



不整脈疾患と microRNA

東京医科歯科大学保健衛生学研究科生命機能情報解析学
笹野哲郎

I. マイクロRNAとは

ヒトのDNAは約30億塩基対であるが、そのうちタンパクをコードする遺伝子(coding gene)はわずか1.5%であり、遺伝子数も約26,000にすぎなかった。ショウジョウバエの遺伝子数が約14,000であることを考えると、その機能の多様性と比較してヒトの遺伝子数は驚くほど少ない。

では、遺伝子でない多くの部分は何をしているのか。残りの大部分のDNAは、以前は何もしていないと思われていた。近年、哺乳類においては、この遺伝子以外の部分にはアミノ酸へと翻訳されないRNAである“non coding RNA”が数多く存在し、それらによる遺伝子発現制御機構が重要であることが明らかとなってきた。Non coding RNAにはいくつかの種類があるが、そのなかで最も短いものをマイクロRNA (microRNA : miR) とよぶ。マイクロRNAは、21～25塩基の短いRNAで、ターゲット遺伝子の3'-UTR (untranslated region : 非翻訳領域) に結合して、mRNAの翻訳を抑制、あるいはmRNAそのものの分解によってターゲット遺伝子に対し、抑制的に作用する(図)。マイクロRNAの配列のなかで重要なのが、2～8番目の配列である。この部分の配列をseed sequenceとよび、この配列がター

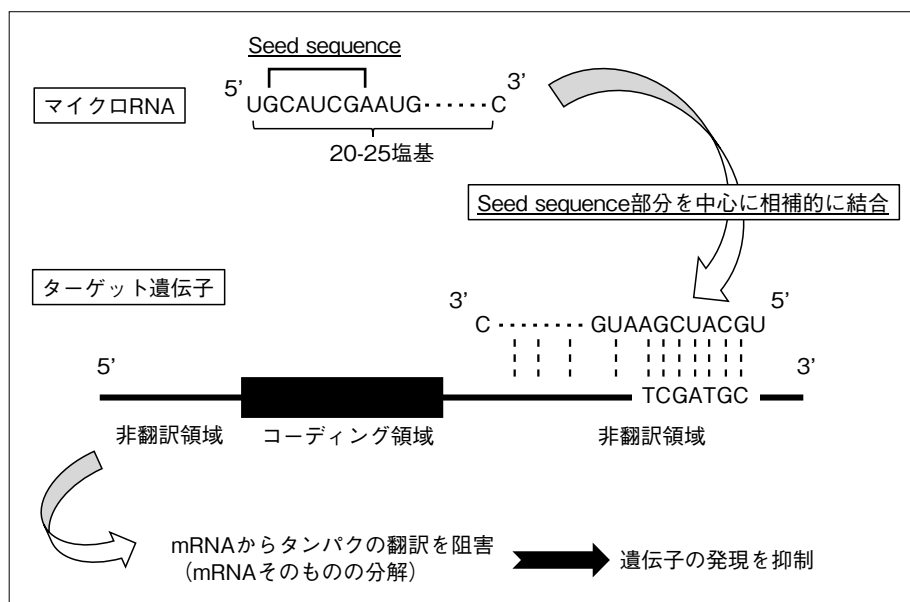


図 マイクロRNAの作用機序

表 心房細動の進展に関与するマイクロ RNA

miR	主なターゲット遺伝子	主な作用点
miR-1	<i>Kcnj2, Gja1</i>	I _{K1} , Connexin-43
miR-21	<i>Spry1, Pdc4</i>	Fibrosis, apoptosis
miR-26	<i>Kcnj2</i>	I _{K1}
miR-27b	<i>Gja5</i>	Connexin-40
miR-29	<i>Col1a1, Col3a1</i>	Fibrosis
miR-30	<i>Ctgf</i>	Fibrosis
miR-133	<i>Ctgf, Tgf-β</i>	Fibrosis
miR-155	<i>Cacna1c</i>	Ca ²⁺ current
miR-208	<i>Thrap1</i>	Fibrosis
miR-328	<i>Cacnb1, Cacna1c</i>	Ca ²⁺ current
miR-499	<i>Kcnn3</i>	I _{Kca} current
miR-590	<i>Tgf-β1</i>	Fibrosis

