

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590808

研究課題名（和文） 心不全に関与する non-coding RNA の探索および機能解析

研究課題名（英文） To detect non-coding RNA related to heart failure

研究代表者

井澤 英夫 (HIDEO IZAWA)

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号：80402569

研究成果の概要：

本研究の目的は、不全心筋の病態形成に影響する機能性 RNA を同定することである。我々は心筋症症例から得た心筋生検標本における mRNA の定量解析、病態形成に関連する miRNA の網羅的探索を行った。不全心筋における交感神経刺激伝達系および心筋細胞内 Ca 動態関連タンパクの発現異常と心筋収縮予備能との関連を見出し、さらに、心筋収縮予備能異常に関連している複数個の miRNA を同定した。また、肥大型心筋症における心筋収縮予備能とミトコンドリア異常との関連も明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心臓病態学、心不全、機能性 RNA、心筋症、ドブタミン負荷試験

1. 研究開始当初の背景

心不全の発症頻度は加齢とともに増加する。従って、今後、世界に類を見ない少子高齢化を迎える我が国では、心不全に対する早急な対応が迫られている。ベータ遮断薬やアンジオテンシン変換酵素阻害薬によって心不全の予後は改善されることが明らかにされてきた。しかし、心不全治療が、このような過剰な神経体液性因子の抑制を治療目標とした新しい時代に入ったと言われて久しいにもかかわらず、未だにこれら薬物治療にても心不全が悪化する症例は数多く存在す

る。そのため、従来から新しい薬理作用ターゲット分子探索を目的とした心不全の病態解明研究が分子生物学的レベルで活発に行われているが、心不全治療に新たなパラダイムシフトを起こす治療ターゲットは未だ発見されていない。近年、タンパク質をコードしない non-coding RNA (ncRNA) がにわかに脚光を浴び始めている。ncRNA はそれ自身が遺伝子の最終産物であり、機能性高分子として働き、遺伝子の発現調節を担っていることが次第に明らかになりつつある。最近、腫瘍増殖などに ncRNA の異常が関与していること

が報告され、疾患の原因としてタンパク質の異常のみならず ncRNA の異常も視野に入れる必要性が認識されつつある。しかし、循環器疾患における ncRNA 異常を検討した報告はない。従って、不全心の病態に關与する ncRNA を網羅的に探索し、その機能異常による生体応答を総合的に把握することは、心不全の病態解明および心不全治療に新たなパラダイムシフトを起こす治療ターゲット同定に直結する緊急の課題である。

我々は、心不全の主要な原因疾患の一つである心筋梗塞の感受性遺伝子を世界で初めて網羅的大規模関連解析を行い同定した。また、従来から臨床において不全心より採取した心筋生検標本の病理学的および分子生物学的異常を評価するとともに、心臓カテーテル検査や心臓超音波検査、心臓核医学検査等により生理学的異常を評価し、臨床における病的心の生理学的および分子生物学的異常の統合的評価システムを確立してきた。収縮障害を主病態とする拡張型心筋症および、最近注目されている拡張障害を主病態とする肥大型心筋症や高血圧性肥大心における心筋収縮・弛緩特性の破綻と心筋細胞内 Ca^{2+} 動態関連タンパクの遺伝子発現異常に関して解析し着実な研究成果を挙げている。さらに最近では、心不全動物モデルにおいて、新たな治療ターゲット分子の探索もを行っている。我々は、臨床においては不全心の心筋収縮・弛緩特性の異常に心筋細胞内 Ca^{2+} 動態関連タンパクの遺伝子発現異常が關与していることを心筋生検標本を用いて明らかにしてきたが、ncRNA の一種であるマイクロ RNA (miRNA) の關与は未だ明らかにできていない。このような背景の下、不全心筋において、どのような miRNA が発現し、心不全の病態形成に關与しているのか興味を持ち、本研究計画を立案するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、拡張型心筋症および肥大型心筋症の症例を対象に

(1) 不全心筋において、どのような miRNA が発現しているかを定量解析し、心不全の病態形成に關連する miRNA を網羅的に探索すること

(2) 探索同定した miRNA の標的遺伝子同定および機能解析を行うと同時に心筋特性の解析を行い、心不全の病態形成における機能性 RNA の役割および mRNA との相互作用を明らかにすることである。この目的を達成するために私たちは、心筋生検標本における心筋収縮弛緩関連タンパクの mRNA 発現量を測定すると同時に miRNA の発現を網羅的に解析する。さらに、心筋収縮弛緩特性等の生理学的機能評価を行い、miRNA の機能異常が不全心における心筋収縮弛緩特性の異常にどのように關与しているか、統合的に解

