

令和元年6月24日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10641

研究課題名(和文)心房細動がもたらす心房筋リモデリングとバイオマーカーとしてのmicroRNAの解明

研究課題名(英文)Elucidation of microRNA as a biomarker related to structural remodeling on atrial fibrillation

研究代表者

藤井 正大 (FUJII, MASAHIRO)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60297926

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)：心房細動に対し弁膜症が合併した症例では外科治療の際にメイズ手術が併施されるが、メイズ手術後に洞調律維持症例と心房細動再発症例とでは左心耳における病理組織学的変化に有意差があると報告されてきた。この2グループの切除された左心耳におけるmicroRNA発現に違いがあるかを検討することを目的として、まず左心耳のホルマリン固定パラフィンブロックからRNA抽出が可能であることを実証した上でRNAの定量を行った。さらに、7検体(洞調律群4例心房細動群3例)の網羅的アレイ解析を行った。心房細動群においてup-regulationしている変動遺伝子は、TNNC1・PDLIM5を含め491遺伝子であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでも心房細動に特徴的なmicroRNAの研究報告がみられるが、左心耳のホルマリン固定パラフィンブロックからRNAが抽出可能であることが初めて示された。また、メイズ手術後に洞調律維持症例と心房細動再発症例とでは左心耳における病理組織学的リモデリング変化に有意差があると報告されてきたが、これら2グループの切除された左心耳においてRNA発現にupもしくはdown-regulationしている変動遺伝子があることが示された。今後の検討により、メイズ手術後の心房細動再発のリスク因子となるmicroRNAの同定が期待される。

研究成果の概要(英文)：In case of valvular disease complicated for atrial fibrillation, maze procedure is performed at the time of surgery. However, some have maintained sinus rhythm and others have occurred recurrence of atrial fibrillation after maze operation. In histopathological changes in the left atrial appendage, it has been reported that there is a significant difference. For the purpose of examining microRNA expression, it was firstly demonstrated that RNA extraction was possible from formalin fixed paraffin block of the resected left atrial appendage. In addition, after RNA quantification, a comprehensive microarray analysis of seven specimens (four sinus rhythm group and three atrial fibrillation group) was performed. The up-regulated variable genes in the atrial fibrillation group were 491 genes including TNNC1 and PDLIM5.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：マイクロRNA 心房細動 左心耳

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

1. 研究開始当初の背景

2013年には4人に1人が65歳以上という超高齢社会を迎えた我が国においてQOLの維持は重要な命題である。心原性脳梗塞を引き起こす心房細動は、持続性不整脈の中で最も頻度が多く(持続性不整脈全体の約2/3)、高齢者になると心房細動の発症率が飛躍的に上昇し、70歳以上の約5%、80歳代にいたってはほぼ9%に及ぶこと(Kannel, *Am J Cardiol*, 1998; 82: 2N-9N)が報告されており、心房細動の予防・治療戦略の確立が急務となっている。心房細動は心房に負荷がかかる状態で発症しやすいと言われるが、負荷がなくても発症するケースもみられ最近では遺伝的要因が指摘され、心房細動関連遺伝子の報告がなされている(Ellinor, *Nat Genet*, 2012;44:670-5)。核内で合成された pre-miRNA は細胞質へ輸送され約22塩基の1本鎖RNA (microRNA) となり、目的とする mRNA の3'-非翻訳領域へ相補的に結合することで直接作用する。近年バイオマーカーとして知られる microRNA を用いた研究が盛んで、心房細動を regulate する microRNA の存在(Wang, *Cardiovasc Res*, 2011;89:710-21)も明らかとなっている。心房細動の要因は様々で、電気的リモデリングや構造的リモデリング、カルシウムハンドリングなどそれぞれにトリガーとなる microRNA が想定される(Kim, *Transl Res*, 2013;161:381-92)。これまではマウスやブタなど動物実験が主であり、ヒト組織では右心耳の切除標本を対象とした研究報告がある(Nishi, *PLoS One*, 2013;8:e73397)。弁膜症の中でも僧帽弁疾患に心房細動の合併が多く、カテーテルアブレーション治療も肺静脈隔離など左心房主体に行われる。左心耳自体が心房細動の起点となる報告もある(Di Biase, *Circulation*, 2010;122:109-18)。最近では、左心耳への注目も集まり、両心房間の比較やミトコンドリア機能及び心房リモデリングに着目した研究が進んでいる(Slagsvold, *Physiol Rep*, 2014;2 pii:e12124)。

