

令和 元年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0313

研究課題名（和文）microRNA過剰発現ラットの作製とそれを用いた新しい不整脈発症機序の解明（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）MicroRNA overexpression to establish a new arrhythmia model for studying its molecular mechanism(Fostering Joint International Research)

研究代表者

森島 真幸 (MORISHIMA, Masaki)

徳島大学・病院・特任講師

研究者番号：40437934

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 9,200,000円

渡航期間： 8ヶ月

研究成果の概要（和文）：我々は、ヒト持続性心房細動患者の心房筋でmicroRNA-30d(miR-30d)が過剰発現することを発見しその発現は細胞内Ca²⁺過負荷により亢進されることを報告した。しかし、miR-30dの生体内における発現動態は明らかにされていない。そこで本研究では、心筋特異的miR-30d過剰発現ラット、並びに細胞内Ca²⁺過負荷モデルラットを作成し心臓組織（心房・心室）と循環血中（血漿）のmiR-30d発現量を解析することで、病態心におけるmiR-30dの発現増加メカニズムを明らかにすることを目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、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、我々が樹立した心筋特異的miR-30d過剰発現ラットを用いて生理学的解析を行うことで、AFの病因に関わる新たな因子の同定につながることを期待される。さらに、本研究で着目したmiR-30dがAFの病態を良好に反映するバイオマーカーとして、今後臨床応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Our previous study has shown that microRNA-30d(miR-30d) is up-regulated in cardiomyocytes with persistent atrial fibrillation (AF), in response to cellular Ca²⁺-overload. However, mechanisms for miR-30d up-regulation in AF cardiomyocytes have not been elucidated. In this study, we investigated the mechanism how microRNA-30d (miR-30d) involved in the development of AF pathogenesis, we established a novel cardio-specific miR-30d overexpressed rat. MiR-30d overexpressed rats showed more vulnerable and short life span compared with wild type rats. The correlation of miR-30d expression between plasma and atrium was positively indicated in those rats. These data proposed circulating miRNA-30d as promise biomarkers and therapeutic targets in AF.

研究分野：生理学

キーワード：microRNA 心房細動 イオンチャネル ミトコンドリア 遺伝子改変ラット

様式 F - 19 - 2

1. 研究開始当初の背景

(1) 心房細動 (AF) の発症や持続は、イオンチャネル遺伝子の発現異常による心筋電学的リモデリングが重要な原因となる。しかし、その詳細な成立機序は解明されていない。申請者らは、持続性 AF ヒト心房筋において microRNA-30d(miR-30d)が過剰発現することを発見した。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、実際に電気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うことで、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。本事業の先駆けとなるこれらの研究成果をもとに、心筋細胞における miR-30d の機能的意義についてさらなる解析を行うために、心筋特異的に miR-30d を過剰発現させた遺伝子改変ラットを作製し生理学的解析を行った。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事が期待される。

(2) 心筋特異的 miR-30d 過剰発現ラットの作製・継代を行うと同時に、miR-30d が病態心筋におけるミトコンドリア機能に対してどのような作用を示すかについて、新たな細胞培養システムを用いて評価する。我々は心房細動心筋における心筋細胞障害対策の鍵となるミトコンドリア機能に着目し、培養細胞を用いた生体外における実験系で、ストレス環境下にある心筋細胞のミトコンドリア機能を評価する系を作成する必要があると考えた。本研究では、心筋細胞のミトコンドリア機能評価の専門家である Drexel 大学の Harpreet Singh 博士と、心筋細胞を用いたバイオエンジニアリングの専門家の Yasha Kresh 博士の下で実験技術を学び、当プロジェクトに必須の心筋細胞評価系の構築を行った。

2. 研究の目的

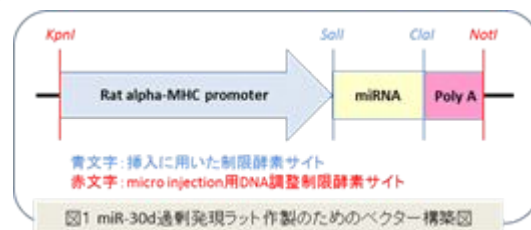
(1) miR-30d の生理作用、及び、その生合成過程や過剰発現トランスジェニックラットの表現系の解析などの未だ解明されていない miR-30d の基礎的問題を解決し、さらに miR-30d を核酸治療薬、あるいは診断マーカーとして臨床応用へと展開するための研究基盤を確立することを本研究の目的とする。

(2) ストレス環境下にある心筋細胞のミトコンドリア機能を生体外でより正確に評価する系を作成し、心筋梗塞後の心筋細胞障害対策の鍵となるミトコンドリアにおける標的分子の探索を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 心筋特異的 miR-30d 過剰発現ラットの作製 .

