

令和元年6月12日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09462

研究課題名(和文) 血清マイクロRNAプロファイリングによる新たな心房細動の臨床病態評価法の確立

研究課題名(英文) Intracardiac/extracardiac circulating microRNA profiling in atrial fibrillation -cardiac specific biomarkers for atrial remodeling-

研究代表者

原田 将英 (Harada, Masahide)

藤田医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70514800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：カテーテルアブレーション治療を予定された心房細動(AF)患者と発作性上室頻拍症患者(対照群)から冠状静脈血(心臓特異的な現象を反映)と末梢血を採取し、定量PCRと次世代シーケンサーを用いて血中マイクロRNA(miRNA)の発現を解析した。冠静脈血においてAF群と対照群との間で発現差が大きく、末梢血においてもその発現差が反映されているmiRNAをバイオマーカーの候補として特定した。そして、血中miRNAの発現プロファイリングによる、新たなAFの臨床病態評価法を考案した。現在、AFに対する治療効果、AFの病態の進行、合併症の発症などに対する本評価法の予測能を前向きに検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血中miRNAによる新たなAFの評価法が確立されれば、病態に基づいた個別化医療が実現できる可能性がある。そして、AFの治療効果、病態の進行、合併症の発症などが正確に予測できるようになれば、治療成績や生命予後を劇的に改善させる可能性がある。また、臨床指標を用いた病態評価法は、基礎研究でのmiRNAの新知見を臨床的に確認するツールとなり、学術的な意義も極めて大きい。AFは実臨床で最も頻度の高い不整脈であり、本研究によってAFの臨床マネージメントが革新的に進歩すれば、社会的、医療経済的な貢献度は計り知れない。

研究成果の概要(英文)：The blood samples were collected from the coronary sinus (CS, reflecting cardiac phenomena more specifically) and the central venous (CV) in patients with and without atrial fibrillation (AF); the plasma expression of microRNAs (miRNAs) was measured using quantitative PCR and next generation sequencer (NGS). We identified miRNAs that showed significant differences in the plasma expression between patients with and without AF in the CS samples. Among them, we focused on miRNAs that also showed similar expression differences in the CV samples; these were candidates for the clinical biomarkers. We created the novel miRNA-based method to assess AF pathophysiology and prospectively evaluate the efficacy in terms of whether it can predict therapeutic outcomes, disease progression, and adverse event risk.

研究分野：循環器分野

キーワード：マイクロRNA 心房細動 心房リモデリング

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

1. 研究開始当初の背景

心房細動 (Atrial Fibrillation, AF) は、心不全や脳梗塞を合併し生活の質や生命予後を著しく悪化させる。AF の病態には、心房の細胞・組織レベルの機能的・構造的な変化である心房リモデリングが重要な役割を果たす。AF そのものや加齢・生活習慣病・基礎疾患などによる病態刺激を背景にして、心房の線維化や拡大 (構造的リモデリング)、イオンチャネルの発現・機能変化による電気的特性変化 (電气的リモデリング)、細胞内 Ca^{2+} 動態の異常による収縮障害 (収縮リモデリング)、自律神経活性化変化など様々な表現型の心房リモデリングが進行し、AF の発生と維持を促す。心房リモデリングの原因となる病態刺激は多因子かつ複雑であり、その程度も患者ごとに異なる。治療成績の改善には、患者の病態に基づいた個別化医療が不可欠だが、心房リモデリングを正確かつ簡便に評価する方法は臨床的に確立されていない。

マイクロ RNA (miRNA) は 20-30 塩基の非翻訳 RNA であり、相補的な遺伝子配列をもつ標的 mRNA に結合して翻訳を抑制することで、タンパク質の発現を負に制御する。miRNA は疾患特異的に発現が変化して病態に関与する。心房リモデリングの様々な過程においても miRNA による制御が基礎研究で証明され、AF の病態を解明する上で極めて重要な分子と考えられている。細胞内で病態を制御する miRNA は血中にも遊離しており、血清の発現量が病態を反映するためバイオマーカーとしての有効性も期待されている。

我々は心房リモデリングに関与する複数の miRNA をバイオマーカーとして測定し、そのプロファイルを解析することで、複雑な AF の病態を評価できる可能性があると考えた。臨床的に AF の病態を評価できれば、個別化医療につながり治療成績が飛躍的に改善する可能性がある。

2. 研究の目的

上記を踏まえ、本研究は心房リモデリングの病態機序の背景にある複数の血中 miRNA を測定し、発現プロファイルを解析することで病態に基づく新たな心房リモデリングの評価法を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 定量 PCR 法による既知の miRNA の発現プロファイリングの評価