2. 研究の目的

心房細動を合併した弁膜症患者の心臓手術では、心房細動手術(メイズ手術)が併施されることが多いが、この時血栓予防のために左心耳を切除する。この左心耳標本を利用してバイオマーカーとなりうる microRNA の発現を分析する。まず、保存されている左心耳ホルマリン固定パラフィン標本から質の高い RNA が抽出できるかを検証する。次に網羅的かつ定量的発現プロファイル比較解析を行う。最後に、発現している microRNA と病理組織学的診断による心房筋リモデリング変化(線維化・肥大・核不整など)との間に関連性があるかを検証する。

3. 研究の方法

軸菌ら(研究分担者)が既に甲状腺癌を対象とした研究で確立している(Jikuzono, *Int J Oncol*, 2013; 42: 1858-68)ホルマリン固定パラフィンブロックからの microRNA を抽出する方法を術中に切除された左心耳標本に応用した。

対象症例の抽出

心房細動を合併した弁膜症手術を受けた患者群のうち心房細動手術(メイズ手術)を併施した患者をリストアップする。これら対象の臨床情報を収集し、追跡調査で得られた心房細動の再発の有無を踏まえて、洞調律維持(SR)群と心房細動(AF)再発群の2群に分類する。

RNA 抽出の可否の検討および RNA 定量

左心耳のホルマリン固定パラフィンブロックを用いた解析のための最適条件を設定し、リストアップされたもののうち数例に対して予備実験を行う。10µmに薄切した標本から RNA 抽出キット NucleoSpin total RNA FFPE XS (タカラバイオ)を用いて RNA を抽出し、

吸光度測定を行った後に濃度調整し，PCR を行う．RNA が抽出可能であれば，対象 18 例の RNA 定量を行う．左心耳のホルマリン固定パラフィンブロックから NucleoSpin total RNA FFPE (MN) を用いて RNA 抽出を行い，BioSpec-nano (SHIMADZU) による吸光度を測定し，次に QuantiFluor RNA System (Promga) にて RNA 量の定量を行う．

次世代アレイによる網羅的解析

RNA の抽出量が一定以上確認された検体を用いて，全ての RNA 分子（トランスクリプト）の発現変動について次世代アレイであるタカラバイオ社で Clariom D を用いて網羅的に解析する．

心房筋リモデリング変化の病理組織学的検討

斎藤ら（研究分担者）が以前報告している（Saito, Circ J, 2007; 71: 70-8）手法を用いて病理組織学的診断による心房筋のリモデリング変化（cardiomyocytes, nuclei, intercellular fibrosis, fatty infiltration, endocardial thickening, the volume of smooth muscle cells in the endocardium）のうち intercellular fibrosis に着目しスコア化を行う．

4．研究成果

対象症例の抽出

心房細動を合併した弁膜症手術を受けた患者群のうち心房細動手術（メイズ手術）を併施した患者のうち長期遠隔期の追跡調査と病理検体が利用可能であった 18 例をリストアップした．これら対象の内訳は洞調律維持（SR）群 11 例と心房細動（AF）再発群 7 例．

RNA 抽出の可否の検討

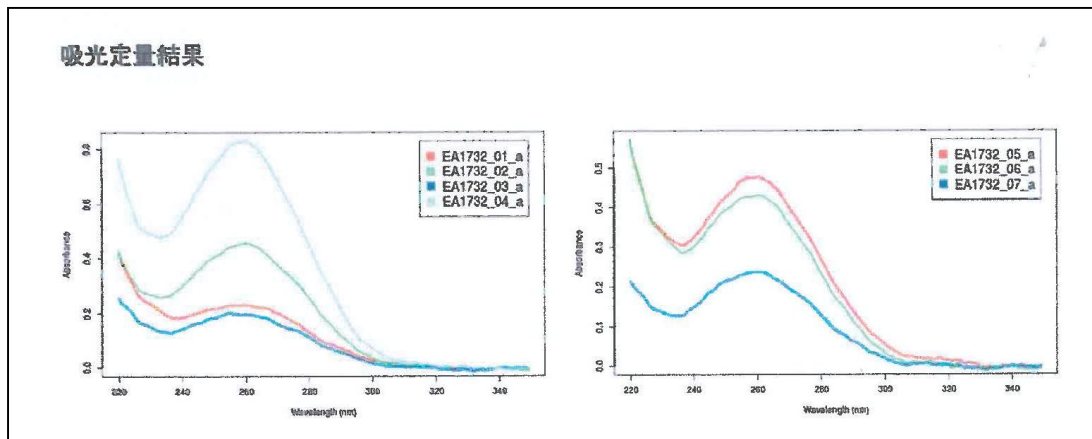
左心耳のホルマリン固定パラフィンブロック（2 例）の 10 μ m に薄切した標本から RNA 抽出キット NucleoSpin total RNA FFPE XS（タカラバイオ）を用いて RNA 抽出し，吸光度測定を行った後に濃度調整し，PCR を行い比較的長い RNA（18s）が検出されることを確認した．DNA 等の混入もない状態であり，RNA の収量および質は問題ないことを確認した．他の組織（甲状腺など）の RNA 抽出と同一条件で行っても支障なく，またサンプルの経年変化はないことも判明した．

