様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成２４年６月１日現在

機関番号：３３９１６
研究種目：基盤研究（Ｃ）
研究期間：２００９～２０１１
課題番号：２１５９０９１４
研究課題名（和文）　心不全の病態進展プロセスに関与するマイクロＲＮＡの同定と機能解析

研究課題名（英文）　Identification and function analysis of micro RNAs in progression of heart failure

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

研究成果の概要（和文）：心筋線維化および心筋のカテコラミン感受性低下が心不全の進展に関与していることはよく知られているが､その詳細な分子生物学的メカニズムは明らかではない。私たちは拡張型心筋症（DCM）の心筋生検標本の一部を解析するとともに、臨床検査データとの関連を解析した結果、心筋カテコラミン感受性低下に関連した 7 種類の miRNA 発現異常を同定することに成功した。さらに、心筋線維化と関連した 7 種類の miRNA 発現異常も同定するとともに、定量解析により最終的に 4 種類の miRNA が心筋線維化に関与している可能性を見いだした。

研究成果の概要（英文）：Both myocardial fibrosis and reduce catecholamine sensitivity had been fully demonstrated to be involved in pathogenesis of heart failure. However, the molecular mechanisms that underlie myocardial fibrosis remain incompletely understood. First, we performed microarray analysis for a total of 485 miRNAs using endomyocardial biopsy specimen from 14 patients with idiopathic dilated cardiomyopathy (DCM). Out of 485 miRNAs, 7 were differentially expressed in the myocardium with reduced catecholamine sensitivity. Second, 7 miRNAs were differentially expressed significantly in 4 patients with severe myocardial fibrosis compared with 4 patients with less severe myocardial fibrosis. We demonstrated that 4 specific miRNAs could play key roles in myocardial fibrosis in patients with DCM.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００９年度	1,800,000	540,000	2,340,000
２０１０年度	1,000,000	300,000	1,300,000
２０１１年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総　計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、マイクロＲＮＡ、心筋線維化

１．研究開始当初の背景

心不全の発症や有病率は高齢になるほど増加することが知られている。世界に類を見ない速度で高齢化が進行している我が国では、

心不全の病態解明と発症予防、さらに適切な治療法の開発は医学のみならず社会保障上の観点からも急務の課題になっている。心不全の病態に対する理解は過去 20 年間に劇的な進歩を遂げた。以前は、心不全はポンプ不全と体液過剰が病態の中心であると考えられていたが、近年、心不全の進展機序には神経体液性因子の過剰な賦活化の関与が大きいことが明らかとなってきた。これら過剰に賦活化されたレニン･アンジオテンシン系および交感神経系を抑制するアンジオテンシン変換酵素阻害薬やβ遮断薬は心筋障害の進展を抑制するとともに心不全の予後を改善し、心不全治療にパラダイムシフトを起こした。しかし、このような科学的根拠に基づいた医療が実施されているにもかかわらず、心筋障害を直接修復する段階には至っておらず、心筋障害がさらに進展することを防ぐ範疇にとどまっているのが心不全治療の現状である。実際、心不全治療に反応しない難治症例は数多く存在し、難治症例に対しては心臓移植が唯一の治療法となっている。心筋障害を直接修復するためには、心不全治療に新しい展開をもたらす新たな薬理作用ターゲット分子の発見が切望されている。

我々は、心不全の主要な原因疾患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、高血圧の感受性遺伝子についても同定した。これら心筋梗塞の非梗塞部や非虚血性の高血圧性不全心、拡張型心筋症では、心筋収縮･拡張障害の機序として、心筋細胞内 Ca2+調節の異常が深く関わっていることが明らかになっている。我々は、拡張型心筋症および、肥大型心筋症、高血圧性肥大心における心筋細胞内 Ca2+調整関連タンパクの遺伝子発現異常と心筋収縮・弛緩予備能の異常や病態の進展との関連について、数年来、研究を続けてきた。また、不全心では、過度の線維化によりコンプライアンスが低下し拡張機能は障害されるが、我々は、ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬（スピロノラクトン）の１年間の投与により、軽症拡張型心筋症患者における心筋線維化が改善するとともに左室拡張機能障害も改善することを報告した。さらに、抗アルドステロン作用を有する長時間作用型利尿薬のトラセミド投与により慢性心不全患者における交感神経系の過剰な賦活化が抑制されることも報告した。