ユニテック社に心筋特異的 miR-30d 過剰発現ラットの作製を依頼し、心筋特異的遺伝子 alpha-MHC のプロモーター (5.4kb) の下流に miR-30d の前駆体を含む領域(682bp)を連結したベクターを構築した (図 1)。次にベクターをラットの受精卵へ injection し得られた個体から尻尾を採集しゲノム DNA を抽出後、genotyping を行い過剰発現の確認をした。(図 2) Founder ラット (F0) 獲得後 F1 ラットの 3 系統の導入コピー数をサザンブロットで確定し F1 ラット心臓において miR-30d が発現していることを確認した。



(2) 細胞内 Ca²⁺過負荷モデルラットの作製 .

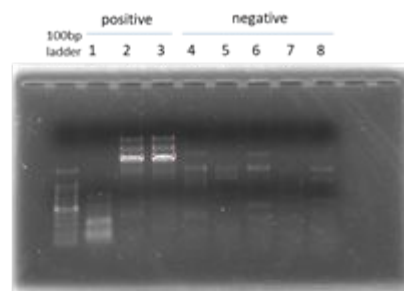
雄性 Wistar 系ラット(300-350g)の腹腔内に AngiotensinII (Ang II; 1.68 mg/kg/day)と Noradrenaline (NA; 5.4 mg/kg/day)を注入した浸透圧ポンプ(ALZET,2ML2)を植え込み、二週間持続投与した。投与前、投与一週間後、投与二週間後に tail-cuff 法により血圧測定を行い、薬剤が有効濃度であることを確認した。投与二週間後に、心エコー検査、採血を行い、心臓組織 (心房筋、心室筋) を採取した。

(3) Ang II 急性投与実験 .

雄性 Wistar 系ラット (300-400g) に Ang II (2 mg/kg/day) を腹腔内投与して 6 時間後に採血・心臓組織 (心房筋、心室筋) の採取を行った。 図 2. Genotyping の結果

(4) 心臓組織における 30d の発現解析 .

採取した組織を液体窒素で凍結・粉砕し、TRIzol(Invitrogen)で Total RNA を抽出した。10ng の Total RNA から TaqMan microRNA Reverse transcription Kit(ABI)により 30d と U6(internal control) の cDNA を合成した。TaqMan Universal Master Mix (ABI)を用いて microRNA 発現量を real-time



1: 当教室にてtailからゲノムDNA抽出 (0722)
2: 陽性 105 DNA (ユニテック社より譲渡)
3: 陽性 D201 DNA (ユニテック社より譲渡)
4: 陰性 101 DNA (ユニテック社より譲渡)
5: 陰性 102 DNA (ユニテック社より譲渡)
6: 陰性 103 DNA (ユニテック社より譲渡)
7: 陰性 104 DNA (ユニテック社より譲渡)
8: 陰性 105 DNA (ユニテック社より譲渡)

PCR により定量した。

(5) ラット血漿中における 30d 発現解析 .

EDTA 処理した血漿 250 μ l から microRNA Extractor SP kit (Wako) により small RNA 分画を抽出した。血漿中の 30d 発現量は上述と同様の方法で定量した。

(6) 初代培養ラット心筋細胞の単離と培養 .

Wistar 系ラット仔 (day 0-1) の心室筋を摘出し、酵素法により心筋細胞を単離した。心筋細胞の自動拍動を確認した後 Ang II (1 μ M)、NA (1 μ M) 及び BNP (1 μ M) を添加した培養液に交換して一定時間 (3, 6, 24 hr) 培養し、Total RNA の抽出を行った。

(7) 病態刺激後の心筋細胞における 30d の発現解析 .

QIAGEN 社の miRNeasy@Mini Kit を用いて心筋細胞から Total RNA を抽出した。病態刺激後の心筋細胞における 30d 発現動態の解析は上記 (4) と同様の方法で行った。

(8) 心筋細胞における BNP mRNA 発現解析 .

上述の方法により抽出した Total RNA 500 ng から Roche Transcriptor 1st strand cDNA Synthesis Kit を用いて cDNA を合成した。BNP mRNA 発現量は SYBR Premix Ex Taq (TAKARA) を用いて real-time PCR を行い定量した。

(9) miR-30d の心筋細胞導入と電気生理学実験.

