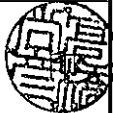


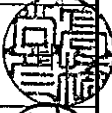
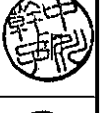
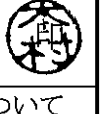


学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ⑩・論	第 578 号	氏名	岩田 英理子
審査委員会委員	主査氏名	高橋 尚彦	
	副査氏名	中川 幹子	
	副査氏名	木村 俊秀	
論文題目 Atrial Fibrillation-Mediated Upregulation of miR-30d Regulates Myocardial Electrical Remodeling of the G-Protein-Gated K ⁺ Channel, <i>I_{K,ACh}</i> (心房細動に関連する miR-30d の過剰発現は心筋の G タンパク質に制御されるアセチルコリン作動性 K チャネルの電氣的リモデリングを調節する)			
論文掲載雑誌名 Circulation Journal			
論文要旨：本研究の目的は AF における電氣的リモデリングへの microRNA の関与の解明である。 【研究対象及び方法】①ヒト心筋検体；大分大学医学部附属病院における開心術の際に採取されたヒト右心耳を凍結保存し用いた。実験は 60-79 歳の男性患者で持続性心房細動(AF)患者 14 例、正常洞調律(NSR)患者 19 例の検体を使用した。両群より総 RNA を回収し、microRNA のマイクロアレイ解析を行った。K ⁺ チャネルと Ca ²⁺ チャネル蛋白の発現をイムノブロット分析した。②胎生ラット心筋細胞；胎生ラット(Wister rat)心筋細胞を単離培養した。細胞に pre-miR-30d または anti-miR-30d を遺伝子導入し、同細胞にパッチクランプ法を用いてアセチルコリン作動性 K ⁺ チャネル電流 (<i>I_{K,ACh}</i>) を記録した。更に、Fura-2 AM を用いて細胞内 Ca ²⁺ 濃度を測定した。【結果】AF 群と NSR 群の検体より検出された 1205 個の microRNA の中で、39 個の microRNA が AF 群において有意に増加/減少していた。このうち、 <i>In Silico</i> 解析により miR-30d のみが心筋イオンチャネルと相互作用の可能性が示唆された。すなわち、miR-30d は AF 群において過剰発現し、その結果、標的イオンチャネルの発現が制御されることが想定される。実際にヒト心房細動心筋では、L 型 Ca ²⁺ チャネル $\alpha 1$ サブユニット遺伝子 (<i>CACNA1C/Cav1.2</i>) とアセチルコリン作動性 K ⁺ チャネル遺伝子 (<i>KCNJ3/Kir3.1</i>) の発現が有意に減少している。この内、 <i>KCNJ3/Kir3.1</i> タンパク発現と <i>I_{K,ACh}</i> は、miR-30d の細胞内導入で有意に抑制され、miR-30d のノックダウンによって有意に増加した。一方、miR-30d の導入は <i>CACNA1C/Cav1.2</i> の発現を変化させなかった。心筋細胞内 Ca ²⁺ 過負荷は miR-30d の発現量の増加と <i>KCNJ3/Kir3.1</i> の発現の低下を促した。また、プロテインキナーゼ C 活性の抑制は細胞内 Ca ²⁺ 過負荷による miR-30d の増加と <i>KCNJ3/Kir3.1</i> の低下を遮断した。【考察および結語】持続性心房細動心筋における <i>I_{K,ACh}</i> の減少と責任遺伝子 <i>KCNJ3/Kir3.1</i> の低下に miR-30d の過剰発現が関連するという、心房細動心筋の電氣的リモデリングにおける新たなシグナル経路を見出した。その結果、miR-30d が心房細動治療における分子治療ターゲットとなることが示唆される。			
本研究により microRNA の AF における電氣的リモデリングの関与が明らかになった。心房細動治療の新たな治療戦略への発展を期待させる有益な知見である。 本研究は、学術上のみならず、临床上においても意義あるものと考えられ、審査委員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 (課)・論	第 578 号	氏名	岩田 英理子
審査委員会委員	主査氏名	高橋 尚秀	
	副査氏名	中川 幹子	
	副査氏名	木村 俊秀	
<p>学位審査申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 心房細動発症には電氣的異常、構造的異常(左房の拡大や線維化など)のどちらが主要な役割を果たしていると考えるか。 2. 細胞内 Ca²⁺上昇をきたす薬剤としてジギタリスが知られている。Table S1 でジギタリスが投与されている患者が 3 名いるが、これらの患者における miR-30d の発現はどうであったか。 3. Ca²⁺イオノフォアとして A23187 を使用しているが、その理由は何か。細胞内 Ca²⁺濃度を増加させる手段として、例えば、isoproterenol を投与したり、心筋に stretch をかけたりしても同様の結果が得られると思うか。 4. miR-30d が心房細動の治療ターゲットになるのであれば、臨床上にどのようなアプローチを行うか。 5. もし、iPS 細胞が使えるのであれば、どのような実験を行いたいか。 6. 慢性心不全の症例は対象から除外したと書かれているが、BNP が著明に高値の症例や AF 群では利尿薬を使用している症例が多い。これらの症例は心不全症例と考えられないか。 7. AF 群では三尖弁輪縫縮術を施行している症例が多いが、severe TR による右心負荷所見があったのではないか。 8. なぜ左心耳ではなく右心耳を用いたのか。左房と右房では結果が異なる可能性はないか。 9. 過去に AF と関連があると報告されている複数の miR が、本研究ではいずれも検出されなかった理由として、心機能や AF の発症からの時間経過により出現する miR が異なっているためと考察されている。従って AF 患者の中で、miR-30d を分子治療のターゲットとする患者を同定するのは難しいのではないか。 10. むしろ、現在は洞調律を維持出来ているが、miR-30d が upregulation している症例は、将来 AF になるリスクが高いという、リスク層別化のマーカーとしての有用性があるのではないか 11. Kir3.1 の活性化に関わる GPCR の生理的なリガンドを列挙せよ。また、そのリガンドや GPCR と AF の相関を概説せよ。 12. miR-30d は、健常者心筋でも高発現している。miR-30d が健常者の心筋で果たす役割を説明せよ。 13. 今回のマイクロアレイでは、AF で増減する既知の miRNA の変化が検出されていない。そこで、本マイクロアレイのポジティブコントロールを説明せよ。 14. 各実験における n 数の差異を説明せよ。 15. 胎生ラットの心筋細胞を用いて一連の実験を行った根拠を説明せよ。 16. miR-30d の細胞内における生理的な濃度と実験で用いた濃度の間の相関について論じよ。 17. PKC と miR-30d の間をつなぐシグナル伝達機構を論じよ。 18. 血中の miRNA について、その放出機構と機能について論じよ。 <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって、審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は 2 本線で抹消すること。