最近 microRNA(miRNA)は遺伝子発現を調節する重要な因子であることが明らかにされてきた。miRNA は 21～24 塩基からなり、mRNA と結合することにより翻訳を抑制したり mRNA そのものを分解したりする働きがある。また、miRNA は臓器特異性が高いことも明らかになってきた。したがって、不全心筋細胞において発現している miRNA を同定することは、不全心における収縮･弛緩障害への miRNA の関与を解明するための第一歩といえる。

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) 心不全の病態として注目されている酸化ストレス-炎症-線維化プロセスにどのような miRNA が関与しているかを明らかにすること、

(2) 探索同定した miRNA が、どのような細胞プロセスを制御しているのか明らかにすること、

(3) 探索同定した miRNA の標的遺伝子を明らかにすること、である。

上記目的を達成するために我々は、心筋生検標本における miRNA 発現の網羅的解析、および特定の miRNA 発現レベルの定量的解析を行うと同時に、心筋収縮･弛緩予備能等の生理学的機能評価と病理学的評価を行い、miRNA の機能異常が不全心の病態形成にどのように関与しているか、包括的に解析する。

３．研究の方法

New York Heart Association (NYHA)クラス II 度の拡張型心筋症患者 45 例を対象とした。拡張型心筋症の診断は Ejection Fraction(EF)が 50%以下で、冠動脈造影で冠動脈疾患を認めず、心エコー等にて弁膜疾患や二次性心筋症を否定した症例を対象とした。

血液検査により脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、血中カテコラミン濃度を測定した。また、心エコー検査を施行した。さらに心臓カテーテル検査にて左室拡張末期圧(EDP)を、左室造影に左室駆出率を測定した。一部の症例（14 症例）ではドブタミンを負荷することによる心拍数、血圧、左室内圧一時微分(*LV dP/dt*)の変化を測定した。*LV dP/dt* の測定はマイクロマノメーターを左室に留置して、安静時とドブタミン 5γ、10γ 負荷時に測定した。さらに右室中隔より心筋生検を行い、得られた心筋は液体窒素を用いて冷凍保存した。

冷凍保存した心筋細胞標本における miRNA を測定した。上記ドブタミン負荷試験を行った 14 症例を含む 22 症例から得た心筋生検標本において mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, TX, USA)を用いて RNA を抽出し、NCode miRNA Amplification System (Invitrogen, CA, USA)にて増幅を行い、mirVana miRNA Bioarray V9.2 (Ambion)にて 485 種類の miRNA をラベルし、GenePix 4000B scanner (Axon Instruments, CA, USA)を使用しアレイのスキャニングを行い、Array-Pro Analyzer Ver4.5 (Media Cybernetics)を用

いて得られたイメージ画像から各スポットにおける蛍光強度値の定量化をし、ノーマライゼーションをした後にデータ解析を行った。

次に、上記とは別の 14 症例から得た心筋生検標本を用いて、上記マイクロアレイによる miRNA 発現プロファイリングにより心筋線維化との関連が同定された 7 種類の miRNA を含む 12 種類の miRNA レベル（miRNA-1, miRNA-21, miRNA23a, miRNA-125a, miRNA-133b, miRNA-135b, miRNA-208, miRNA-210, miRNA-514, miRNA-548b, miRNA-562, miRNA-624）を定量的 RT-PCR 法により評価した。

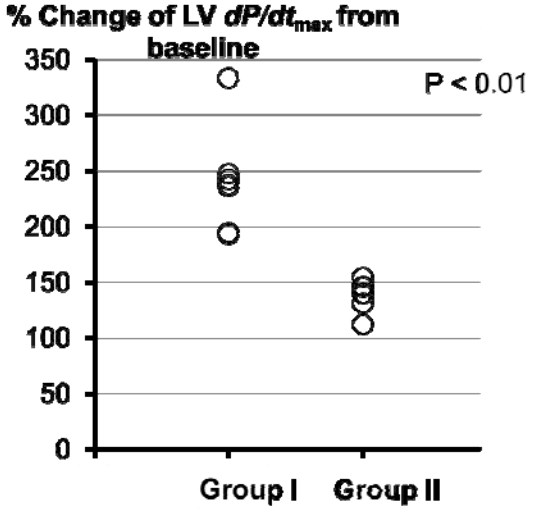
最後に、残りの 9 症例から得た心筋生検標本を用いて定量的 RT-PCR 法を行い、上記にて同定された miRNA レベルの再現性を別の標本においても確認した。

