

令和 5 年 4 月 25 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09135

研究課題名(和文)心房細動におけるマイクロRNA発現に基づく左房リモデリングの解明

研究課題名(英文) Study of left atrial remodeling based on microRNA expression in atrial fibrillation

研究代表者

仁科 大(Nishina, Dai)

日本医科大学・大学院医学研究科・研究生

研究者番号：70307932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：心房細動患者の左心耳と右側左房壁の病理標本から抽出したRNAのマイクロアレイ解析を実施した。30倍以上発現差が生じていたのは、IL6・sarcolipin・actin・myosinであった。また術中Cardioversionの成否と左心耳に発現するマイクロRNAの関連を分析した。cardioversion不成功群、洞調律復帰しMaze手術後も洞調律維持群とMaze手術を施行したが心房細動再発群に分けた。RT-PCRの結果不成功群では、miR-208とmiR-1202がdown-regulatedし、再発群ではmiR-142-3p、miR-223はup-regulatedされていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心原性脳梗塞を引き起こす心房細動(AF)は、高齢者になると発症率が飛躍的に上昇することが報告されており、AFの治療戦略は重要である。AFの治療として左心耳マネージメントが行われるが、本研究では同一患者の左心房組織のうち左心耳と右側左房壁に発現しているRNAを解析した結果、sarcolipinやactinそしてmyosinに差がみられた。Sarcolipinは心房リモデリングに関連することが指摘されている。また、術中容易に実施できるcardioversionの成否と左心耳に発現しているマイクロRNAの違いが示唆され、今後洞調律復帰を目指すMaze手術の適応の確立が期待される。

研究成果の概要(英文)：Microarray analysis of RNA extracted from pathological specimens of the left atrial appendage and left atrial wall of patients with atrial fibrillation was performed. IL6, sarcolipin, actin, and myosin showed expression differences of 30-fold or more. We also analyzed the relationship between the success or failure of intraoperative cardioversion and microRNAs expressed in the left atrial appendage. Patients were divided into three groups: unsuccessful cardioversion group, restoration of sinus rhythm and maintenance of sinus rhythm after Maze surgery, and recurrence of atrial fibrillation after Maze surgery. In unsuccessful cardioversion group, miR-208 and miR-1202 were down-regulated, and in recurrence of atrial fibrillation group, miR-142-3p and miR-223 were up-regulated by RT-PCR.

研究分野：不整脈

キーワード：心房細動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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(AF)は、持続性不整脈の中でも最も頻度が多く、高齢者になるとAF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、AFの予防・治療戦略の確立が急務となっている。AF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があり、最近では遺伝的要因が指摘されてAF関連遺伝子の報告がなされている(Ellinor Nat Genet 2012;44:670-5)。AFをregulateするmiRNAの存在(Wang Cardiovasc Res 2011;89:710-21)も明らかとなってきた。AFの要因は多様で、電気的もしくは構造的リモデリングなどそれぞれのトリガーとなるmiRNAが想定されているが(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、本邦でヒト組織を用いた研究に関しては切除した右心耳標本を使用したもののみである(Nishi PLoS One 2013;8:e73397)。AF治療においては、米国Coxらが提唱したMaze手術により心耳を切除して洞調律復帰を目指す時代から心拍数コントロールと抗凝固療法を主体とする心源性脳梗塞予防へシフトしてきた。リズムコントロールでもマッピングガイド下に肺静脈隔離などカテーテルアブレーションによる低侵襲治療も盛んに行われている。最近では左心耳が注視され、左心耳がAFの起点となる報告(Di Biase Circulation 2010;122:109-18)も見られ、デバイスによる左心耳閉鎖(Holmes et al. JACC 2014;64:1-12)を行うことで抗凝固薬も不要とする意見もあり、AF治療は新しい局面を迎えている。本邦では弁膜症にAFの合併が多く、弁膜症手術にMaze手術を併施することが推奨されているが、遠隔期の洞調律維持は5年70-80%、10年50%程度が現状である。国立循環器病研究センターでは、これまでの経験により左房径70mm以上、心電図V1誘導f波0.1mV以下、AF罹患歴15年以上をMaze手術の適応除外としている(末田 心臓 2012;44:421-4)が、今後AF治療におけるMaze手術の位置づけの再検証が必要である。

2. 研究の目的

本研究はAFを科学する研究の一環として、AFによって生じている構造的・電気的心房筋リモデリングと発現するマイクロRNAに着目している。マイクロRNAの発現に基づいてAF治療の妥当性やMaze手術の役割を解明するのが本研究の目的である。マイクロRNAの抽出には、血栓塞栓症予防のため術中切除した左心耳ホルマリン固定パラフィンブロック(FFPE)標本を用いる。まず、最近AF治療において重要視されている左心耳マネージメントの妥当性を検証する。左心房内の構造的リモデリングの均一性を分析するため、左心房からマルチプルサンプリングしたFFPE標本から抽出したマイクロRNAの発現を比較検討する。次に、遠隔成績が期待できるMaze手術の適応基準を見極めるため、術中実施可能なCardioversionの成否がMaze手術の適応条件になるかを左心耳に発現するマイクロRNAを分析することにより検証する。