析する。

3. 研究の方法

拡張型心筋症(DCM)および肥大型心筋(HCM)を対象に、以下の検査を行った。本研究は名古屋大学医学部倫理委員会の承認の下、文書による同意を得て行った。

(1) 血液生化学検査: 一般血液生化学検査、血漿レニン活性、血漿および尿中カテコラミン濃度、血漿 BNP 濃度、血漿アルドステロン濃度、血清 MMP-1,3 濃度、血清 TIMP-1 濃度

(2) 心臓超音波検査: 左室拡張末期径、Ejection Fraction、Doppler (E/A, DecT)、TDI (Strain-rate)

(3) 心臓核医学検査: MIBG 心筋 SPECT により H/M を算出した。

(4) 心臓カテーテル検査:

① 左室圧測定: 左室内の pig-tail 型 micromanometer により左室内圧を記録し(3 分間)、心筋収縮(dP/dt_{max})・弛緩(τ)特性、頻脈依存性心筋収縮・弛緩特性を計測した。また、DCM においては、dobutamine 負荷試験を行い、心筋収縮弛緩予備能を評価した。

② 心筋生検: 右室中隔側より心筋生検を行った。

<分子生物学的解析>

心筋生検標本の一部を用いて total RNA を抽出し、活性のない pre-miRNA や pri-miRNA を除去し活性を有する成熟 miRNA だけを分離・精製した。3' 末端にアミン修飾した miRNA に蛍光色素を付加した後、480 種類のヒト miRNA をターゲットにしたプローブをスポットしたアレイにより miRNA 発現プロファイリングを網羅的に行った。定量的 RT-PCR 法により心筋収縮弛緩関連タンパクの mRNA 発現量を定量的に評価した。

<病理組織学的解析>

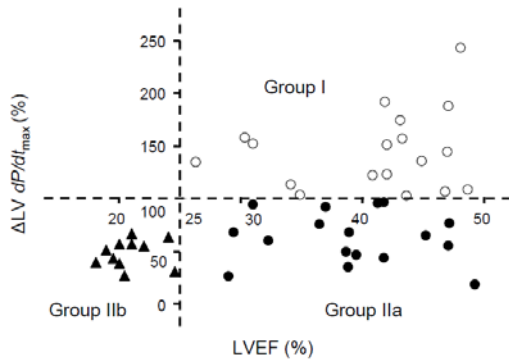
心筋生検標本において、従来より検討してきたカテプシン S および K、シスタチン C に対する免疫染色を引き続き行った。

4. 研究成果

(1) ドブタミン負荷試験による心筋収縮予備能の評価とその分子機序の解明

我々は、拡張型心筋症 46 例を対象に、血液検査(血漿 BNP 濃度、血漿ノルエピネフリン濃度)、心臓超音波検査、¹³¹I-MIBG 心筋シンチグラム、右心カテーテル検査、冠動脈造影、左室造影を行うとともに、マイクロマノメーター付きカテーテルを左室内に留置し、ドブタミンを $5 \rightarrow 10 \mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ にて静脈内投与し、血行動態データを収集した。さらに心筋生検を施行し、心筋生検標本における $\beta 1$ アドレナリン受容体、 $\beta 2$ アドレナリン受容体、GRK2、Gs α 、Gi2 α 、SERCA2a、phospholamban、ryanodine 受容体、calsequestrin、 $Na^+ - Ca^{2+}$ exchanger 等、心筋収縮関連タンパク mRNA 発現量を RT-PCR 法により測定した。その結果、ドブタミン負荷に伴う

LVdP/dtmax の変化量 (Δ LVdP/dtmax) および左室造影から求めた LVEF に基づき患者を3つのグループに分けた (Group I (Δ LVdP/dtmax > 100%, LVEF > 25%, 18 例)、Group IIa (Δ LVdP/dtmax \leq 100%, LVEF > 25%, 17 例)、Group IIb (Δ LVdP/dtmax \leq 100%, LVEF \leq 25%, 11 例、下図)。