カテーテルアブレーションが予定された AF 患者と非 AF 患者 (発作性上室頻拍症、対照群) から、心筋焼灼前に心臓特異的な現象を反映する冠状静脈血 (CS) と臨床バイオマーカーの評価に用いる末梢血 (中心静脈血、CV) を採取する。miRNA は全身の臓器で発現していることから、CV 検体では非心臓由来の miRNA も混在していることが想定される。このため我々は、CS 検体において AF 群と対照群で発現差を認め、CV 検体においてもその発現差が反映されている miRNA を心臓特異的なバイオマーカーの候補と考えた。このため、第一に基礎研究で AF の病態との関連が報告されている遺伝子に関して、CS 検体と CV 検体から small RNA を抽出し (miRNeasy Serum/Plasma Kit、QIAGEN 社) 定量 PCR 法 (TaqMan MicroRNA Assays、Applied Biosystems 社) を用いて血中 miRNA 発現を比較する。

(2) 次世代シーケンサー (NGS) を用いた血中 miRNA の網羅的解析

NGS を用いた網羅的解析は各検体間の miRNA 存在量を標準化するため事前にスパイクイン RNA を添加することにより核酸抽出、ライブラリ作成、シーケンシング工程でのバイアスをノーマライズすることが可能となった。マイクロアレイ DNA チップ解析と比較して定量化にも優る評価法と考えられる。現在、NGS の汎用性が高いとは言えないが、近い将来コストダウンが図られ実臨床でも使用できるようになる可能性が高い。このため実臨床での評価に応用するにあたって、NGS を用いた血中 miRNA の網羅的解析を試みる (大阪大学との共同研究)。CS 検体と CV 検体から small RNA を抽出し、ライブラリを作成後 (NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina、NEB 社) アダプターダイマー (約 120bp) を除く為に電気泳動によるサイズセレクションを行い、NGS (MiSeq、Illumina 社) を用いた RNA シーケンスを行う (目標リード数: 約 100 万、50bp シングルエンドリード)。CS 検体において AF 群と対照群の間で発現差が大きく、その差が CV 検体でも反映されている血中 miRNA を特定する。さらに、NGS で特定された miRNA の発現は定量 PCR 法でも測定し結果の再現性を確認する。

(3) 血中 miRNA 発現に基づく AF の病態評価法と心房リモデリングの定量化法の構築

上記の定量 PCR、NGS で同定された miRNA に関して、臨床評価による心房リモデリングの程度と個々の miRNA の発現量との相関性を解析し、特定のリモデリング (電气的リモデリング、構造的リモデリング、収縮リモデリング、自律神経リモデリング) を反映する miRNA をバイオマーカーの候補とした。複数の候補 miRNA の発現量やパターンの解析をおこない、そのプロファイルに基づいて新たな心房リモデリングの評価法、定量化法を構築する。

(4) 血中 miRNA のプロファイルに基づく評価法の有効性の評価

血中 miRNA のプロファイリングによって、AF 患者における治療効果、病態の進行、合併症の

発症などを予測できるかを前向きに評価する。

4. 研究成果

(1) 定量 PCR 法による既知の miRNA の発現プロファイリングの評価

AF の病態の中でも心房線維化を中心とした構造的リモデリングは特に重要であり、線維化関連 miRNA (miR-21, miR-26a, miR-29a, miR-133a) の発現解析を行った。CS 検体においては、血中 miR-21, miR-26a, miR-29a, miR-133a の発現が、対照群と比較して AF 群で有意に低下していた。一方、CV 検体においても血中 miR-21, miR-26a, miR-29a の発現が、対照群と比較して持続性 AF 群で低下していた。miR-1, miR-26a, miR-328, miR-499 はイオンチャネルタンパクを制御することが報告されており、miR-150 は AF の病態である炎症反応との関連が報告されている。これらの miRNA に関して、CS 検体において AF 群と対照群との間で発現差を認め、CV 検体でも共通した変化を認めたことからバイオマーカーの候補となりうることが示唆された。

(2) NGS を用いた血中 miRNA の網羅的解析

NGS を用いた RNA シーケンシングを施行し 845 の miRNA を検出した。既知の病態関連遺伝子 (miR-26, miR-133 など) に加えて、過去に AF の病態との関連が報告されていない miRNA も数多く抽出された。とりわけ、未報告 miRNA のなかでも miR-20, miR-330, miR-204 は CS 検体において AF 群と対照群との間で発現差が大きく、CV 検体においても共通の発現差を認めたことからバイオマーカーの候補になり得ると考えた。さらに、これらの遺伝子に関しては別の患者群の検体を用いて定量 PCR 法で再度測定し、NGS の結果の妥当性を確認した。本結果から将来的に血中 miRNA のプロファイリングに NGS が有用である可能性が示唆された。

