

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（藤田医科大学 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（藤田医科大学 医学部衛生学講座 講師）

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。今年度は、引き続き対象者の血清 miRNA の測定を行うとともに震災後の精神健康度の調査結果と循環器疾患との関連が示唆されている血清 miRNA 値との関連について検討することを目的とした。

方法：昨年度 cDNA の作成までの工程を行った山田地区の約 1000 検体について、大槌地区と同様に miRNA の測定を行った。また、大槌地区の対象者 2085 名のうち、ベースライン時にがん、心筋梗塞、脳卒中および精神疾患の既往歴がある人を除いた 1602 名(男性 596 名 女性 1006 名)を解析対象として、ベースライン時の K6 質問票による精神健康度と血清 miRNA (miR-126、miR-197、miR-223)の関連について解析を行った。先行研究を参考に K6 の総合点が 13 点以上の者を精神健康度不良とした。

結果：今年度は研究計画通り、山田地区の約 1000 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の作成を行った。精神健康度と血清 miRNA 値との関連については、男性では K6 が 13 点以上の者は 12 点以下の者に比べ、血清 miR-197 が有意に高い結果を得た。ロジスティック回帰分析では、男性の miR-197 高値群は低値群と比べ、精神健康度不良のオッズ比が有意に高かった (OR : 2.32、95%CI : 1.07-6.61)。

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、山田地区の約 1000 名の血清 miR-126、miR-197 および miR-223 の測定が終了し、東日本大震災の被災者健診の受診者を対象として精神健康度と血清 miRNA 値との関連を調査した結果、男性では、血清 miR-197 の高値群では精神健康度不良のオッズ比が有意に高く、血清 miR-197 高値が震災後の心理的ストレスと関連することが示唆された。

A . 研究目的

哺乳類における micro-RNA(miRNA)が発見されたから現在までに、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。今年度はすでに血清 miRNA の測定を終了している地区のデータを用いて、震災後の精神健康度の調査結果と循環器疾患との関連が示唆されている血清 miRNA 値との関連について検討し、さらに同時に山田地区の約 1000 検体について、昨年度血清から抽出した miRNAs について測定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 (RIAS Study)」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。

1) 精神健康度と血清 miRNA 値の関連解析の対象者と方法

RIAS study として平成 23 年度に岩手県上閉伊郡大槌町で行われた健診の受診者(40 歳以上)のうち、がん、心筋梗塞、脳卒中および精神疾患の既往歴がある人を除いた 1602 名(男性 596 名 女性 1006 名)を解析対象とした。精神健康度の評価は K6 質問票を用いて行った。先行研究を参考に K6 の総合点が 13 点以上の者を精神健康度不良とした。血清 miRNA は miR-126、miR-197 および miR-223 を定量 RT-PCR 法で測定した。対象

者を血清 miRNA 値により 3 等分し、性、年齢、喫煙習慣、飲酒習慣および BMI を調整項目に加えたロジスティック回帰分析により精神健康度のオッズ比を算出した。

2) 山田地区の血清 miRNA の測定の対象者と方法

山田地区の約 1000 検体については、血清 miRNA の測定を行った。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 $^{\circ}$ C 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 Nucleic Mix、miScript Reverse Transcriptase Mix を含む miScript \square 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 $^{\circ}$ C で 60 分間、95 $^{\circ}$ C 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 \square 80 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 15 分間加温した後、94 $^{\circ}$ C 15 秒間、55 $^{\circ}$ C 30 秒間、70 $^{\circ}$ C 30 秒間、40 サイクルの条件で行った。

C . 研究結果

1) 精神健康度と血清 miRNA 値の関連

K6 の総合点が 13 点以上であった者は 104 人 (男性 34 人、女性 70 人) であった。男性では K6 が 13 点以上の者は 12 点以下の者に比べ、血清 miR-197 が有意に高い結果を得た。ロジスティック回帰分析では、男性の miR-197 高値群は低値群と比べ、精神健康度不良のオッズ比が有意に高かった (OR:2.51、95%CI: 1.07-6.61)。

2) 山田地区の血清 miRNA の測定

血清 miRNAs の解析は大きく分けて①血清からの miRNAs 抽出、②miRNAs を逆転写し cDNA を作成、③定量 PCR による測定、という 3 つの工程を必要とする。平成 30 年度は研究計画通り、山田地区の約 1000 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。

D . 考察

震災によるストレスが、その後の循環器疾患発症に影響を及ぼすことが報告されている。今回、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、精神健康度と血清 miRNA との関連について解析した結果、血清 miR-197 が震災後の強い心理的ストレス状態との関連を認めた。miRNA-197 は血管内炎症や血小板活性化等と関連することが報告されており、震災後の循環器疾患発症に関与する可能性が示唆された。今後、さらに解析をすすめるとともに、他の生活習慣や疾患発症との関連についても解析をすすめていく予定である。

また、平成 30 年度は計画通り、山田地区の約 1000 検体の血清 miRNA (miR-126、miR-197、miR-223) の測定が終了した。次年度は、残りの山田地区およびその他の地区の分析対象者の血清 miRNA の測定をすすめる予定である。

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うち、大槌地区の対象者を用いて精神健康度と血清 miRNA 値との関連を調査した結果、男性では、血清 miR-197 の高値群では精神健康度不良のオッズ比が有意に高く、血清 miR-197 高値が震災後の心理的ストレスと関連することが示唆された。さらに、山田地区約 1000 名の血清 miR-126、miR-197、miR-223 の測定が終了した。

F . 研究発表

1 . 論文発表

特になし

2 . 学会発表

1) 鈴木康司、山田宏哉、宗綱栄二、山崎未来、安藤嘉崇、石川浩章、大橋鉦二、藤井亮輔、下田陽樹、坂田清美、小川 彰、小林誠一郎、東日本大震災の被災者における精神健康度と血清 microRNA 値との関連、第 29 回日本疫学会学術総会、東京、2019 年 2 月

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