Group I と Group IIa とではドブタミン投与前の血行動態指標には差が無かった。Group IIa、Group IIb では Group I に比べ血漿ノルエピネフリン濃度が高値、¹³¹I-MIBG 心筋シンチグラムにおける delayed H/M が低値であった。また心筋生検標本では、 β 1 アドレナリン受容体、SERCA2a、phospholamban の mRNA 発現量が Group IIa、Group IIb で低下していた。以上の結果から、DCM 患者において、ドブタミン負荷試験により心筋細胞の β 1 アドレナリン受容体、SERCA2a、phospholamban の遺伝子発現低下に関連した心筋収縮予備能低下を診断できる可能性が示唆された。

(2) 心不全と関連する miRNA の網羅的探索

我々は、心筋症症例から得た心筋生検標本を定量解析し、心不全の病態形成に関連する miRNA を網羅的に探索した。14 例の心筋サンプルにおける miRNA 発現レベルを、miRNA アレイを用いて網羅的に解析した結果、不全心筋における心筋収縮予備能異常に関連していると考えられる複数個の miRNA を同定することにも成功した。

14 例にドブタミン負荷試験を行い、ドブタミン負荷試験による心筋収縮予備能に基づいて上位 7 例と下位 7 例との 2 群に分類した。両群間で、年齢、ニューヨーク心臓協会心機能分類、baseline での左室拡張末期容積、左室収縮率、左室収縮能 (dP/dtmax)、血漿脳性利尿ホルモン濃度には差がなかった。しかしながら、miRNA10 ($p < 0.01$)、miRNA300 ($p < 0.01$)、miRNA302 ($P < 0.01$)、miRNA323 ($p < 0.01$)、miRNA422 ($P < 0.01$)、miRNA134 ($p < 0.02$)、miRNA378 ($p < 0.02$)、miRNA369 ($p < 0.02$)、miRNA518 ($p < 0.02$)、miRNA137

($p < 0.02$)、の 10 個の miRNA がドブタミン負荷試験による心筋収縮予備能が正常に保たれている上位 7 例の症例の心筋生検標本で有意 ($p < 0.02$) に発現していた。

本研究の結果、我々は世界で初めて心筋収縮予備能に関連する miRNA を同定することに成功した。

(3) 肥大型心筋症の心筋収縮予備能破綻とミトコンドリア機能異常との関連

我々は、肥大型心筋症 16 例を対象に、血漿 BNP 濃度、心臓超音波検査、MIBI 心筋シンチグラム、右心カテーテル検査、冠動脈造影、左室造影を行うとともに、マイクロノメーター付きカテーテルを左室内に留置し、右房ペーシング中の血行動態データを収集した。さらに心筋生検を施行し、心筋生検標本における SERCA2a、phospholamban、ryanodine 受容体、calsequestrin、 Na^+ - Ca^{2+} exchanger 等、心筋収縮関連タンパク mRNA 発現量を RT-PCR 法により測定した。

この結果、心筋収縮予備能または弛緩予備能のいずれかが破綻している症例は心筋収縮及び弛緩予備能が正常な症例と比較して、ミトコンドリア機能を表す MIBI シンチの洗い出し率が有意に低下していた ($19.3 \pm 3.1\%$ vs. $29.2 \pm 6.3\%$)。最大ペーシング負荷時の弛緩機能と MIBI シンチ洗い出し率との間には有意な正の相関関係を認めた ($r = 0.74$, $P < 0.01$)。また、電子顕微鏡による観察では、心筋収縮・弛緩予備能が破綻している症例では、巨大ミトコンドリアを認めた。さらに、ミトコンドリア細胞膜電子伝達系関連タンパク mRNA は心筋収縮・弛緩予備能が破綻している症例で有意に低下していた。

以上の結果から、肥大型心筋症における心筋収縮予備能および弛緩予備能の破綻と心筋細胞内ミトコンドリア機能障害との間に関連のあることが示唆された。

(4) 本研究成果の意義

① 高度な生命現象の源は機能性 RNA が担っていると考えられるため、疾患の病態にも機能性 RNA の機能異常が根幹で関与している可能性が高いことが指摘されている。にもかかわらず、循環器疾患の病態形成における機能性 RNA の関与は全く研究されていない。本研究は世界で初めて心不全における心筋収縮予備能破綻に関連する機能性 RNA を同定した。今後、同定された機能性 RNA の標的遺伝子を明らかにし、さらに機能性 RNA の機能異常が心不全の病態形成にどのように関与するか統合的に解析する予定である。