次に、対象 18 例の左心耳のホルマリン固定パラフィンブロックから NucleoSpin total RNA FFPE (MN) を用いて RNA 抽出を行い，BioSpec-nano (SHIMADZU) による吸光度を測定した後，QuantiFluor RNA System (Promga) にて RNA 量の定量を行った．

| 180421QuantFluor | 総 RNA 濃度(ug/uL) |
|------------------|-----------------|
| 1 | 8.2 |
| 2 | 31.63 |
| 3 | 9.92 |
| 4 | 5.39 |
| 5 | 61.37 |
| 6 | 27.29 |
| 7 | 122.21 |
| 8 | 12.03 |
| 9 | 59.77 |
| 10 | 61.74 |
| 11 | 30.23 |
| 12 | 71.58 |
| 13 | 19.82 |
| 14 | 7.55 |
| 15 | 3.56 |
| 16 | 37.35 |
| 17 | 18.16 |
| 18 | 4.24 |

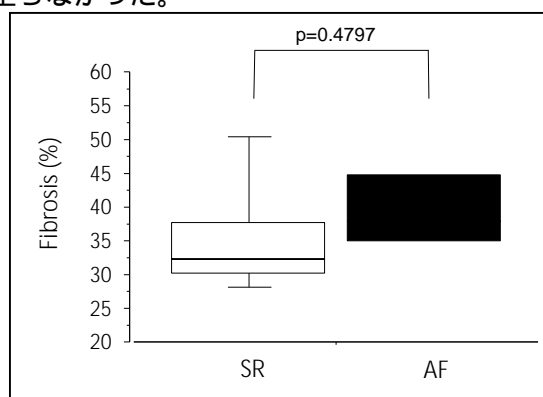
次世代アレイによる網羅的解析

RNA 抽出量が多かった 7 検体 (SR 維持群 4 例・AF 再発群 3 例) の全ての RNA 分子 (トランスクリプト) の発現変動について、網羅的アレイ解析を実施した (タカラバイオ社 Clariom D)。AF 再発群において 2 倍以上に up-regulation ($p < 0.05$) している変動遺伝子は 491 遺伝子であり、既知のものとして *TNNC1*・*PDLIM5*・*TECRL* が含まれていた。0.5 倍以下に down-regulation ($p < 0.05$) している変動遺伝子は 748 遺伝子であった。また、同定された microRNA は (AF 再発群において 2 倍以上に up-regulation ($p < 0.05$) している), *microRNA6776*, *microRNA4520-1*, *microRNA7973-2* であった。



心房筋リモデリング変化の病理組織学的検討とトランスクリプトとの関連

齋藤ら (研究分担者) が以前報告している (Saito, *Circ J*, 2007; 71: 70-8) 手法を用いて病理組織学的診断による心房筋のリモデリング変化 (cardiomyocytes, nuclei, intercellular fibrosis, fatty infiltration, endocardial thickening, the volume of smooth muscle cells in the endocardium) のうち intercellular fibrosis に着目し、fibrosis の占める割合を測定した (% fibrosis)。AF 再発群で fibrosis の割合が大きかったが、有意差には至らなかった。



トランスクリプトとの関連については、同定された *TNNC1* は線維化変性をきたす心筋症との関連が指摘されており、*PDLIM5* は心房細動において指摘されている *microRNA21* のターゲットであり、*TECRL* は不整脈との関わりが示唆されている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0件)

〔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

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：軸菌智雄

ローマ字氏名：Tomoo Jikusono

所属研究機関名：大阪府立大学

部局名：生命環境科学研究科

職名：客員研究員

研究者番号(8桁)：10465312

研究分担者氏名：齋藤恒徳

ローマ字氏名：Tsunenori Saito

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁)：00716631

研究分担者氏名：坂本俊一郎

ローマ字氏名：Shun-ichiro Sakamoto

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：50398872

(2)研究協力者

なし

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。