3. 研究の方法

【課題による対象リストの作成と臨床情報の収集】

課題 : 左心房の部位によりでマイクロRNAの発現に違いはあるのか？

発作性もしくは持続性AFを合併した弁膜症患者のうち手術の際に採取できた右側左房壁の病理

標本と左心耳の病理標本を用いる。周術期因子や遠隔成績といった臨床情報を診療録ベースで追跡する。

課題 : 術中 Cardioversion の成否にマイクロ RNA 発現の違いはあるのか？

AF 患者の手術時に術中除細動 (intraoperative cardioversion) を試みて、cardioversion が不成功だった群 (U-IC 群)、洞調律復帰が可能で Maze 手術を施行した患者をさらに術後洞調律を維持している患者群 (control 群) と AF が再発した患者群 (Maze-AF 群) に分ける。検体をとし、血栓予防のため術中切除された左心耳標本を用いる。

【RNA の抽出確認】

左心耳および左房壁の FFPE 標本を用いたマイクロ RNA 発現解析のための最適条件を設定する (例えば Proteinase K 処理の時間や内在性コントロールの選定など)。次に各サンプルから NucleoSpin® total RNA/FFPE XS (タカラバイオ社) を用いて RNA を抽出し、吸光度計とバイオアナライザーで質と量の検定を行い、マイクロ RNA を抽出するサンプルを選定する。

【網羅的マイクロアレイ解析】

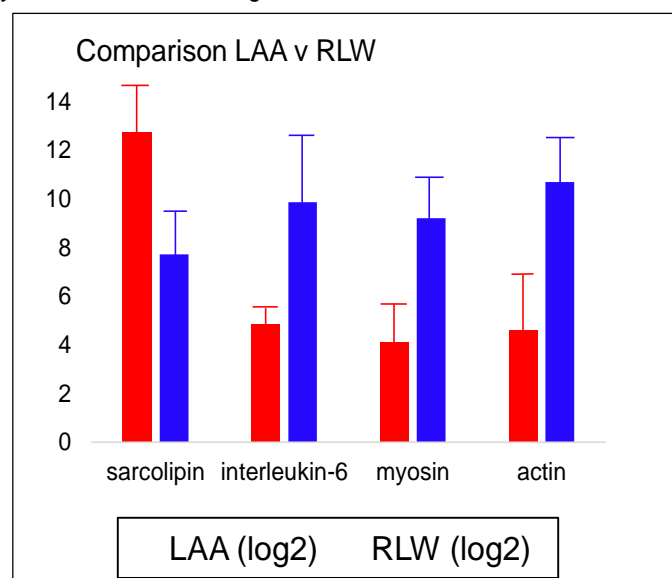
課題 で選定したサンプルに対し網羅的マイクロアレイ解析を行うため、実績のあるジェネティックラボ社に委託する。群間比較を行い (3 検体ずつ)、4 倍以上の発現の差を認めたマイクロ RNA (up-regulation あるいは down-regulation) がいないか検索する。

【定量的発現プロファイル測定】

課題 では、マイクロアレイ解析の結果を基に検体ごとに 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems 社) を用いてターゲットとなる RNA の発現量を測定し、定量的発現プロファイル比較解析を行う。課題 では、これまで発表された文献を基に検体ごとに 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems 社) を用いてターゲットとなるマイクロ RNA の発現量を測定し、定量的発現プロファイル比較解析を行う。

4. 研究成果

課題 における網羅的マイクロアレイ解析で 2 群間における発現差が 2 倍以上であった遺伝子は 1585 個が同定された。30 倍以上発現差が生じた遺伝子に着目すると、右側左房壁 (RLW) において interleukin-6 が up-regulation されるとともに sarcolipin は down-regulation されていた。左心耳 (LAA) においては actin、myosin が down-regulation されていた。



課題 では、これまで発表された文献を基に 13 のマイクロ RNA (miR-21・miR-142-5p・miR-142-3p・miR-146b・miR-208・miR-223・miR-328・miR-367・miR-409-3p・miR-499・miR-590-5p・miR-630・miR-1202)を選定し、検体ごとに 7500 Real-time PCR System(Applied Biosystems 社)を用いて発現量を測定し、定量的発現プロファイル比較解析を行った。U-IC 群では、miR-208 と miR-1202 が少なくとも 50%程度 down-regulation されていることが示され、M-AF 群では miR-142-3p、miR-223 は、ほぼ 2 倍に up-regulation されていることがわかりました。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤井正大
2. 発表標題 Study of differences in gene expression within the same left atrium of patients with atrial fibrillation
3. 学会等名 第75回胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

〔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
研究分担者	藤井 正大 (Fujii Masahiro) (60297926)	日本医科大学・医学部・准教授 (32666)	
研究分担者	坂本 俊一郎 (Sakamoto Shun-ichiro) (50398872)	日本医科大学・医学部・准教授 (32666)	
研究分担者	軸園 智雄 (Jikuzono Tomoo) (10465312)	日本医科大学・医学部・准教授 (32666)	
研究分担者	川瀬 康裕 (Kawase Yasuhiro) (10339385)	日本医科大学・医学部・講師 (32666)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------