本研究プロトコルは藤田保健衛生大学医学部倫理委員会および名古屋大学医学部倫理委員会による承認を得た後、各症例から文書による同意を得て行った。

４．研究成果

（１）左室収縮予備能障害に関与する miRNA の網羅的探索：

ドブタミン負荷試験を行った 14 症例を安静時の LV dP/dt 値と比較して最大ドブタミン負荷時の LV dP/dt 増加率が 90%以上の症例を Group I、90%以下の症例を Group II として 2 グループに分類した(図)。



両グループ間に内服薬、心エコー所見、EDP、BNP、血中カテコラミン濃度は有意差を認めなかった。心拍数は安静時、ドブタミン負荷とも両グループ間に有意差を認めなかった。収縮期血圧は安静時では両グループ間に有意差を認めなかったがドブタミン 10γ負荷では Group I で有意に高かった。LV dP/dt は安静時では両グループ間に有意差を認めなかったがドブタミン 10γ負荷時では Group I で有意に高く、LV dP/dt の変化率もドブタミン 10γ負荷時で Group I で有意に高かった。

心筋生検標本のマイクロアレイ解析の結果、32 種類の miRNA の発現量に両グループ間で有意差（P ＜ 0.05）を認めた。

（2）左室拡張機能障害および心筋線維化に関連する miRNA の網羅的探索：

私たちは冠動脈造影にて異常を認めない８例の拡張型心筋症の患者さんを対象に検討を行った(下表)。

Patient characteristics

Patients were divided into 2 groups on the basis of median value of CVF.

	Group I *CVF ≥ 3%*	*Group II* *CVF < 3%*
Number	4	4
Age (yrs)	63 ± 10	67 ± 6
Sex (M/F)	3 / 1	2 / 2
NYHA functional class (I/II)	0 / 4	0 / 4
Plasma BNP level (pg/mL)	74 ± 43	89 ± 46
CVF (%)	4.4 ± 0.9	2.3 ± 0.3

Data are means ± SD

４例(Group I)が組織ドップラー法に基づく評価にて左室拡張機能障害を認め(E/E'≥15)、４例（Group II）は左室拡張機能が正常であった。左室拡張障害を認める症例と認めない症例との間で左室駆出率に差は認めなかった（34% vs. 28%)。左室拡張機能障害を認める症例では、拡張機能が正常な症例と比較して心筋生検標本における線維組織密度が高く（4.4% vs. 2.3 %)、また、凍結心筋生検標本のマイクロアレイによる解析結果から、７種類のマイクロ RNA が有意に（P< 0.01）異常発現していることが明らかとなった。

（３）左室拡張機能障害および心筋線維化に関連する miRNA の定量的解析：

次に私たちは新たに拡張型心筋症で心筋生検を行った 14 症例を対象に左室心筋生検標本の一部を用いて、定量的 RT-PCR 法によ

り、上記、心筋線維化との関連が同定された7種類のmiRNAを含む12種類のmiRNAレベル（miRNA-1, miRNA-21, miRNA23, miRNA-125a, miRNA-133b, miRNA-135b, miRNA-208, miRNA-210, miRNA-514, miRNA-548b, miRNA-562, miRNA-624）を評価した（下図）。

Real time-PCR (ΔΔCT method)

	Group A CVF ≥ 3%	Group B CVF < 3%
miR-1	0.43 ± 0.21*	0.74 ± 0.26
miR-23	0.37 ± 0.17*	0.70 ± 0.17
miR-125a	0.98 ± 0.35	1.21 ± 0.14
miR-135b	0.55 ± 0.37	1.62 ± 1.92
miR-210	0.57 ± 0.22*	0.81 ± 0.03
miR-514	0.38 ± 0.45	0.99 ± 0.80
miR-624	0.28 ± 0.11*	0.54 ± 0.29

Data are means ± SD, p*< 0.05 vs. Group B

解析の結果、心筋生検標本において心筋線維化の程度が進行している症例（Group A）ではmiRNA-1, miRNA-23, miRNA-210, miRNA-624のレベルが、心筋線維化の程度が進行していない症例（Group B）と比較して有意に（$p<0.05$）小であった。miRNA-1およびmiRNA-23は以前より心不全の進展に関与していることが報告されている。私たちは、miRNA-1およびmiRNA-23が心筋線維化を介して心不全進展に関与している可能性、およびmiRNA-210およびmiRNA-624が心筋線維化の進展に関与している可能性を、今回の検討で初めて発見した。

