

保存血清を用いた microRNA の測定について

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、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：昨年度 cDNA の作成まで行った大槌地区の 2085 検体を用いて、定量 PCR 法により miRNA の測定を行った。さらに山田地区の約 1000 検体について、血清から miRNAs 抽出し、抽出した miRNAs を逆転写により cDNA の作成までの工程を行った。

結果：平成 29 年度は研究計画通り、大槌地区の 2085 検体の血清サンプルを用いて、miRNA（miR-126、miR-197、miR-223）の測定を行い、他のデータとマージしデータベースを作成した。山田地区の約 1000 検体は、血清からの miRNAs 抽出、miRNAs を逆転写し cDNA の作成の工程を終了し、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うち、大槌地区 2085 名の血清 miR-126、miR-197、miR-223 の測定が終了し、山田地区の約 1000 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 2500 種以上の miRNA が同定されている。miRNA は標的 mRNA に結合して翻訳阻害を引き起こす。最近の研究によると血液中に miRNA が安定的に存在することが示されている。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、
血清からの miRNAs 抽出
miRNAs を逆転写し cDNA を作成
定量 PCR による miRNA 測定

という3つの工程を必要とする。平成 28 年度には、大槌地区 2085 名の血清から miRNAs 抽出し、抽出した miRNAs を逆転写し cDNA の作成を終えた。そのサンプルを用いて、今年度は、先行研究により循環器疾患発症等の生活習慣病のリスク評価として有用性が示唆されている血清 miRNA (miR-126、miR-197、miR-223) の測定を行い、研究目的の達成を目指した。さらに山田地区の約 1000 検体について、血清からの miRNAs 抽出し、抽出した miRNAs を逆転写による cDNA 作成までの工程を行うことを目的とした。

B . 研究方法

平成 23 年度内に「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。今年度は、研究参加同意者 10,374 人のうち、平成 28 年度に miRNA 抽出を終了している大槌地区の 2085 名分のサンプルを血清 miRNA の測定対象とした。また山田地区の約 1000 検体については、血清から miRNA の抽出、逆転写により cDNA の作成作業を行った。

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 を 5 μ l 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 miScript HiFlex 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。

血清 miRNA (miR-126、miR-197、miR-223) の測定には、定量リアルタイム PCR 法を用いた。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 血清からの miRNAs 抽出、 miRNAs を逆転写し cDNA を作成、 定量 PCR による測定、という3つの工程を必要とする。平成 29 年度は研究計画通り、大槌地区の 2085 検体の血清サンプルを用いて、 定量 PCR により血清 miRNA (miR-126、miR-197、miR-223) の測定を終了した。また山田地区の約 1000 検体の血清 miRNAs 抽出作業についても終了した。

D . 考察

平成 29 年度は計画通り、大槌地区の 2085 検体の血清 miRNA (miR-126、miR-197、miR-223) の測定が終了した。また山田地区の約 1000 検体については、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。次年度は、血清 miRNA の測定に加え、血清 miRNA データとベースラインデータとマージしたデータベースを利用して、被災などによるストレスの程度や疾患発症との関連についても解析をすすめていく。

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うち、大槌地区 2085 名の血清 miR-126、miR-197、miR-223 の測定が終了し、山田地区の約 1000 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

