細胞内に存在する長さ 25 塩基ほどの一本鎖 RNA が、様々な遺伝子発現を調節する機能を持つことが明らかになってきた (図)。miRNA の前駆物質 pre-miRNA が核内で生成され、細胞質内へ運ばれた後、dicer と呼ばれる物質により切り取られ最終的に単鎖の miRNA が合成される。miRNA は様々な細胞内カスケードに關与していることが知られるようになり、細胞外より decoy RNA を投与するとその機能を抑制できることも明らかになっている。さらにごく最近、心筋の miRNA は主として 6 種 (1, let-7, 133, 126-3p, 30c および 26a) に絞られることが明らかになった (Cardiovasc Res 2011)。しかし、これらの miRNA の発現量が実際に頻脈性不整脈発生にどのような影響を与えるか、また頻脈性不整脈発生時に増大した miRNA の発現を制御することによってこれを治療できるかについての知見はない。

さらに、SIRS の病態においては iNOS の



過剰発現が起きるが、miRNA 発現増加との関係も依然として不明であり、炎症がどのような機序で miRNA の発現を増加させるのかについても説明が必要であると思われる。

2. 研究の目的

SIRS および敗血症病態に合併する頻脈性不整脈の治療にはしばしば難渋する。そこでわれわれは、これまでに得られた知見に基づき、心臓における miRNA の発現変化に着目し、その病態解析と治療戦略の構築を行おうとするものである。これまでの miRNA に関する研究は、その多くが心房細動患者における miRNA の発現量に関するものであり、また炎症病態が心房筋細胞内 miRNA に及ぼす影響は未知である。特定の miRNA が心臓電気生理に与える影響は明らかになりつつあるが、治療の分野への応用は進んでいないのが現状である。本研究は、全身性炎症病態に伴う miRNA の変化を明らかにするだけではなく、合併症である不整脈の発生を細胞レベルで抑制することを明らかにすることを目的としている。その方法として電気生理学、分子薬理学、遺伝子工学的手法をあわせて多面的に検討するとともに、decoy RNA を用いて治療戦略を構築することはきわめて独創的であり、他に類を見ないものと考えられる。これまでの研究実績より本研究は遂行可能であり、SIRS および敗血症病態における頻脈性不整脈の治療として遺伝子治療を用いるという新しいコンセプトにより、得られた研究成果は国民の福祉に寄与するものと期待される。

本研究では、以上の学術的背景をもとに以下の仮説を明らかにすることを目的とする。

- SIRS および敗血症病態におけるイオンチャネルリモデリングの発生について miRNA の關与について検討する
- SIRS および敗血症病態における miRNA の発現変化について明らかにする。
- miRNA の発現に対する NO の關与について明らかにする。

これらにより、炎症性病態のみならず、加齢に伴って発生頻度が増加する心房細動の予防、治療方法の開発に対する知見も得られるものと期待される。

3. 研究の方法

(1) 動物モデルの作成

大腸菌内毒素である LPS をモルモット腹腔内に投与し、10 時間後に麻酔下に心臓を摘出し、実験に供した。

(2) Western blot によるチャネル構成蛋白の発現についての検討

Cav1.2, Kv11.1, Kv7.1 について, チャネル構成蛋白の発現における敗血症病態の影響について検討した。

(3) RT-PCR によるチャネル構成蛋白の発現についての検討

Nav1.5, Cav1.2, Kv11.1, Kv7.1 について, チャネル構成蛋白の発現における敗血症病態の影響について検討した。

(4) 敗血症病態における NO 過剰発現の有無についての検討

iNOS, eNOS の発現について, Western blot および RT-PCR により検討を行った。

(5) 免疫染色法によるチャネル発現, NO, およびニトロチロシン発現についての検討

(6) リアルタイム PCR により逆転写ポリメラーゼ連鎖反応と組み合わせ、摘出ラット心房筋内の miRNA 定量 (miRNA-1, let-7, 133, 126-3p, 30c および 26a) を試みた。

4. 研究成果

(1) チャネル構成蛋白発現についての検討

L 型カルシウムイオンチャネルを構成する Cav1.2 の発現はウェスタンブロット, リアルタイム PCR の双方において, LPS による敗血症病態で抑制が観察された。また遅延整流性カリウムチャネルを構成する Kv11.1 および 7.1 はウェスタンブロットにおいては発現の増大が観察されたが, リアルタイム PCR では変化が見られなかった。またこれらの変化は, 一酸化窒素合成阻害薬である L-NAME の適用により抑制された。

(2) miRNA 発現についての検討

1, let-7, 133, 126-3p, 30c および 26a については敗血症病態での発現にはバラツキが大きく, 一定の傾向は認められなかった。チャネル発現の変化に伴う傾向も認められなかった。

これらの結果から, 敗血症病態に伴う頻脈性不整脈に伴うイオンチャネル発現変化は, miRNA が直接関与している可能性は低いと推察された。一方で, miRNA の発現状態の観察においてリアルタイム PCR では結果が一定しないとの指摘もあり, 今後マイクロアレイによる分析など, 多方面からのアプローチが必要であると思われた。今回の研究からは, 敗血症病態においては, miRNA がチャネル発現を直接制御しているのではなく, 炎症性サイトカインなどの信号伝達経路を介して制御している可能性が高いことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. 畠山登 . WPW 症候群で起きた心房細動 . 症例検討-不整脈 . LISA 22(1) : 50-55, 2015. http://www.medsj.co.jp/books/products/detail.php?product_id=3421

査読無

2. Hatakeyama N, Matsuda N. Alert cell strategy: mechanisms of inflammatory response and organ protection. *Curr Pharm Des.* 2014;20(36):5766-78.

DOI: 10.2174/138161282036140912122809

査読有

3. 畠山登 . 敗血症患者の周術期循環管理 . 日本臨床麻酔学会誌 33(6): 5169-5169, 2013.

<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jjca/-char/ja/>

査読無

4. 畠山登 . 心血管系における Micro RNA の役割と今後の展望 . *Cardiovascular Anesthesia* 17(1): 79-81, 2013.

<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/-char/ja/>

査読無

5. Aoki Y, Hatakeyama N, Yamamoto S, Kinoshita H, Matsuda N, Hattori Y, Yamazaki M. Role of ion channels in sepsis-induced atrial tachyarrhythmias in guinea pigs.

Br J Pharmacol. 2012 ;166:390-400.

doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01769.x.

査読有

6. 畠山登 . 炎症と不整脈 . 循環制御 33(3): 170-176, 2012.

<http://www.jscm.jp>

査読無

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 畠山登 . 炎症と不整脈 . 第 36 回日本循環制御医学会総会, シンポジウム 炎症と周術期管理 . 2015 年 6 月 5 日, ウィンクあいち . 名古屋市 .

2. Kensuke Sakakibara, M.D., Hiroyuki Kinoshita, M.D., Kazuo Ando, M.D., Yoshitaka Yasuda, M.D., Guo-Gang Feng, M.D., Ph.D., Jiazheng Li, M.D., Noboru Hatakeyama, M.D., Ph.D., Yoshihiro Fujiwara, M.D., Ph.D., M.B.A. Activation of KCNQ Voltage Sensitive K⁺ Channels Exerts Vasodilation Resulting in Hypotension in Rats. 2014 ASA Annual meeting. October 14, 2014, New Orleans, U.S.A.

3. Hiroyuki Kinoshita, M.D., Ph.D., Yoshitaka Yasuda, M.D., Emi Nakamura, M.D., Guo-Gang Feng, M.D., Ph.D., Jiazheng Jiang,

M.D., Noboru Hatakeyama, M.D., Ph.D., Yoshihiro Fujiwara, M.D., Ph.D., M.B.A. Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibition Augments a Repressing Effect of Sevoflurane on Vasoconstriction. 2014 ASA Annual meeting. October 13, 2014, New Orleans, U.S.A.

4. Kensuke Sakakibara, M.D., Hiroyuki Kinoshita, M.D., Ph.D., Yukiko Mori, M.D., Kazuo Ando, M.D., Yoshitaka Yasuda, M.D., Noboru Hatakeyama, M.D., Ph.D., Yoshihiro Fujiwara, M.D., Ph.D. L-Kynurenine Causes Hypotension Via Vasodilation Mediated by KCNQ Voltage Sensitive K⁺ Channels in Rats. 2013 ASA Annual meeting. October 15, 2013. San Francisco, U.S.A.

5. Hiroyuki Kinoshita, M.D., Ph.D., Yoshitaka Yasuda, M.D., Yukiko Mori, M.D., Kazuo Ando, M.D., Kensuke Sakakibara, M.D., Noboru Hatakeyama, M.D., Ph.D., Yoshihiro Fujiwara, M.D., Ph.D. Superoxide Production Via NADPH Oxidase Reduces Vasodilator Effect of L-Cysteine in the Rat Mesenteric Artery. 2013 ASA Annual meeting. October 15, 2013. San Francisco, U.S.A.

6. 畠山登 . 敗血症患者の周術期循環管理 . 第 33 回日本臨床麻酔学会 シンポジウム 敗血症患者の周術期管理 . 2013 年 11 月 3 日 , ANA クラウンプラザ金沢 . 金沢市 .

7. 畠山登 . 全身性炎症症候群 (SIRS) と頻脈性不整脈 . 日本麻酔科学会第 60 回学術集会 , シンポジウム 周術期の不整脈 . 2013 年 5 月 24 日 , ポートピアホテル . 神戸市 .

8. Hiroyuki Kinoshita, M.D., Ph.D., Toshiharu Azma, M.D., Ph.D., Noboru Hatakeyama, M.D., Ph.D., Yoshihiro Fujiwara, M.D., Ph.D., Naoyuki Matsuda, M.D., Ph.D. Regulation of F-/G-Actin Ratio Reduces NADPH Oxidase Activity Caused by High Glucose in the Human Omental Artery. 2012 ASA Annual meeting. October 15, 2012. Washington DC, U.S.A.

〔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 なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

畠山 登 (HATAKEYAMA NOBORU)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 70251907