

縦断研究による血清 miRNA と死亡との関連

| | |
|-------|-----------------------------|
| 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） |
| 研究代表者 | 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） |
| 研究分担者 | 下田 陽樹（岩手医科大学 衛生学公衆衛生学講座助教） |
| 研究協力者 | 藤井 亮輔（藤田医科大学 医療科学部臨床検査学科助教） |

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、「血清中 miRNA の測定と死亡との関連を明らかにできれば、将来大災害後の死亡高リスク者を比較的簡易な静脈採血によりスクリーニングできる可能性がある」と考え、我々は RIAS Study の健診受診者を対象として、心血管疾患との関連が示唆されている miRNA 値と追跡期間中の死亡の有無との関連について検討することを目的とした。

方法：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。大槌地区の対象者 (2,063 名) のうち、転出や miRNA 測定不能もしくは血清提供不同意などの理由で 160 名を除外し、1903 名 (死亡 128 名) を最終的な解析対象者とした。がんおよび循環器疾患による死亡は、ICD-10 コードによって分類されたものを使用した。対象者を血清 miRNA 値により 4 群に等分し、性、年齢、血糖値、収縮期血圧、BMI、LDL コレステロール値、喫煙習慣、飲酒習慣、がんの既往歴、循環器疾患の既往歴を調整項目に加えたコックス比例ハザード回帰分析により死亡のハザード比を算出した。

結果：全死亡 128 名に対して、がんおよび循環器疾患による死亡はそれぞれ 39 名、21 名であった。血清 miR-197 の高値群では、低値群と比較してがん死亡のリスク上昇の傾向を示した [miR-197 (Q1 vs. Q2) : HR = 3.08 (95%CI : 1.12-8.50)、(vs. Q3) : HR = 2.74 (95%CI : 0.93-8.10)、(vs. Q4) : HR = 3.11 (95%CI : 1.03-9.42)]。その他の miRNA について、全死亡やがんおよび循環器疾患による死亡について、有意な関連は認められなかった。

考察：RIAS STUDY の参加者を対象として血清 miRNA 値と全死亡および死因別死亡との関連を調査した結果、血清 miR-197 の高値群ではがん死亡のハザード比が高い結果を示し、この miRNA の測定により被災後のがんによる死亡を予測できる可能性を示唆した。

血清 miRNA の測定項目 (血清 miR-19b、-21、-92a、-130a、-132、-222) を増やして nested case-control study を実施する計画を進めており、サンプルの選定など当初の予定通りに進捗している。

A. 研究目的

哺乳類における microRNA(miRNA)が発見

されてから現在までに、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とする。

近年は、東日本大震災被災者における被災者の中でも震災関連死が話題になっている。避難所などでの厳しい生活や震災によるメンタルヘルスの破綻などが問題と言われている。それに対して、我々は「血清中 miRNA の測定と死亡との関連を明らかにできれば、将来大災害後の死亡高リスク者を比較的簡易な静脈採血によりスクリーニングできる可能性がある」と仮説を立てた。

そこで今年度は、参加者の追跡期間中の死亡データを入手し、1) 心血管疾患との関連が示唆される血清 miRNA と全死亡および死因別死亡との関連について、統計学的手法を用いて検討を行うこと、さらに2) nested case-control study に向けた大槌町以外の検体の抽出と 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 値と死亡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、ベースライン時の質問票に欠測値がある者、追跡期間中の転出があった者を除いた 1,903 名 (男性 728 名、女性 1,175 名) を解析対象とした。がんや循環器死亡の死亡は、ICD-10 コードを用いた。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 4 等分し、性、年齢、血糖値、収縮期血圧、喫煙習慣、飲酒習慣、BMI、LDL コレステロール値、がんまたは/および循環器疾患の既往歴を調整項目に加えたコックス比例ハザード回帰分析により全死亡および死因別死亡のハザード比を算出した。

2) 大槌地区を除く地域の血清 miRNA の測定方法

大槌地区に引き続いて、大槌地区以外の検体では、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 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 Nucleics Mix、miScript Reverse Transcriptase Mix を含む

miScript II 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°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 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°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 値と死亡および死因別死亡との関連解析

対象者 (1,903 名) のうち、全死亡は 128 名、がんおよび循環器疾患による死亡は、それぞれ 39 名と 21 名であった。コックス比例ハザードモデルでは、血清 miR-197 について、交絡因子で補正した解析モデルにおいても、第 2～4 四分位群 (Q2-Q4) は第一四分位群 (Q1) と比べ、がん死亡のリスク上昇の傾向を示した (Q1 vs. Q2 HR : 3.08, 95%CI : 1.12-8.50; vs. Q3 HR : 2.74, 95%CI : 0.93-8.10; vs. Q4 HR : 3.11, 95%CI : 1.03-9.42)。なお、その他の miRNA および全死亡では有意な関連は認めなかった。

2) 大槌地区を除く地域の血清 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以外の対象者から、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血清 miR-19b、-21、-92a、-130a、-132、

-222 の測定を行った。

D. 考察

今回、がん死亡と有意な関連を認めた血清 miR-197 は、肺、前立腺、膵臓がん患者と高発現を示している先行研究と一致している。ただし、miR-197 高値が CKD のオッズ比低下と関連しているという過去に行った我々の報告とは相反する結果であった。そのメカニズムを検証する上でも、今年度測定を進めた他地域の結果と確認して解析を進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 値と死亡との関連を調査した結果、血清 miR-197 の高値群では、がんの死亡リスクが有意に高く、miR-197 高値が将来的ながん死亡と関連することが示唆された。

Nested case-control study の対象者の血清 miRNA を測定終了次第、死亡との解析を行っていく。

F. 研究発表

特になし

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

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

