

血清 microRNA の測定および腎機能との関連

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 microRNA (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。今年度は、震災の被災者において慢性腎臓病 (CKD) の発症率が高いことが報告されているが、分子メカニズムは不明であったことから、我々は RIAS Study の健診受診者を対象として、血管機能と関連が示唆されている miRNA 値と CKD との関連について検討することを目的とした。

方法：今年度の血清 miRNA の測定は、大槌地区の住民を対象として nested case-control study を行うために新たな血清 miRNA の測定を行っている。全死亡の Case に対し、性、年齢を合わせた Control を 1:2 で抽出した。これまでに大槌地区では 2085 名の miR-126、miR-197 および miR-223 の血清レベルを測定済である。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。血清 miRNA と CKD との関連については、大槌地区の対象者のうち、質問票に欠測値がある者、がん、心筋梗塞、脳卒中、腎臓病の既往歴および人工透析の治療歴がある者を除いた 1,385 名（男性 670 名、女性 715 名）を解析対象とした。血清クレアチニン値、性別、年齢から算出する推定糸球体濾過量 (eGFR) が 60ml/min/1.73m² 以上を CKD とした。対象者を血清 miRNA 値により 3 等分し、性、年齢、血糖値、収縮期血圧、BMI、喫煙習慣、飲酒習慣、精神的ストレス、転居経験および避難所での生活経験を調整項目に加えたロジスティック回帰分析により CKD のオッズ比を算出した。

結果：血清 miRNA と CKD との関連については、3 つの miRNA とともに高値群では低値群に比べ、CKD のオッズ比が有意に低かった。交絡因子で調整したモデルでも、同様の結果を示した [miR-126: OR = 0.67 (95%CI : 0.45-0.98), miR-197: OR = 0.67 (95%CI : 0.46-0.99), miR-223: OR = 0.53 (95%CI : 0.35-0.79)]。

結論：東日本大震災の被災者健診の受診者を対象として血清 miRNA 値と CKD との関連を調査した結果、血清 miR-126、miR-197 および miR-223 の高値が CKD と関連することが示唆された。（本結果については、Fujii R, et al. BMC Nephrology (2019) に掲載済みである。）

A. 研究目的

哺乳類における microRNA (miRNA) が発見されたから現在までに、ヒトにおいて 3000 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（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にする。

また、近年の東日本大震災被災者における前向きコホート研究で、被災者の方が CKD の保有率が高いと報告されていたが、その分子メカニズムについては不明であった。それに対して、我々は被災による精神的なストレスが血管機能に関与する miRNA に変化をもたらし、最終的に腎機能低下へ至ったと仮説を立てた。

そこで今年度は、1) 血管機能との関連が示唆される血清 miRNA と CKD との関連について、すでに測定を終えていた大槌町の検体を対象に統計学的な手法を用いて検討を行うこと、さらに 2) nested case-control study に向けた検体の抽出と miRNA 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および利用に同意をいただいた方を対象とする。

1) 血清 miRNA 値と腎機能と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、は、大槌地区の対象者のうち、質問票に欠測値がある者、がん、心筋梗塞、脳卒中、腎臓病の既往歴および人工透析の治療歴がある者を除いた 1,385 名 (男性 670 名、女性 715 名) を解析対象とした。腎機能の評価には、性、年齢、血清クレアチンから求める推定糸球体濾過量 (eGFR, ml/min/1.73m²) を用いた。eGFR が 60 ml/min/1.73m² 以下を腎機能低下者として扱った。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、血糖値、収縮期血圧、喫煙習慣、飲酒習慣、BMI、精神的ストレスおよび被災状況を調整項目に加えたロジスティック回帰分析により腎機能低下のオッズ比を算出した。

2) 大槌地区の血清 miRNA の測定方法

大槌地区の検体については、nested-casecontrol study のために全死亡を case として、性・年齢をもとに 1:2 の比でマッチングした control を抽出した。これら case および control の血清 miRNA の測定を行った。測定の手順については、昨年までと同様であるが、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 5μl 加えた。最後に RNase-free water を 20μl 添加し、RNA 液として -80°C にて保存した。RNase-free water で溶解した RNA 抽出液のうち、6μl を逆転写反応に用いた。逆転写反応は精製した RNA、5×miScript HiFlex buffer、10×Nucleics Mix、miScript Reverse Transcriptase Mix を含む miScript II RT Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて全量を 10μl とした後、2720

Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) にて 37°C で 60 分間、95°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 -80°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× 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°C 15 分間加温した後、94°C 15 秒間、55°C 30 秒間、70°C 30 秒間、40 サイクルの条件で行った。

C. 研究結果

1) 血清 miRNA 値と腎機能との関連解析

対象者のうち、CKD と判定されたのは 229 名 (16.5%) であった。ロジスティック回帰分析では、すべての miR について、交絡因子で補正した解析モデルにおいても、高値群は低値群と比べ、CKD のオッズ比が有意に低かった (miR-126 OR : 0.67, 95%CI : 0.45-0.98 ; miR-197 OR : 0.67, 95%CI : 0.46-0.99 ; miR-223 OR : 0.53, 95%CI : 0.35-0.79)。

2) 大槌地区の血清 miRNA の測定

血清 miRNA を用いたコホート内症例対照研究を目的として大槌地区の対象者から、全死亡の Case に対し、性、年齢を合わせた Control を 1:2 で抽出した。その対象者の血清を用いて miR-126, miR-197, miR-223 に加え、循環器疾患等の発症との関連が示唆されている miR-21, -92a, -130a, -132, -155 等の測定を行った。

D. 考察

今回 CKD と有意な関連を認めた miR

(miR-126, miR-197, miR-223) はすべて血管機能と関連することが先行研究によって知られている。本研究の成果として、血管機能の変化を示す miRNA を測定することにより被災地における腎機能低下を早期に発見しうることを示唆している。今後は、腎機能だけでなく他の生活習慣や疾患発症および死亡状況との関連についても解析をすすめていく予定である。

E. 結論

大槌地区の対象者を用いて血清 miRNA 値と腎機能との関連を調査した結果、男性では、血清 miR-126, miR-197, miR-223 の高値群では CKD のオッズ比が有意に低く、各 miR 高値が腎機能低下と関連することが示唆された。さらに、大槌地区約 500 名の血清 miRNA の測定が終了した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Fujii R, Yamada H, Yamazaki M, Munetsuna E, Ando Y, Ohashi K, Ishikawa H, Shimoda H, Sakata K, Ogawa A, Kobayashi S, Suzuki K; RIAS study group., Circulating microRNAs (miR-126, miR-197, and miR-223) are associated with chronic kidney disease among elderly survivors of the Great East Japan Earthquake. *BMC Nephrol.* 2019;20(1):474.

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