

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：11501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06191・19K21296

研究課題名(和文) miR27aを介したNrf2制御による虚血性心筋症の新規治療介入の検討

研究課題名(英文) The association between miR27a and ischemic cardiomyopathy.

研究代表者

成味 太郎 (Narumi, Taro)

山形大学・医学部・客員研究員

研究者番号：00755142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：HHD患者10例と対照患者10例においてmiR-21がHHD患者では有意に高値であり、その値は血中の心筋線維化マーカーであるIII型プロコラーゲンN末端ペプチドおよびI型コラーゲンC末端テロペプチドと有意な相関関係を示した。心筋組織中のmiR-21もHHD患者で有意に高値であった。新生仔ラット心筋細胞にAng II刺激を行った。Ang II刺激により心筋細胞ではmiR-21が上昇し、PDCD4が低下し、その下流に存在するAP-1およびTGF- β 1は上昇した。miR-21阻害薬を投与することにより、PDCD4は上昇しAng II刺激によるAP-1およびTGF- β 1の上昇は抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TGF- β 1はmiR-21の発現を上昇させるとともに、miR-21も下流の標的遺伝子を介してTGF- β 1を上昇させる。フィードバックループが形成され心筋リモデリングを促進する。HHD患者においてmiR-21が上昇しており、左室肥大や心筋の線維化の形成には、miR-21/PDCD4/TGF- β 1の経路が重要な役割を果たしていると考えられた。miR-21を阻害することでAng IIによるTGF- β 1増加を抑制することができた。miR-21阻害薬は心筋細胞のTGF- β 1シグナル抑制を介して心筋リモデリングを抑制できる可能性が示唆された。miR-21は左室肥大リモデリングの治療標的になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Hypertension causes cardiac remodeling, including hypertrophy and interstitial fibrosis, which leads to development of hypertensive heart disease (HHD). Although microRNA-21 (miR-21) is associated with fibrogenesis in multiple organs, its impact on hypertrophic cardiac remodeling in hypertension is not known. Circulating miR-21 level was higher in patients with HHD than that in the control subjects. It also positively correlated with serum myocardial fibrotic markers. In vitro, miR-21-specific inhibitor attenuated Ang II-induced PDCD4 downregulation and contributed to subsequent deactivation of AP-1/TGF- β 1 signaling pathway in neonatal rat cardiomyocytes. Thus, suppression of miR-21 prevents hypertrophic cardiac remodeling by regulating PDCD4, AP-1, and TGF- β 1 signaling pathway.

研究分野：循環器内科

キーワード：microRNA 線維化 心筋 肥大 機序

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国では高齢人口の急激な増加に伴い、近年心不全患者の増加が著しい。心不全は、あらゆる心疾患の終末像として出現する。日常診療でよく経験する虚血性心疾患(心筋梗塞・狭心症)、弁膜症、高血圧症などが心不全の原因となる他に、ウイルス、アルコール、糖尿病、遺伝子異常などが原因となる。いずれの病態においても、神経体液性因子の上昇が共通の増悪因子として考えられている(Circulation 2000;102:14-23)。交感神経系、レニン/アンジオテンシン系、炎症性サイトカインの活性化は、心肥大、心筋細胞のアポトーシス、リモデリングを引き起こし、その結果、心不全はさらに悪化する。このような心不全の重要な増悪因子の一つに酸化ストレスがある。McMurrayらは酸化ストレスのマーカーである血中過酸化脂質が心不全患者では上昇しており、心機能の悪化と相関することを報告した(Eur Heart J 1993;14:1493-1498)。また、Ideらは、心不全モデルを用いて、不全心筋細胞では活性酸素種産生が亢進しており、活性酸素種レベルが上昇するほど左室収縮能が低下することを報告した(Circ Res 2000;86:152-157)。しかし、抗酸化物質投与による心不全改善効果は認められておらず、治療法としては確立されていない。Nrf2の機能及びmiR-27aとの関連を心筋細胞において解明できれば、心不全の新たな治療介入に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

虚血性心筋症による心不全の病態形成や進展に、過酸化脂質や、活性酸素種による酸化ストレスが重要な役割を果たすことが知られている。種々のがん細胞において、転写因子Nrf2の活性化は、HO-1, NQO-1, GCLなどの酸化ストレス消去系酵素の発現量を調節することが報告されている。Nrf2は、心筋細胞においても活性酸素種による酸化ストレスの消去に寄与する可能性が示唆されている。虚血性心筋症ではmicroRNA-27a(miR-27a)の発現が亢進することが知られているが、コレステロール障害を来した肝細胞においてmiR-27aがNrf2の発現を抑制することが報告された。本研究では、虚血性心筋症における、転写因子Nrf2の機能を解明するとともに、miR-27aの発現抑制が心不全治療の新たな治療法になる可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 心筋細胞におけるNrf2とmiR-27aの機能をin vitroで検討する。

まず、ピオチン標識miR-27aを作成し、miR-27aとNrf2の非翻訳領域をMag Capture RNA pull down kit (Wako)を使用してpull downすることで、心筋細胞において、miR-27aがNrf2を直接的に抑制しているか否かを検討する。その後、ヒト心筋細胞内でMir-X miRNA qRT-PCR TB Green Kit (Clontech)を使用しmiR-27a及びNrf2発現の状況、酸化ストレス消去系酵素の発現量の変化、活性酸素種量を検討する。

(2) 心筋細胞においてmiR-27aの発現抑制とNrf2の発現の関連をin vitroで検討する。

miR-27aの抑制剤をヒト心筋細胞へ導入することで、Nrf2の発現及び活性化にどのような変化を与えるかを評価し、加えて酸化ストレス消去系蛋白質発現量の変化、活性酸素種発現量、アポトーシスを評価する。

(3) miR-27aの抑制が虚血後のリモデリングに与える影響をin vivoで検討する

In vitroの検討と並行し、in vivoにおける検討も進める。本研究室では、過去にマウスを用いた虚血性心筋症のモデルを実験で使用してきた経験がある(Int J Mol Sci. 2016;17:542)。野生型マウスを使用し、開胸下に前下行枝を結紮した群に、in vivo用に作られたLNA-miR-27a inhibitor (Exiqon)を頸部皮下投与することによりmiR-27aの発現を抑制する。対照群には開

胸手術のみを施行し、頸部皮下には専用に設計されたコントロール miR (Exiqon)を投与する。術後 4 週時点で、Nrf2 発現量並びに活性酸素種量、心機能、虚血後のリモデリングの程度を評価する。

4. 研究成果

HHD 患者 10 例と対照患者 10 例において 4 種類の線維化に關与する miR を測定した。その中で miR-21 が HHD 患者では有意に高値であり、その値は血中の心筋線維化マーカーである III 型プロコラーゲン N 末端ペプチドおよび I 型コラーゲン C 末端テロペプチドと有意な相関關係を示した。また心筋組織中の miR-21 も HHD 患者で有意に高値であった。そこで我々は miR-21 に着目した。アンギオテンシン II 投与 (Ang II) と大動脈縮窄術 (TAC: transverse aortic constriction) によるマウス左室肥大モデルを作成した。両モデルマウスにおいて、左室心筋では線維化と肥大が確認され、また miR-21 が有意に上昇していた。miR-21 の標的遺伝子の中で Programmed cell death 4 (PDCD4) が AngII、TAC の両モデルで低下していた。PDCD4 は核内転写因子である AP-1 を介して Transforming growth factor- 1 (TGF- 1) 発現を抑制することが知られている。AngII、TAC の両モデルにおいて AP-1 および TGF- 1 は上昇していた。新生仔ラット心筋細胞に Ang II 刺激を行った。Ang II 刺激により心筋細胞では miR-21 が上昇し、PDCD4 が低下し、その下流に存在する AP-1 および TGF- 1 は上昇した。miR-21 阻害薬を投与することにより、PDCD4 は上昇し Ang II 刺激による AP-1 および TGF- 1 の上昇は抑制された。また miR-21 阻害薬は TGF- 1-activated kinase 1 のリン酸化を介する心肥大を抑制した。さらに胎児性遺伝子 ANP、BNP も miR-21 阻害薬により抑制された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe K, Narumi T, Watanabe T, Otaki Y, Takahashi T, Aono T, Goto J, Toshima T, Sugai T, Wanezaki M, Kutsuzawa D, Kato S, Tamura H, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Shishido T, Watanabe M.	4. 巻 0
2. 論文標題 The association between microRNA-21 and hypertension-induced cardiac remodeling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0226053. eCollection 2020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----