異常発現する microRNA が心筋細胞の電気活動にどのような影響を及ぼすかを明らかにするために、Anti-miR miRNA inhibitor (Ambion 社) を用いたノックダウン実験や Pre-miR-miRNA molecule (Ambion 社) を用いた発現誘導実験により機能解析する。HEK293 細胞、及びラット心筋細胞に Lipofectamine を用いて microRNA を導入し、心筋細胞の興奮性を制御するかどうかをパッチクランプ法 (HEKA 社製パッチクランプワークステーション) により確認する。

(10) miR-30d 発現と心房細動発生の因果関係を明らかにするため、ラット頸静脈から miR-30d オリゴを injection し心電図を解析する。また、ラット作製のために構築した心筋特異的 miR-30d 過剰発現ベクターを大量精製し、ラットに injection して一過性のモデルを作製し心機能解析を行う。(DREXEL 大学)

(11) miR-30d 発現と心房細動発生の因果関係を明らかにするため、ラット頸静脈から miR-30d オリゴを injection し心電図を解析する。また、ラット作製のために構築した心筋特異的 miR-30d 過剰発現ベクターを大量精製し、ラットに injection して一過性のモデルを作製し心機能解析を行う。(DREXEL 大学)

(12) 生体環境により近い環境下における心筋細胞機能評価系の構築

miR-30d が障害を受けた心房筋のミトコンドリア機能を回復させるかについて、新しい細胞培養システムを用いて評価する。(DREXEL 大学)

4 . 研究成果

(1) 初代培養ラット心筋細胞に α MHC-30d vector を transfection した際の miR-30d 発現量の確認実験 . 心筋特異的 miR-30d 過剰発現ラット構築のために作成したプラスミドが、実際の細胞内で work するかどうかについて確認する実験を行った。初代培養ラット心筋細胞に同プラスミドを遺伝子導入すると、vector 濃度依存的に miR-30d 発現量が増加することが確認できた。vector 濃度 2-5 μ g になると死細胞が増えたため、1 μ g が適切な条件と考えられた。

α MHC-30d vector 1 μ g を心筋細胞に transfection することで miR-30d 発現量は 2 倍程度増加する結果が再現された。また、miR-30d の Target gene の発現の抑制も認められた (図 3)。

(2) 正常ラットの頸静脈から注入し ex vivo で心電図記録を行い不整脈の発生頻度を評価した。miR-30d 過剰発現プラスミドを投与した群では投与前後で心電図波形やパラメータに変化はなく不整脈の発生は認められなかった。

(3) 細胞内 Ca^{2+} 過負荷モデルラットを用いた検討 .

Ang II と NA の持続投与群では、投与後 1 週間から収縮期血圧の有意な上昇が確認され、Ang II と NA の投与量が有効濃度であることを確認した。解剖時の心体重量比は Ang II 群で有意に増加し肥大を呈していることが判明した。持続的に Ang II, NA を負荷したラットの心房筋では Ang II 群のみで 30d 発現量の有意な増加が認められた。また、Ang II の急性投与では心房筋の 30d 発現量は増加傾向にあった。血漿 Ang II により急性、及び持続投与では 30d の発現量を著しく増加させた。さらに、血漿中の 30d 発現量は心房筋の発現量と正の相関を示した (図 4)。

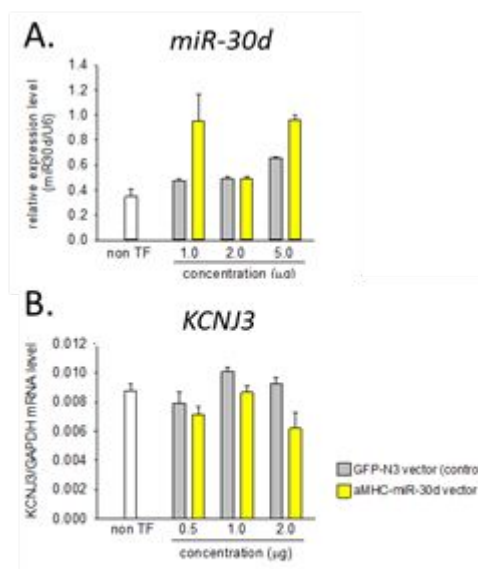


図3. miR-30d過剰発現プラスミド導入後の miR-30d発現量 (A)と標的遺伝子KCNJ3 mRNA発現量

(4) AngII, NE 負荷実験 (In vitro)