最後に、拡張型心筋症で心筋生検を行った9症例で再度、RT-PCRによるmiRNAの定量的発現レベルを検討した結果、上記と同様にmiRNA-1, miRNA-23, miRNA-210, miRNA-624の発現低下を認めた。さらに心筋線維化が進行し上記4種類のmiRNA発現低下を認める症例では、心筋線維化が進行していない症例と比較して、血中NT-ProBNP濃度が有意に（$p<0.05$）低下していた（2413±1574 vs. 472±153 pg/mL）。また、心筋線維化が進行している症例では心筋線維化が進行していない症例と比較して、血中アルドステロン濃度が低下する傾向（$p=0.052$）にあった（109±65 vs. 42±41 pg/mL）。しかしながら、その他の血中バイオマーカー（高感度CRP, MMP-3、ICTP, IL-6等）には差を認めなかった。

以上の結果から、私たちは心筋カテコラミン感受性低下に関連した7種類のmiRNA発現異常を同定することに成功した。さらに、心筋線維化と関連した7種類のmiRNA発現異常も同定するとともに、定量的RT-PCR解析により最終的に4種類のmiRNAが心筋線維化に関与している可能性を見いだした。不全心モデルではいくつかのmiRNAが心不全の進展過程や心筋線維化と関連することが報告されているが、臨床の標本を用いた解析結果はほとんど報告されていない。

今回、私たちは世界で初めて、心筋線維化に関与する可能性のあるmiRNAを同定することに成功した。特に、今回解析対象としたDCMは欧米と比較して我が国での有病率が高く、我が国の心不全医療へ寄与する結果と考える。今後、今回の研究で同定に成功したmiRNAが標的とするmRNAの探索、およびそのmRNAの機能解析を通して、心不全の病因解明や、新たな分子治療ターゲットの同定に結びつくものと考えられる。

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１件）

1. Funahashi H, Izawa H, Hirashiki A, Cheng XW, Inden Y, Nomura M, Murohara T. Altered microRNA expression associated with reduced catecholamine sensitivity in patients with chronic heart failure. J Cardiol. 2011 May;57(3):338-44. 査読あり

〔学会発表〕（計３件）

1. Kinoshita K, Izawa H, Kato Y, Yokoi H, Fujiwara W, Cheng XW, Hirashiki A, Mizoguchi Y, Ohtsuki M, Ishii J, Morimoto S, Murohara T, Ozaki Y, Nomura M. Micro RNA Could Play Key Roles in Progression of Myocardial Fibrosis in Patients with Heart Failure. American Heart Association, Scientific Sessions 2011, 2011年11月14日、オーランド（米国）
2. Izawa H, Kato Y, Yokoi H, Fujiwara W, Cheng XW, Mizoguchi Y, Morimoto S, Murohara T, Ozaki Y, Nomura M. Micro RNAs could play key roles in progression of left ventricular diastolic dysfunction involved in myocardial fibrosis in patients with heart failure. European Society of Cardiology, Congress 2010, 2010年8月29日、ストックホルム（スエーデン）

3. Izawa H, Hirashiki A, Funahashi H, Cheng XW, Kobayashi M, Harada K, Murase Y, Unno K, Shintani S, Nagata K, Ozaki Y, Yokota M, Nomura M, Murohara T. Micro RNAs Could Play a Critical Role in Progression of Diastolic Dysfunction in Mildly Symptomatic Patients with Chronic Heart Failure. American Heart Association, Scientific Sessions 2009, 2009 年 11 月 17 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･教授

研究者番号：80402569

(2)研究分担者

尾崎　行男（OZAKI YUKIO）（21-23 年度）

藤田保健衛生大学･医学部･教授

研究者番号：50298569

成　憲武（XIAN WU CHENG）（21 年度）

名古屋大学･医学部･講師

研究者番号：30378228

(3)連携研究者

成　憲武（CHENG XIAN WU）（22-23 年度）

名古屋大学･医学部･講師

研究者番号：30378228

野村　雅則（NOMURA MASANORI）（21-22 年度）

藤田保健衛生大学･医学部･教授

森本 紳一郎(MORIMOTO SHINICHIRO)(21-23 年度)

藤田保健衛生大学･医学部･教授

室原　豊明（MUROHARA TOYOAKI）（21 年度）

名古屋大学･大学院医学系研究科･教授

研究者番号：90299503

平敷　安希博（HIRASHIKI AKIHIRO）（21 年度）

名古屋大学･医学部･助教

研究者番号：10418741