

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
総括分担研究報告書

研究分担者 磯部 光章（東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科 循環制御内科学 非常勤講師）

特発性心筋症に関する調査研究

研究要旨

本研究班は、1974年に旧厚生省特定疾患調査研究班として、特発性心筋症の疫学・病因・診断・治療を明らかにすべく設立され、その後約40年間継続して本領域での進歩・発展に大きく貢献してきた。本研究は、心筋症の実態を把握し、日本循環器学会、日本心不全学会と連携し診断基準や診療ガイドラインの確立をめざし、研究成果を広く診療へ普及し、医療水準の向上を図ることを目的とした。研究班による全国規模での心筋症のレジストリー、特定疾患登録システムの確立を推進準備し、心筋症をターゲットとした登録観察研究であるサブグループ研究を開始し、登録をすすめた。また、研究成果の社会への還元として、ホームページ公開や市民公開講座を行った

A. 研究目的

サルコイドーシスなど炎症を基盤とした心筋症が特発性心筋症と診断されている症例の中には少なからず含まれている。とりわけ、心臓限局性心サルコイドーシス症（心サ症）には、臨床的特徴が明らかなではないこと、拡張型心筋症との鑑別を行うためには心筋生検による組織診断が得られないと困難であるという問題点を抱えている。上述の問題点から心サルコイドーシスの新規バイオマーカーの開発が重要であると考え、その候補としてマイクロRNA（miRNA）に着目した。miRNAは、18～26塩基で構成されたnon-coding RNAであり、相補的な配列のmRNA配列に結合して翻訳反応の阻害やmRNAの分解を引き起こし、標的遺伝子のタンパク産生を抑制する。近年になりmiRNAは細胞内で発現するだけでなく、細胞外小胞exosomeに内包された状態で細胞外に分泌され、分解されることなく他の細胞に伝達されることがわかってきた(Loyer X et al. *Circ Res.* 2014)。ストレスを受けた細胞ではこのexosomeの分泌が増加し、患者と健常者ではexosome中のmiRNAの組成が異なることが報告されている(Taylor DD et al. *Gynecol Oncol.* 2008)。そのため、このようなmiRNAが種々の疾患の新たなバイオマーカーとして注目されている。過去の研究では肺サルコイドーシス患者において、その気管支肺胞洗浄液中のexosome濃度の増加がみられたことや(Qazi KR et al. *Thorax.* 2010)、肺組織中で特定のmiRNAの発現量が増加していたこと(Crouser ED et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012)が報告されている。このことから、心サルコイドーシスにおいても疾患特異的なmiRNAがexosomeに内包されて分泌されている可能性があり、それが同定されれば新たなバイオマーカーとして期待できる。さらに、本研究では心サルコイドーシスに特異的な遺伝子変異の探索も行う。心サルコイドーシスの原因またはその感受性を左右する遺伝的要因を解明することによって、簡便かつ速やかに実用可能なバイオマーカーおよび検査法を開発を目指す。

B. 研究方法

東京医科歯科大学循環器内科に通院している心サルコイドーシスと診断されている患者20名と対照群としての健常者10名よりそれぞれ同意を取得の上、血清を採取した。この血清からexosome分画を単離し、このexosome試料液からDNAおよびmiRNAを含むsmall RNAの抽出を行った。抽出された核酸からシーケンス用サンプルを調製したうえで次世代シーケンサIon Protonシステムを用いてシーケンスを行った。そして、得られたシーケンスデータをデータベースから取得したヒトゲノム

リファレンス配列にマッピングし、遺伝子の変異検出および発現解析を行い、結果をコントロールと比較した。RNAシーケンスにおいて患者群のエクソソームで増加していたmiRNAについてはReal-time RT-PCRを用いてその発現を確認した。

さらにマクロファージ細胞株RAW264.7をリポ多糖とコンカナバリンAで刺激し類上皮細胞肉芽腫モデル(Yanagishita T et al., *Arch Dermatol Res.* 2007)を作製し、上記のmiRNAの発現をリアルタイムRT-PCRで調べた。

（倫理面への配慮）

本研究を立案して施行するにあたり、本学の医学部遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会に諮り、平成28年10月25日付けで承認を受けた（G2016-004-01番）。本研究はこの申請して承認された内容に基づいて患者本人からのインフォームド・コンセントを取得した上で施行しており、研究対象者となる患者が研究参加を拒否できるように十分配慮している。いずれの段階でも拒否でき、拒否による不利益はないものとする。このように、本研究を遂行するにあたり、倫理面で十分な配慮がなされているものとする。

C. 研究結果

RNAシーケンスにより患者群で増加していた3種類のmiRNAを候補として選出した。これらのmiRNAの発現量をReal-time RT-PCRで確認したところ、いずれのmiRNAの発現も患者群の血清エクソソームで有意に増加していた。さらにそのうち2種類のmiRNAについては患者由来エクソソームに加えて類上皮細胞肉芽腫モデルにおいても有意な発現の増加が確認された。本研究により、特定のエクソソームmiRNAが心サルコイドーシスのバイオマーカーとして有用である可能性が示された。