ターゲット遺伝子の 3'-UTR と相補的に結合することによって、マイクロ RNA がはたらく。Seed sequence 以外の部分では、マイクロ RNA とターゲット遺伝子は必ずしも完全な相補的配列を必要としないのが特徴である。マイクロ RNA 配列と対応するターゲット遺伝子配列が完全に相補的である場合は mRNA の分解が、そうでない場合は翻訳抑制が生じると考えられており、マイクロ RNA の効果はほとんどが後者の翻訳抑制である。

RNA によって mRNA やタンパクの発現を制御する現象を RNA 干渉とよぶ。遺伝子発現を抑制する RNA としては、small interference RNA (siRNA) がよく知られている。siRNA は人工的に作成した約 20 塩基対の 2 本鎖 RNA であり、ターゲット遺伝子の mRNA (3'-UTR である必要はない) に結合して mRNA を分解し、その作用を強力に抑制する。このとき、siRNA とターゲット遺伝子の間には高い相補性が要求され、数塩基が異なっても、その効果はほぼ消失する。これに対して、マイクロ RNA とターゲット遺伝子の結合は、前述の seed sequence において結合していれば、他の部位については高い自由度がある。これは、ターゲット遺伝子の候補が多くなることを意味する。すなわち、ひとつのマイクロ RNA が制御する mRNA がひとつだけということとはほとんどなく、ひとつのマイクロ RNA が多数の mRNA の発現を制御する。また、ひとつの mRNA は複数のマイクロ RNA の制御をうけることになる。これは、ほぼ 1 対 1 の対応をとる siRNA と大きな差異がある。また、siRNA による mRNA のノックダウン効果は強力であるのに対し、マイクロ RNA による翻訳抑制作用はそれほど強くないことが多い。ひとつの遺伝子に対して、多数のマイクロ RNA がそれぞれ作用し、タンパク発現をコントロールすることが、生理的あるいは病態生理的に重要と考えられる。

II. 不整脈疾患の病態におけるマイクロ RNA の関与

不整脈疾患におけるマイクロ RNA の関与は、心房細動(AF)を中心に検討されている(表)。AFは、主として肺静脈周囲心筋スリーブから生ずる異所性興奮をトリガーとして開始するが、その維持には心房リモデリングが影響している。心房リモデリングは、心房筋のイオンチャネル発現変化による電气的リモデリングと、心房内の線維化などによる組織的リモデリングに分けられる。この心房リモデリングにおけるマイクロ RNA の関与について述べる。

1. 電气的リモデリング

イオンチャネルの発現を制御するマイクロ RNA として、まず miR-1が注目された。miR-1は心筋に多く発現しているマイクロ RNA であり、そのターゲット遺伝子は数多いが、 I_{K1} チャネルをコードする *Kcnj2*が含まれる。miR-1は AF 症例の心房組織で発現が減少し、 I_{K1} の発現亢進による心房筋の有効不応期(ERP)の短縮が電气的リモデリングを惹起していた¹⁾。また、 I_{K1} チャネルに関しては、イヌ心房高頻度ペーシングモデルにおいて、miR-26が減少し、これも *Kcnj2*を制御することが示された²⁾。

Ca^{2+} 電流に関しては、イヌの心房高頻度ペーシングによる AF モデルで miR-328の発現が増強していることが報告され³⁾、一方、AFの左心耳サンプルにおけるマイクロ RNA の網羅的解析により、miR-155の発現が増加していることが報告された⁴⁾。miR-328、miR-155のターゲットは、いずれも L型 Ca^{2+} チャネル α サブユニット *Cacna1c*であり、 Ca^{2+} 電流を減少させることで ERP を短縮させた。

さらに、持続性 AF 症例の心房サンプルにおいて miR-499の発現が上昇していることも報告された⁵⁾。miR-499は、 Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネル(SK3チャネル)をコードする *Kcnn3*をターゲット遺伝子としていた。*KCNN3*遺伝子は、ゲノムワイド関連解析によって AF との関連が認められた遺伝子でもある。さらにわれわれは、高脂肪食モデルマウスにおいて miR-27bが心房筋のギャップジャンクションチャネルである Cx40の発現を抑制し、心房の催不整脈性を上昇させることを新たに見いだした⁶⁾。

2. 組織的リモデリング

マイクロ RNA と心房線維化の関与について、ラット心筋梗塞モデルにおいて心房組織で miR-21が低下していることが明らかとなった⁷⁾。miR-21は *Sprouty-1* (*Spry1*)をターゲット遺伝子とし、心室の線維化に作用することが示されている⁸⁾が、心房の組織的リモデリングにも関与していると考えられる。また、プロコラーゲンをターゲット遺伝子とする miR-29の発現低下⁹⁾や、イヌ AF モデルにおける miR-30, 133の発現低下¹⁰⁾などが報告され、これらは CTGF (connective tissue growth factor)を制御することから、線維化促進への関与が考えられる。また、miR-133, 590は TGF- β をターゲットとするマイクロ RNA であるが、イヌ AF モデルではこれらの発現が低下し、線維化促進に寄与することも示された¹¹⁾。

以上のように、AFの病態とマイクロ RNA に関しては多くの報告があり、関与するマイクロ RNA が各報告によって異なっている。これは、異なる動物種および疾患モデル動物や、異なる基礎疾患による臨床サンプルをもとに行われていることが一つの理由ではあるが、AFの病態には、数多くのマイクロ RNA が複合的に作用していることを示す結果ともいえる。マイクロ RNA と病態の関連については、マイクロ RNA、mRNAともにネットワークとして複合的に理解する必要がある。

Ⅲ. バイオマーカーとしてのマイクロ RNA

細胞から放出されたマイクロ RNA は、血中で exosome や microvesicle などに含まれて循環している。また、主として RNA 結合タンパクである ago2 と結合しており、RNA 分解酵素から守られている¹²⁾。このため、mRNA などとは異なり、血中での発現が安定しているという特徴がある。これを利用して、血漿あるいは血清中のマイクロ RNA の定量を行うことで、疾患の発症予測や重症度評価のバイオマーカーとしての応用が試みられている。

不整脈との関連においては、AF 症例で結晶中の miR-150 の発現が増加していること¹³⁾や、AF に対してカテーテルアブレーションを施行した症例で、術前には発現量が低下していた miR-409-3p および miR-432 が術後に回復することなどが報告されている¹⁴⁾。また、心筋梗塞後には miR-1, 133 の血中濃度が上昇するが、その程度が高い症例には心室不整脈の合併が多いとの知見より、心室不整脈の発症予測についても期待される。

血中のマイクロ RNA 定量は、どの臓器から放出されてもその量が増えるので、バイオマーカーとして用いるためには、臓器および疾患特異的に変化するものを選択する必要がある。また、マイクロ RNA の測定には定量的 PCR が多く用いられるが、血液中のヘパリンが PCR 反応を阻害することもよく知られており、カテーテル治療前後のマイクロ RNA 定量とその解釈には注意が必要である。

また、前項と同様に、疾患モデルや背景因子によって、例えば AF においても血中マイクロ RNA の発現パターンは異なり、必ずしも共通した結果は得られない。将来的には、単一のマイクロ RNA の定量ではなく、疾患に関連する複数のマイクロ RNA パネルを用いて複合的に評価することで、バイオマーカーとしての精度が高まることが期待される。

Ⅳ. 治療手段・治療ターゲットとしてのマイクロ RNA

マイクロ RNA が病態生理に深くかかわることが明らかになるに従い、マイクロ RNA を治療に応用する試みが行われている。

治療戦略としては、①マイクロ RNA を細胞に導入してターゲット遺伝子の発現を抑制する、②疾患特異的に増加しているマイクロ RNA に対し、相補的に結合する RNA (antagomiR あるいは anti-miR) を導入して、マイクロ RNA の作用を抑制する、③マイクロ RNA のターゲット配列をもつ DNA を細胞に多量に導入し、マイクロ RNA をそちらに結合させてターゲット遺伝子への結合を抑制する、といった手法が考えられている。②はひとつのマイクロ RNA に着目した治療であり、③はひとつのターゲット遺伝子に着目した治療といえる。

遺伝子全長を導入しようとする従来の遺伝子治療に比べると、マイクロ RNA を利用した遺伝子・核酸治療は、その塩基数が小さいことにより、ウイルスやほかのベクターによる細胞への導入効率が高いという利点がある。しかし、マイクロ RNA はそのターゲット遺伝子を複数もつことから、標的としない遺伝子の発現を変化させてしまう、オフターゲット効果が生じやすいことも考えられ、臨床応用の上では注意が必要である。

〔文 献〕

- 1) Girmatsion Z, Biliczki P, Bonauer A, Wimmer-Greinecker G, Scherer M, Moritz A, Bukowska A, Goette A, Nattel S, Hohnloser SH, Ehrlich JR : Changes in microRNA-1 expression and IK1 up-regulation in human atrial fibrillation. *Heart Rhythm*, 2009 ; 6(12) : 1802 ~ 1809
- 2) Luo X, Pan Z, Shan H, Xiao J, Sun X, Wang N, Lin H, Xiao L, Maguy A, Qi XY, Li Y, Gao X, Dong D, Zhang Y, Bai Y, Ai J, Sun L, Lu H, Luo XY, Wang Z, Lu Y, Yang B, Nattel S : MicroRNA-26 governs profibrillatory inward-rectifier potassium current changes in atrial fibrillation. *J Clin Invest*, 2013 ; 123(5) : 1939 ~ 1951
- 3) Lu Y, Zhang Y, Wang N, Pan Z, Gao X, Zhang F, Zhang Y, Shan H, Luo X, Bai Y, Sun L, Song W, Xu C, Wang Z, Yang B : MicroRNA-328 contributes to adverse electrical remodeling in atrial fibrillation. *Circulation*, 2010 ; 122(23) : 2378 ~ 2387
- 4) Wang JG, Meng X, Han J, Li Y, Luo TG, Wang J, Xin M, Xi JZ : [Differential expressions of miRNAs in patients with nonvalvular atrial fibrillation] . *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2012 ; 92(26) : 1816 ~ 1819
- 5) Ling TY, Wang XL, Chai Q, Lau TW, Koestler CM, Park SJ, Daly RC, Greason KL, Jen J, Wu LQ, Shen WF, Shen WK, Cha YM, Lee HC : Regulation of the SK3 channel by microRNA-499—potential role in atrial fibrillation. *Heart Rhythm*, 2013 ; 10(7) : 1001 ~ 1009
- 6) Takahashi K, Sasano T, Sugiyama K, Kurokawa J, Tamura N, Soejima Y, Sawabe M, Isobe M, Furukawa T : *J Mol Cell Cardiol*, 2016 ; 90 : 38 ~ 46
- 7) Cardin S, Guasch E, Luo X, Naud P, Le Quang K, Shi Y, Tardif JC, Comtois P, Nattel S : Role for MicroRNA-21 in atrial profibrillatory fibrotic remodeling associated with experimental postinfarction heart failure. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2012 ; 5(5) : 1027 ~ 1035
- 8) Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliansky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JT, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S : MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*, 2008 ; 456(7224) : 980 ~ 984
- 9) Dawson K, Wakili R, Ordög B, Clauss S, Chen Y, Iwasaki Y, Voigt N, Qi XY, Sinner MF, Dobrev D, Käb S, Nattel S : MicroRNA29 : a mechanistic contributor and potential biomarker in atrial fibrillation. *Circulation*, 2013 ; 127(14) : 1466 ~ 1465
- 10) Li H, Li S, Yu B, Liu S : Expression of miR-133 and miR-30 in chronic atrial fibrillation in canines. *Mol Med Rep*, 2012 ; 5(6) : 1457 ~ 1460
- 11) Shan H, Zhang Y, Lu Y, Zhang Y, Pan Z, Cai B, Wang N, Li X, Feng T, Hong Y, Yang B : Downregulation of miR-133 and miR-590 contributes to nicotine-induced atrial remodeling in canines. *Cardiovasc Res*, 2009 1 ; 83(3) : 465 ~ 472
- 12) Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogossova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M : Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011 ; 108(12) : 5003 ~ 5008
- 13) Goren Y, Meiri E, Hogan C, Mitchell H, Lebanony D, Salman N2, Schliamser JE2, Amir O3 : Relation of reduced expression of MiR-150 in platelets to atrial fibrillation in patients with chronic systolic heart failure. *Am J Cardiol*, 2014 ; 113(6) : 976 ~ 981
- 14) Liu T, Zhong S, Rao F, Xue Y, Qi Z, Wu S : Catheter ablation restores decreased plasma miR-409-3p and miR-432 in atrial fibrillation patients. *Europace*, 2015 : euu366.