心筋細胞の培養液中に Ang II を添加すると 30d 発現量は 3, 6, 24 時間のすべての時間帯で有意に増加した。また、同サンプルで Ang II 刺激 6 時間、24 時間で BNP 発現量が有意に増加することを確認した。そこで、BNP が 30d 発現を増加させるかどうかについて検討を行ったところ、心筋細胞に BNP を作用させると、濃度依存的、時間依存的に 30d 発現量が増加することが判明した。このことから、Ang II 刺激(6, 24 h)による 30d 発現量の増加は BNP 産生を介する可能性が示唆された。

(5) ヒト心房筋における miR-30d 発現量解析

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 心房筋において、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。

(6) miR-30d 過剰発現、及びノックダウン実験

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(図 5)。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。

(7) 生体環境により近い環境下における心筋細胞機能評価系の構築

心筋特異的 miR-30d 過剰発現ラットの作製に際し、陽性個体の獲得には成功したもののラットの継代に予想外に時間を要すること、また実験に必要な数のラットの確保が難航していることから、in vitro による細胞機能評価系をより強化するための新たな細胞培養モデルを用いた解析を行った。心房細動発症のメカニズムの一端を解明するために、miR-30d が病態心筋のミトコンドリア機能に対してどのような作用を示すかについて、DREXEL 大学において新たに開発された初代培養細胞を用いた評価系により生体内の微細環境を模した心筋細胞培養システムを構築し、心房細動による酸化ストレスが心房筋ミトコンドリア機能障害を引き起こすメカニズムの解明を試みた。心筋の生理学的硬度を模したポリアクリルアミドゲル上で培養した心筋細胞は、酸化ストレスによる心筋ミトコンドリア障害をより正確にとらえることができた。さらに細胞内過負荷 (イオノフォア、タブシガルギン) AngII 並びに PKC 賦活剤などの刺激による心筋の自発的拍動の異常はゲル上の心筋細胞でより顕著にみられたが、miR-30d を過剰発現させた細胞ではみられなかった。以上の結果より、miR-30d は心筋細胞障害時に発現が亢進することで心筋保護作用を示す新たな分子である可能性が示唆された。

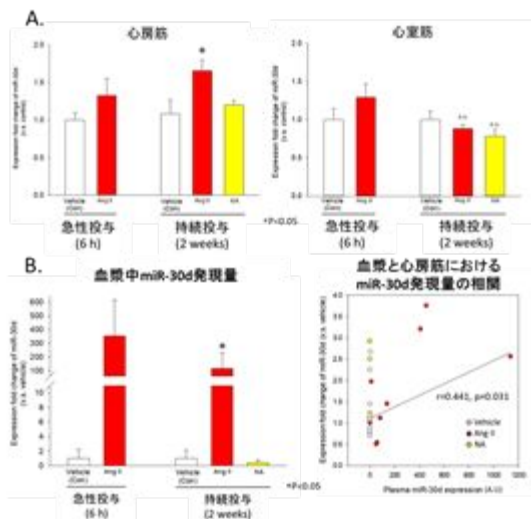


図4. AngII・NA投与ラットの心房、心室組織(A)、及び血漿における miR-30d 発現量(B). Ang II 持続投与により心房筋並びに血漿 miR-30d 発現量は有意に増加した。さらに、血漿中 miR-30d 発現量は、心房筋 miR-30d 発現量と正の相関を示した。

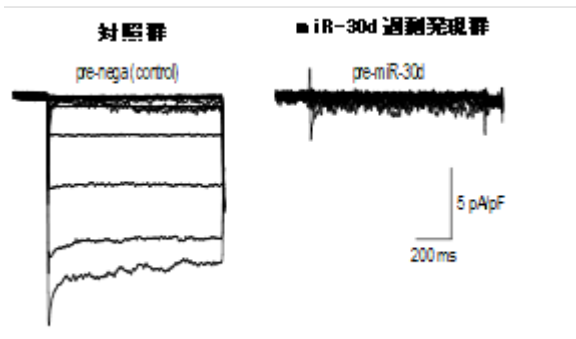


図 5. ラット心筋細胞におけるアセチルコリン感受性 K⁺チャネル電流 (I_{K,ACh}). 両群ともカルバコール (20 μM) 添加後の電流を示す。対照群; negative control オリゴ導入 (30 μM). miR-30d 過剰発現群; Pre-miR-30d 導入 (30 μM) 導入