特に、我が国で今までに申請された心臓移植適応検討症例の 80% 以上が非虚血性心不全であり、欧米とは異なる我が

国の心不全特有の特徴を踏まえた独自の戦略が必要であるとの観点から、本研究の対象は拡張型心筋症であり、日本人に特徴的な慢性心不全の病態を総合的に評価する意義は大きいと考えられる。

- ② 本研究の結果、心不全に関連する機能性 RNA が同定され、その標的遺伝子、相互作用および機能が解明されれば、心不全の病態形成に関する複雑な遺伝子発現調節システムを解明する新たな時代の扉を開くことになる。心不全に関連した機能性 RNA の同定および機能解析の結果、新しい診断マーカーへの展開、および治療ターゲットの探索や RNA 医薬開発に直結可能である。

現在この分野は世界的な規模で驚異的な速度で進展しているため、機能性 RNA 研究の実用化、産業化は各国が国家プロジェクトとして取り組んでいる緊急課題である。本研究の成果は今後の我が国の循環器疾患における機能性 RNA 研究発展の重要な鍵を握っていると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Kobayashi M, Izawa H, Cheng XW, Asano H, Hirashiki A, Unno K, Ohshima S, Yamada T, Murase Y, Kato TS, Obata K, Noda A, Nishizawa T, Isobe S, Nagata K, Matsubara T, Murohara T, Yokota M. Dobutamine stress testing as a diagnostic tool for evaluation of myocardial contractile reserve in asymptomatic or mildly symptomatic patients with dilated cardiomyopathy. JACC Cardiovasc Imaging. 2008;1(6):718-26. 査読有り
2. Cheng XW, Murohara T, Kuzuya M, Izawa H, Sasaki T, Obata K, Nagata K, Nishizawa T, Kobayashi M, Yamada T, Kim W, Sato K, Shi GP, Okumura K, Yokota M. Superoxide-dependent cathepsin activation is associated with hypertensive myocardial remodeling and represents a target for angiotensin II type I receptor blocker treatment. Am J Pathol. 2008 Aug;173(2):358-69. 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

1. Unno K, Izawa H, et al. Relation of Functional and Morphological Changes in Mitochondria to Myocardial Contractile and Relaxation Reserves in Asymptomatic to Mildly Symptomatic Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy. American

Heart Association, Scientific Sessions 2008, 2008 年 11 月 11 日, ニューオーリンズ(米国)

2. Kobayashi M, Izawa H, et al. Reduced [123I]metaiodobenzylguanidine Uptake Predicts Impaired Adrenergic Myocardial Functional Reserve in Asymptomatic or Mildly Symptomatic Patients with Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. American Heart Association, Scientific Sessions 2008, 2008 年 11 月 9 日, ニューオーリンズ(米国)
3. Hirashiki A, Izawa H, et al. Dobutamine-induced mechanical alternans predicts poor prognosis in mildly to moderately symptomatic patients with idiopathic dilated cardiomyopathy in sinus rhythm. American Heart Association, Scientific Sessions 2007, 2007 年 11 月 6 日, オーランド(米国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井澤 英夫 (IZAWA HIDEO)
藤田保健衛生大学・医学部・准教授
研究者番号：80402569

(2) 研究分担者

成 憲武 (CHENG XIAN WU) (19 年度)(20 年度)
名古屋大学・医学部・寄付講座講師
研究者番号：30378228
横田充弘 (YOKOTA MITSUHIRO) (19 年度)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号：50201851
野田明子 (NODA AKIKO) (19 年度)
名古屋大学・医学部・助教
研究者番号：80252287
永田浩三 (NAGATA KOHZO) (19 年度)
名古屋大学・医学部・准教授
研究者番号：20378227
室原豊明 (MUROHARA YOTOAKI) (19 年度)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90299503

(3) 連携研究者

横田充弘 (YOKOTA MITSUHIRO) (20 年度)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号：50201851
野田明子 (NODA AKIKO) (20 年度)
名古屋大学・医学部・助教
研究者番号：80252287
永田浩三 (NAGATA KOHZO) (20 年度)
名古屋大学・医学部・准教授
研究者番号：20378227
室原豊明 (MUROHARA YOTOAKI) (20 年度)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90299503