(3) 血中 miRNA に基づく AF の病態評価法と有効性の評価

バイオマーカーの候補となる個々の miRNA の発現と心房リモデリングと関連する臨床指標 (心エコーや電気生理検査など) との相関性を解析し、候補 miRNA 群の発現パターンに基づいて心房リモデリングの病態表現形 (線維化主体か電気特性変化主体かなど) や心房リモデリングの程度の評価法を作成した。現在、新たな患者群から血液検体を採取し、miRNA 群の発現プロファイルを解析することによって、AF の治療効果、病態の進行、合併症の発症などを予測できるかどうかを前向きに検証している。また、AF の病態との関連が報告されていない miRNA に対しては基礎実験による機能解析の準備を進めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Kawai M, Harada M (Corresponding Author), Motoike Y, Koshikawa M, Ichikawa T, Watanabe E, Ozaki Y. Impact of serum albumin levels on supratherapeutic PT-INR control and bleeding risk in atrial fibrillation patients on warfarin: A prospective cohort study. *Int J Cardiol Heart Vasc.* 2019;22:111-116. doi: 10.1016/j.ijcha.2019.01.002. (査読有)

2. Harada M, Koshikawa M, Motoike Y, Ichikawa T, Sugimoto K, Watanabe E, Ozaki Y. Left Atrial Appendage Thrombus Prior to Atrial Fibrillation Ablation in the Era of Direct Oral Anticoagulants. *Circ J.* 2018;82:2715-2721. doi: 10.1253/circj.CJ-18-0398. (査読有)

3. Fujiwara W, Kato Y, Hayashi M, Sugishita Y, Okumura S, Yoshinaga M, Ishiguro T, Yamada R, Ueda S, Harada M, Naruse H, Ishii J, Ozaki Y, Izawa H. Serum microRNA-126 and -223 as new-generation biomarkers for sarcoidosis in patients with heart failure. *J Cardiol.* 2018;72:452-457. doi: 10.1016/j.jjcc.2018.06.004. (査読有)

4. Harada M, Melka J, Sobue Y, Nattel S. Metabolic Consideration in Atrial Fibrillation-Mechanistic Insights and Therapeutic Opportunities- *Circ J.* 2017;81:1749-1757. doi: 10.1253/circj.CJ-17-1058. (査読有)

5. Takemoto Y, Horiba M, Harada M, Sakamoto K, Takeshita K, Murohara T, Kadomatsu K, Kamiya K. Midkine Promotes Atherosclerotic Plaque Formation Through Its Pro-Inflammatory, Angiogenic and Anti-Apoptotic Functions in Apolipoprotein E-Knockout Mice. *Circ J.* 2017;82:19-27. doi: 10.1253/circj.CJ-17-0043. (査読有)

6. Tadevosyan A, Xiao J, Surinkaew S, Naud P, Merlen C, Harada M, Qi X, Chatenet D, Fournier A, Allen BG, Nattel S. Intracellular angiotensin-II interacts with nuclear angiotensin receptors in cardiac fibroblasts and regulates RNA synthesis, cell proliferation, and collagen secretion. *J Am Heart Assoc.* 2017 Apr 5;6(4). pii: e004965.

doi: 10.1161/JAHA. 116.004965. (査読有)

7. Sobue Y, Watanabe E, Ichikawa T, Koshikawa M, Yamamoto M, Harada M, Ozaki Y. Physically triggered Takotsubo cardiomyopathy has a higher in-hospital mortality rate.

Int J Cardiol. 2017;235:87-93.

doi: 10.1016/j.ijcard.2017.02.090. (査読有)

8. Watanabe E, Kiyono K, Matsui S, Somers VK, Sano K, Hayano J, Ichikawa T, Kawai M, Harada M, Ozaki Y. Prognostic Importance of Novel Oxygen Desaturation Metrics in Patients With Heart Failure and Central Sleep Apnea. J Card Fail. 2017;23:131-137.

doi 10.1016/j.cardfail.2016.09.004. (査読有)

[学会発表] (計 13 件)

1. Harada M, Okuzaki D, Takeda J, Motoike Y, Koshikawa M, Watanabe E, Ozaki Y. Next Generation Sequencing Reveals Intra cardiac/Extra cardiac MicroRNA Transcriptomes in Atrial Fibrillation. American Heart Association Scientific Session 2018, Chicago, IL, USA, 2018.

2. Harada M. Current Status of Molecular Study in AF: From Basic Mechanisms to Translational Potential.

The 11th Asian Pacific Heart Rhythm Society, Taipei, Taiwan, 2018.

3. Harada M. Metabolic Consideration in Atrial Fibrillation: Mechanistic Insight And Therapeutic Opportunities.

The 11th Asian Pacific Heart Rhythm Society, Taipei, Taiwan, 2018.

4. Harada M. MicroRNA in Atrial Fibrillation: from Basic Mechanism to Translational Potential.

The 11th Asian Pacific Heart Rhythm Society, Taipei, Taiwan, 2018.

5. Harada M, Motoike Y, Asami F, Takeda J, Ichikawa T, Koshikawa M, Watanabe E, Ozaki Y. Left Pulmonary Vein-dependent Electrophysiological Heterogeneity Underlies Localized Reentry and Atrial Fibrillation Provoked by Single Extra Stimulation: Implications of Anatomical Characteristics in Electrophysiology-.

Heart Rhythm 2018, Boston, MA, USA, 2018.

6. Harada M, Okuzaki D, Takeda J, Motoike Y, Koshikawa M, Ichikawa T, Watanabe E, Ozaki Y. Next Generation Sequencing Reveals Intra-cardiac/Extra-cardiac Circulating MicroRNA Transcriptomes in Atrial Fibrillation.

The 82nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Osaka, Japan, 2018.

7. Harada M, Koshikawa M, Motoike Y, Makino T, Ichikawa T, Kawai M, Watanabe E, Ozaki Y. Thrombolytic Efficacy of Dabigatran in Patients Undergoing Atrial Fibrillation Ablation -Peri-procedural Left-atrial Thrombus in the Era of Direct Oral Anticoagulants-.

Heart Rhythm 2017, Chicago, IL, USA, 2017.

8. Harada M, Motoike Y, Makino T, Koshikawa M, Ichikawa T, Kawai M, Watanabe E, Ozaki Y. Intracardiac and Extracardiac Expression of Pro-fibrotic MicroRNAs in Atrial Fibrillation -Implication for Cardiac Specific Biomarkers for Atrial Remodeling-.

The 81st Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Kanazawa, Japan, 2017.

9. Harada M. Human LA and PV Electrophysiology in AF –clinical implication for the pathophysiology-
The 10th Asian Pacific Heart Rhythm Society 2016, Seoul, Korea, 2016.

10. Harada M. MicroRNA as potential therapeutic target and biomarkers for atrial fibrillation.

The 10th Asian Pacific Heart Rhythm Society 2016, Seoul, Korea, 2016.

11. Harada M, Matsuo C, Motoike Y, Makino T, Koshikawa M, Ichikawa T, Kawai M, Watanabe E, Ozaki Y. Intracardiac and extracardiac expression of pro-fibrotic microRNAs in atrial fibrillation -implication for cardiac specific biomarkers for atrial remodeling-

European Society of Cardiology Congress 2016, Roma, Italy, 2016.

12. Harada M, Motoike Y, Fujiwara A, Makino T, Koshikawa M, Ichikawa T, Kawai M, Sawasaki K, Muto M, Murohara T, Watanabe E, Ozaki Y. Shortening of Effective Refractory Period with Conduction Slowing in Left Pulmonary Vein Increases Vulnerability to Paroxysmal Atrial Fibrillation.

Heart Rhythm 2016, San Francisco, CA, USA, 2016.

13. Harada M, Motoike Y, Makino T, Koshikawa M, Ichikawa T, Kawai M, Watanabe E, Ozaki Y. Serum MicroRNA26a Levels Progressively Decrease during AF Development in Coronary Vein Blood Samples.

Heart Rhythm 2016, San Francisco, CA, USA, 2016.

〔図書〕(計 2件)

原田将英

心房細動と心房リモデリング - 病態機序とマイクロ RNA の関与 - Bio Clinica. 2018;33(12):58-65. 北隆館

原田将英、渡邊英一

心房細動 最新医学 別冊 診断と治療の ABC (山下武志 企画)、心房細動における血栓塞栓症予防、p131-140、最新医学社、2018年

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○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

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 奥崎 大介

ローマ字氏名: Daisuke Okuzaki

所属研究機関名: 大阪大学

部局名: 微生物研究所

職名: 助教

研究者番号(8桁): 00346131

研究分担者氏名: 尾崎 行男

ローマ字氏名: Yukio Ozaki

所属研究機関名: 藤田医科大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 50298569

研究分担者氏名：渡邊 英一

ローマ字氏名：Eiichi Watanabe

所属研究機関名：藤田医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：80343656

(2)研究協力者

研究協力者氏名：越川 真行

ローマ字氏名：Masayuki Koshikawa

※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。