

岩手県における東日本大震災被災者の血清 miRNAs の解析

研究分担者 鈴木 康司（藤田保健衛生大学医療科学部臨床検査学科教授）
研究分担者 坂田 清美（岩手医科大学衛生学公衆衛生学講座教授）
研究協力者 山田 宏哉（藤田保健衛生大学医学部医学科衛生学講座助教）
研究協力者 下田 陽樹（岩手医科大学衛生学公衆衛生学講座助教）

研究要旨

目的：血清 miRNA は、様々な疾患の早期発見や病態把握について有用であり、新たなバイオマーカーとして期待されている。被災者の血清 miRNAs を測定することで、被災などによるストレスの程度や疾患発症との関連を明らかとすることで、被災地で暮らす方々の疾患発症の予防や健康に役立つ情報を明らかにすることを目的とする。

方法：大槌地区の 2,085 名を対象として、本年度は血清 miRNAs の測定に向け、血清からの miRNAs 抽出を行い、miRNAs を逆転写し cDNA の作成を行った。

結果：平成 28 年度は研究計画通り、2,085 検体の血清サンプルより 1. 血清からの miRNAs 抽出、2. miRNAs を逆転写し cDNA を作成の工程を終了した。次年度以降の測定に向けて処理したサンプルを-80℃ 保存した。

結論：「岩手県における東日本大震災被災者の支援を目的とした大規模コホート研究」における研究参加同意者の血清 miRNAs の測定に向け、大槌地区 2,085 名の血清からの miRNAs 抽出ならびに miRNAs を逆転写し cDNA を作成する工程が終了した。

A．研究目的

哺乳類における micro-RNA(miRNA)が発見されてから現在までにヒトにおいて 2,500 種以上の miRNA が同定されている。micro-RNA は標的 mRNA に結合して翻訳阻害を引き起こす。最近の研究で血液中に miRNA が安定的に存在することが示された。血清 miRNA は安定性があり、侵襲性も低く、高い感度・特異度を有するなどバイオマーカーとして有用な特徴が多くある。実際、癌や循環器疾患を中心として多くの疾患や病態により変動する血清 miRNA が同定されている。これら血清 miRNA は、疾患の早期発見や病態把握について有用であり、新たなバイオマーカーとして期待されている。「岩手県における東日本大震災

被災者の支援を目的とした大規模コホート研究」は、震災で大きな被害を受けた地域の方々の健康状態を見守り、被災者がより健康でいられる方法（病気の予防策や健康のための施策）を確立することを目指している研究である。そこで、疾患発症やストレスなどを反映するバイオマーカーである血清 miRNAs を測定することで、被災などによるストレスの程度や疾患発症との関連を明らかとする。被災地で暮らす方々の疾患発症の予防や健康に役立つ情報を明らかにすることを目的とする。

血清 miRNAs の解析は大きく分けて、

1. 血清からの miRNAs 抽出
2. miRNAs を逆転写し cDNA を作成
3. 定量 PCR による解析

という3つの工程を必要とする。本年度は「岩手県における東日本大震災被災者の支援を目的とした大規模コホート研究」における研究参加同意者の血清サンプルを用いて、1. 血清からの miRNAs 抽出、2. 逆転写による cDNA 作成までの工程を行い、研究目的の達成を目指した。

B．研究方法

平成 23 年度内（平成 23 年 9 月から平成 24 年 2 月）に「岩手県における東日本大震災被災者の支援を目的とした大規模コホート研究」へ参加された方で血清保存に同意をいただいた方を対象とする。今回は、研究参加同意者 10,374 人のうち、大槌地区の 2,085 名を対象とした。

血清 miRNAs の抽出は、NucleoSpin® miRNA Plasma (TAKARA BIO) を用い製品の使用方法に従った。また、抽出過程において外部コントロールとして 5nM の Syn-cell-miR39 mimic (線虫が持つ miR-39 の複製) 5 μ l を加えた。最後に RNase-free water を 20 μ l 添加し、RNA 液として-80 にて保存した。RNase-free water で溶解した RNA 抽出液のうち、6 μ l を逆転写反応に用いた。逆転写反応は精製した RNA、5 \times miScriptHiFlex buffer、10 \times Nucleics Mix、miScript Reverse Transcriptase Mix を含む miScript RT Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて全量を 10 μ l とした後、2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) にて 37 で 60 分間、95 で 5 分間加温して cDNA を生成した。逆転写反応後、TE バッファー(1 M Tris-HCl, 0.5 M EDTA, pH 8.0) を等量添加した。血清 miRNAs の cDNA 液として-80 にて保存している。定量リアルタイム PCR は cDNA、2 \times QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix、miScript Universal Primer、RNase-free water を含む miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用い、ABI

PRISM-7900HT システム(Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) にて 95 15 分間加温した後、94 15 秒間、55 30 秒間、70 30 秒間、40 サイクルの条件で行った。

C．研究結果

血清 miRNAs の解析は大きく分けて 1. 血清からの miRNAs 抽出、2. miRNAs を逆転写し cDNA を作成、3. 定量 PCR による解析、という3つの工程を必要とする。平成 28 年度は研究計画通り、2,085 検体の血清サンプルより 1. 血清からの miRNAs 抽出、2. miRNAs を逆転写し cDNA を作成の工程を終了した。次年度以降の測定に向けて処理したサンプルを-80 保存した。

D．考察

平成 28 年度は計画通り血清より miRNAs の抽出・逆転写の工程が終了した。次年度より癌、循環器疾患などの生活習慣病に関連する血清 miRNA を中心に測定し、被災などによるストレスの程度や疾患発症との関連を明らかとする。

E．結論

「岩手県における東日本大震災被災者の支援を目的とした大規模コホート研究」における研究参加同意者の血清 miRNAs の測定に向け、大槌地区 2,085 名の血清からの miRNAs 抽出ならびに miRNAs を逆転写し cDNA を作成する工程が終了した。

F．研究発表

- 1．論文発表
特になし
- 2．学会発表
特になし

G．知的財産権の出願・登録状況

- 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