D. 考察

上述の通り、心サルコイドーシスのバイオマーカーになり得る2種類のmiRNAの存在が確認された。miRNAは遺伝子の発現調節に関与するため、疾患の発症機序を解明する手がかりとなるかもしれない。そのため、今回識別された2種類のmiRNAの病態に及ぼす作用についても将来的に明らかにしていく計画である。

E. 結論

心サルコイドーシスの核酸バイオマーカー候補として2種類のmiRNAを見出した。今後はこれらの候補が心サルコイドーシスの診断や治療の標的分子として本当に

有用かどうかについて検討していく。

F. 健康危険情報
なし

G. 学会発表

1. 論文発表

- ① Isobe M: The Heart Failure “Pandemic” in Japan: Reconstruction of Health Care System in the Highly Aged Society. **JMA J** 2019;2(2):103-112.
- ② Endo J, Sano M, Izumiya Y, Tsujita K, Nakamura K, Tahara N, Kuwahara K, Inomata T, Ueda M, Sekijima Y, Ando Y, Tsutsui H, Isobe M, Fukuda K: A statement for the appropriate administration of tafamidis in patients with transthyretin cardiac amyloidosis. **Circ J** 84: 15-17, 2019
- ③ Komuro I, Kaneko H, Morita H, Isobe M, Nakayama H, Minematsu K, Yamaguchi T, Yazaki Y: Nationwide Actions against Heart Failure Pandemic in Japan-What should we do from academia?-. **Circ J** 83(9):1819-1821, 2019
- ④ Nakayama H, Minematsu K, Yamaguchi T, miyamoto T, komuro I, Yazaki Y: Stroke and Cardiovascular Disease Control Act was approved in Japan: Comprehensive nationwide approach for prevention, treatment and patients support. **Int J Stroke** 15(1):7-8, 2020.
- ⑤ Kamiya K, Yamamoto T, Tsuchihashi- Makaya M, Ikegame T, Takahashi T, Sato Y, Kotooka N, Saito Y, Tsutsui H, Miyata H, Isobe M: Nationwide survey of multidisciplinary care and cardiac rehabilitation for patients with heart failure in Japan –An analysis of the AMED-CHF study- **Circ J** 83:1546-1552, 2019
- ⑥ Komuro J, Nagatomo Y, Mahara, K. Isobe M, Goda A, Sujino Y, Mizuno A, Shiraishi Y, Kohno T, Kohsaka S, Yoshikawa T: Clinical Scenario Classification for Characterization and Outcome Prediction of Acute Decompensated Heart Failure under Contemporary Phenotyping. **Circ Rep** 1(4):162-170, 2019
- ⑦ Kitagawa T, Hidaka T, Naka M, Isobe M, Kihara Y; Current Medical and Social Conditions and Outcomes of Hospitalized Heart Failure Patients: Design and Baseline Information of the Cohort Study in Hiroshima. **Circ Rep** 1: 112–117, 2019.

- ⑧ Nunoda S, Sasaoka T, Sakata Y, Ono M, Sawa Y, Isobe M: Survival of Heart Transplant Candidates in Japan. **Circ J** 83(3): 681-383, 2019

2. 学会発表（発表誌面巻号・ページ・発行年等も記入）

- ① Ryo Watanabe, Yasuhiro Maejima, Takashi Nakaoka, Tetsuo Sasano, Mitsuaki Isobe, Toshihiro Tanaka. Exploration of novel biomarkers for cardiac sarcoidosis by expression analysis of circulating exosomal microRNAs. The 3rd JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research, Tokyo, 2019.9
- ② 渡邊亮、前嶋康浩、中岡隆志、磯部光章、田中敏博. 血中エクソソーム内包マイクロRNAの発現解析による心サルコイドーシスの新規バイオマーカーの探索. 第5回日本心筋症研究会、札幌、2019年7月
- ③ 磯部光章 AMED心不全研究について、AMED心不全磯部班・分担研究「高齢心不全患者の医療・介護負担とリハビリ介入の効果に関する前向き研究」中間成績報告会、新潟、2019
- ④ 磯部光章：脳卒中・循環器病対策基本法制定により何が変わるか 第23回日本心不全学会学術集会 2019年10月、広島国際会議場
- ⑤ 磯部光章 慢性心不全患者に対する多職種介入を伴う外来・在宅心臓リハビリテーションの臨床的効果と医療経済的効果を調べる研究、2018年度6事業合同成果報告会、東京、2019
- ⑥ 磯部光章：2019年学会賞受賞講演 心臓移植医療の質の向上を目指して 第23回日本心不全学会学術集会 広島国際会議場 2019年10月5日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし