

令和元年5月24日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09064

研究課題名(和文) 次世代シーケンサーを用いた重症心不全における左室逆リモデリング予測因子の探索

研究課題名(英文) RNA-sequencing identifies novel myocardial biomarkers predicting left ventricular reverse remodeling in advanced non-ischemic heart failure

研究代表者

小林 欣夫 (Kobayashi, Yoshio)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：70372357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、非虚血性の重症心不全患者の左室心筋検体で次世代シーケンサーを用いたRNA-sequencingにより遺伝子発現を定量的に解析した。登録した17症例を左室逆リモデリングと呼ばれる心機能の改善を認めるか否かにより2群に分類し、2群間の発現変動遺伝子を同定することにより、左室逆リモデリング予測因子を網羅的に探索した。2群間のRNA発現の解析において、ミトコンドリア呼吸鎖に関連する遺伝子や、MAPK系を介してapoptosisに関与する遺伝子などが、左室逆リモデリングを認めない群で有意に発現亢進していた。

これらの結果をまとめ、論文投稿を行い、日本循環器学会学術集会などの学会で発表を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓移植や補助人工心臓を必要とするような重症心不全のうち、一部の症例は適切な治療により左室逆リモデリングと呼ばれる心機能の回復を呈し、これらの治療を回避することが可能となる。本研究で得られた結果より、心筋組織における遺伝子発現を次世代シーケンサーを用いて解析することで、左室逆リモデリングを呈する可能性があるかを予測することができ、これらの治療を回避できるか否かなど、重症心不全の治療方針を決定することにおいて重要な手がかりが得られる可能性がある。また、心不全の発症機序や左室逆リモデリングの機序についても今後の研究につながる手がかりが得られた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed RNA-sequencing with next generation sequencer using left ventricular myocardium of patients with non-ischemic, advanced heart failure. A total of 17 included patients were divided into two groups whether patients presented left ventricular reverse remodeling (LVRR) or not. Biomarkers predicting the possibility of LVRR were comprehensively searched by analyzing the differentially expressed genes (DEGs) between the two groups. In the 'non-RR' group, genes related mitochondrial respiratory chain, and apoptosis through mitogen-activated protein kinase cascade. We have submitted the results to some medical journals and presented at several annual meetings including the Japanese Circulation Society.

研究分野：循環器内科学

キーワード：左室逆リモデリング 重症心不全 RNA-sequencing 次世代シーケンサー 補助人工心臓

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

生活習慣の欧米化や高齢化などの影響により、本邦においても心不全の罹患率は増加傾向にある。とりわけ、拡張型心筋症に代表される、高度左心機能低下を伴った重症心不全は、遮断薬や ACE 阻害薬などの薬物療法、また心臓再同期療法(Cardiac Resynchronization Therapy, 以下 CRT)などの非薬物療法によりある程度の予後改善を得たものの、依然として生命予後は極めて悪く、また繰り返す再入院により医療経済上も問題となっている。そのような症例に対する治療法として心臓移植および補助人工心臓 (Ventricular Assist Device, 以下 VAD) 装着が適応となるが、さまざまな合併症を有する。

一方、一度心不全を発症した拡張型心筋症症例の中にも、心筋保護薬の投与、CRT の導入、あるいは VAD 装着による心負荷軽減などにより心機能の改善を認めることがある。いわゆる左室逆リモデリング (LV reverse remodeling, LVRR) である。左室逆リモデリングの可能性があるかどうかを事前に予測できることは、重症心不全患者を管理する上で非常に重要な情報を与えるものであるが、その詳細な機序や、どのような症例が左室逆リモデリングを起こすかを正確に予測することは既存の臨床 modality を用いても難しい。

そんな中、近年次世代シーケンサーが臨床医学の場において普及してきている。心疾患においても、心不全に関する疾患感受性遺伝子や、一部の特発性心筋症の原因遺伝子が同定されてきており、今後も新たな知見の発見が期待されているが、重症心不全における左室逆リモデリングを予測するための研究はこれまでのところ報告がない。次世代シーケンサーを用いた RNA-sequence は組織の全遺伝子発現を解析することが可能であり、左室逆リモデリングを制御する因子をより網羅的に探索することが可能となると考えられる。

## 2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究では重症心不全における左室逆リモデリングの可能性を、左室心筋組織より抽出した RNA から RNA-sequence により予測しうるバイオマーカーの同定を目的とした。さらに、得られた結果から左室逆リモデリングの分子生物学的機序の解明を試みた。

(1) 重症心不全の各症例について、血液検査、心臓超音波検査、MRI、病理など既存の各種検査手法などを用いて詳細な臨床的評価を行い、どのような症例が左室逆リモデリングを示す傾向があるか、関連のある因子についての臨床的検討を併せて行う。また左室逆リモデリングの可能性を最大限引き出すための集学的治療を標準化する。

(2) 重症心不全患者より心筋サンプルを採取後、最大限の治療により左室逆リモデリングを認めた症例と認めなかった症例の RNA 発現レベルを比較し、関連のある因子を同定する。