(8) ストレス環境下の心筋ミトコンドリア機能解析

正常マウスから単離した心筋細胞を正常な心臓の硬度(15 kPa)を模したゲル上で培養すると、酸化ストレス負荷により CLIC4 発現の増加、CLIC5 発現の低下、さらにミトコンドリア膜電位の低下と細胞骨格構造の崩壊が顕著に認められた。一方、CLIC4KO マウスの心筋細胞では、高グルコースによるミトコンドリア膜電位の低下や細胞骨格の崩壊は認められず、CLIC5 発現量も減少しなかった。さらに、CLIC4KO マウスの心筋細胞では、高グルコースによる自動拍動の低下は認められなかった。以上の結果から、我々はストレス環境下にある心筋細胞のミトコンドリア機能を生体外でより正確に評価する系の作成に成功し、糖尿病性心筋障害に対して保護的に働く新たなミトコンドリア分子 CLIC4 を発見した。

本研究から、Ang II は心房筋、血漿中の 30d 発現を増加させる因子であることがわかった。30d 発現量増加の経路としては、RAS 活性化による急性作用と BNP の産生を介した亜急性・長期作用のふたつの経路が存在することが初めてわかった。さらに、血圧増加という単独因子では 30d 発現は変化しないことも示された。また、Ang II 負荷ラットの血中 30d 発現量は心房筋における発現量を反映することが、今回の研究で初めて明らかになった。このことから、先行研究で発見したヒト心房細動心筋で過剰発現する 30d は、心房細動の発症予測や持続を反映するバイオマーカーとして今後、有用となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Morishima M, Horikawa K, Funaki M. Cardiomyocytes cultured on mechanically compliant substrates, but not on conventional culture devices, exhibit prominent mitochondrial dysfunction due to reactive oxygen species and insulin resistance under high glucose. PLOS ONE 2018 Aug 23;13(8):e0201891. doi: 10.1371/journal.pone.0201891. 査読有
2. Masuda K, Takanari H, Morishima M, Ma F, Wang Y, Takahashi N, Ono K. Testosterone-mediated upregulation of delayed rectifier potassium channel in cardiomyocytes causes abbreviation of QT intervals in rats. J Physiol Sci. 68(6): 759-767, 2018. doi: 10.1007/s12576-017-0590-4. 査読有
3. Morishima M, Iwata E, Nakada C, Tsukamoto Y, Takanari H, Moriyama M, Miyamoto S, Ono K. Atrial fibrillation-mediated up-regulation of miR-30d regulates myocardial electrical remodeling of G-protein-gated K⁺ channel, I_{K,ACh}. Circ J. 80(6):1346-1355, 2016. doi: 10.1253/circj.CJ-15-1276. 査読有
4. Ma F, Takanari H, Masuda K, Morishima M, Ono K. Short- and long-term inhibition of cardiac inward-rectifier potassium channel current by an antiarrhythmic drug bepridil. Heart Vessels Jul;31(7):1176-1184, 2016. doi: 10.1007/s00380-015-0762-1. 査読有

[学会発表](計 5 件)

1. Masaki Morishima, Kazuki Horikawa, Makoto Funaki. Development of in vitro NASH Model with Mechanically Compliant Substrate. 78th America Diabetes Association 第 78 回米国糖尿病学会、2018/6/22-25, (米国オーランド)
2. 森島真幸、堀川一樹、船木真理. 生体環境に類似した肝細胞培養システムを利用した非アルコール性脂肪肝炎の in vitro モデルの作成. 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会 2018/5/23-25 (東京国際フォーラム、東京都)
3. Masaki Morishima, Kazuki Horikawa, Makoto Funaki. Mechanically Physiological Microenvironment Sensitizes Primary Cardiomyocytes to Glucotoxicity; New In Vitro Diabetic Heart Research Model. 第 77 回米国糖尿病学会、2017/6/9-13, (米国サンディエゴ)
4. 森島真幸、堀川一樹、山崎幸、堤理恵、阪上浩、船木真理. 生体環境に類似した心筋細胞培養システムを用いた高グルコース負荷応答の評価. 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会 2017/5/18-20, (名古屋国際会議場、愛知県名古屋市)
5. 岩田英理子、森島真幸、高成広起、宮本伸二、小野克重. ヒト心房細動心筋において過剰発現する miR-30d の機能解析. 第 26 回日本病態生理学会 2016/8/5-7, (金沢医科大学、石川県河北郡内灘町)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)

名称: 細胞の in vivo での特性を反映した細胞の応答の評価

発明者: 森島真幸、船木真理

権利者: メカノジェニック株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2017-074020

出願年月日: 2017 年 3 月 15 日

国内外の別： 国内

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：ハープリート シン

ローマ字氏名：Harpreet, Singh

所属研究機関名：米国 Drexel University

部局名：College of Medicine, Department of Pharmacology and Physiology

職名：Associate professor

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。