(3) それらの因子の末梢血中での発現を検討し、より簡便に測定できるバイオマーカーを探索する。

(4) 同定された因子の細胞内シグナル伝達経路の解析により、心機能低下や左室逆リモデリングに関わる機序を解明する。

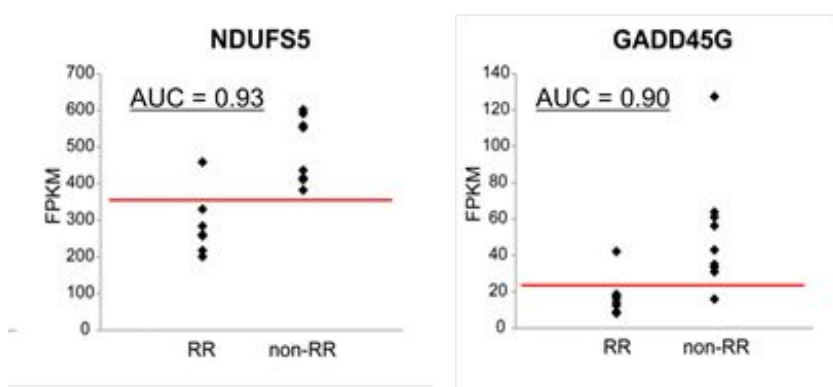
## 3. 研究の方法

本研究では、重症心不全患者の左室心筋サンプルから抽出される RNA を、次世代シーケンサーを用いて RNA-sequence を行った。一方で患者には従来の内服治療に加え、VAD や CRT を含めた最大限の治療を行い、6 か月および 12 ヶ月後に心臓超音波検査を行い左室逆リモデリングの有無を評価した。左室逆リモデリングを認めた群とそうでない群の各種臨床的所見とともに、RNA-sequence の結果から遺伝子発現や non-coding RNA の発現の相違を検討し、それぞれにつ

いて左室逆リモデリングを予測する因子の同定を試みた。

#### 4. 研究成果

当初目標としていた 20 症例のうち 17 症例が inclusion criteria を満たし解析を行った。8 症例で左室逆リモデリングを認め(RR 群)、9 症例で認めなかった(non-RR 群)。17 例中 10 例が VAD 装着を行った。合計 14,448 種類の RNA が検出され、そのうち 2 群間の RNA 発現の解析において、155 の発現変動遺伝子(Differentially Expressed Genes, DEGs)を同定した。non-RR 群において、ミトコンドリア呼吸鎖に関連する遺伝子と MAPK 系を介して apoptosis に関与する遺伝子、またリボソーム関連蛋白群が高度に発現亢進しており、Area Under the Curve(AUC)はそれぞれ 0.93, 0.90 であった。また、各種 Ribosomal Protein 群も発現亢進していた。これらの遺伝子が発現亢進していることが LVRR を呈しにくい因子、すなわち Biomarker となることが示唆された。



#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

Togo Iwahana, Sho Okada, Masato Kanda, Goro Matsumiya, Yoshio Kobayashi. RNA-sequencing Identifies Novel Myocardial Biomarkers Predicting Left Ventricular Reverse Remodeling in Advanced Non-Ischemic Heart Failure. 第 83 回日本循環器学会学術集会. 2019 年(横浜)

岩花 東吾、服部 憲幸、安部 隆三、織田 成人、小林 欣夫. Conversion from extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) to ventricular assist device (VAD) for patients with cardiogenic shock. 第 45 回日本集中治療医学会学術集会. 2018 年(千葉)

Togo Iwahana, Sho Okada, Goro Matsumiya, Yoshio Kobayashi. Mid-term Evaluation of Hemodynamics and Exercise Tolerance after Jarvik 2000 Left Ventricular Assist Device Implantation. The 26th Annual Meeting of the International Society for Mechanical Circulatory Support (ISMCS). 2018 年(東京)

岩花 東吾、岡田 将、橋本 理、渡邊 倫子、黄野 皓木、松宮 護郎、小林 欣夫. 「Jarvik2000 装着症例の遠隔期血行動態・運動耐容能に関する検討」第 55 回日本人工臓器学会大会. 2017 年(東京)

岩花 東吾、岡田 将、杉浦 淳史、橋本 理、黄野 皓木、柄澤 智史、安部 隆三、松宮 護郎、織田 成人、小林 欣夫. 「千葉大学病院における循環器内科・心臓血管外科・集中治療部の連携による重症心不全の治療戦略」日本集中治療医学会第 1 回関東甲信越支部学術集

会(シンポジウム). 2017年(さいたま)

岩花 東吾、岡田 将、渡邊 倫子、黄野 皓木、松宮 護郎、小林 欣夫. 「重症心不全症例の早期評価・迅速な心臓移植適応評価による植込型 VAD 装着術成績向上に向けての取り組み」第 20 回日本心不全学会学術集会. 2016 年(札幌)

Togo Iwahana, Sho Okada, Yoshio Kobayashi. Long Distance Air Repatriation under Intensive Care with Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO) Support. 24<sup>th</sup> Congress of the International Society for Rotary Blood Pumps (ISRBP). 2016 年(水戸)

〔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〕

なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：長谷川 洋

ローマ字氏名：Hasegawa Hiroshi

所属研究機関名：千葉大学

部局名：大学院医学研究院

職名：講師

研究者番号(8桁)：50375656

研究分担者氏名：岡田 将

ローマ字氏名：Okada Sho

所属研究機関名：千葉大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号(8桁)：50514725

研究分担者氏名：岩花 東吾

ローマ字氏名：Iwahana Togo

所属研究機関名：千葉大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号(8桁)：00789307

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。