

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590705

研究課題名(和文) 血漿マイクロRNAのバイオマーカーとしての有用性の検討

研究課題名(英文) Assessment of plasma miRNA as biomarkers for various diseases

研究代表者

岩井 直温 (Iwai, Naoharu)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：30242978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：障害された細胞から遊出してくるmiRNAが血漿中で比較的安定であることより、細胞特異的miRNAを見出すことができれば、バイオマーカーとして利用可能となる。このコンセプトに基づき、心筋梗塞の診断マーカーとしてmiR-499、脳梗塞の診断マーカーとしてmiR-124、心不全の重症度診断マーカーとしてmiR-126及びmiR-210、膵炎の診断マーカーとしてmiR-216a及びmiR-216bが使えることを見出した。平滑筋、心筋、骨格筋(速筋及び遅筋)が、筋肉に特異的なmiR-1, 133a, 133b, 145, 499などの組み合わせで分類可能であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Plasma miRNAs are very useful to identify necrotizing cells, since miRNA expression patterns are cell-specific. Based on this concept, we confirmed that plasma miR-499, miR-124, miR-210 and miR-126, and miR-216a and 216b, were useful as biomarkers for myocardial infarction, cerebral infarction, congestive heart failure, and acute pancreatitis, respectively. Moreover, smooth muscle cells, cardiomyocytes, and skeletal muscle cells could be discriminated by expression patterns of muscle specific miRNAs, namely miR-1, 133a, 133b, 145, and 499.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態検査学

キーワード：マイクロRNA バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

マイクロRNAの発現パターンは細胞特異的である。流血中に遊出したマイクロRNAは比較的安定に存在する。故に、壊死している細胞が存在する場合、流血中のマイクロRNAの発現パターンに反映される。

2. 研究の目的

細胞特異的なマイクロRNAを多数見出し、その細胞が主役を演じる疾患の診断バイオマーカーを確立すること。

3. 研究の方法

(1) miRNA 発現プロファイルの作成

生体内の各種細胞を laser microdissection で収集し、miRNA array と引き続いての個別の validation を行って、発現プロファイルを作成する。miRNA は mRNA と異なり分解を受けにくく、ホルマリン固定や HE 染色などでも分解されない。多くの細胞種を正確に同定した上で採取可能である。対象とする主なものとして以下のように考えている(いくつかは既に行っているが)。

神経系：海馬神経細胞(アルツハイマー病)・黒質緻密層神経細胞(パーキンソン病)・大脳皮質神経細胞(認知症)・大脳基底核の神経細胞・小脳神経細胞(プルキンエ、バスケットなど)・脊髄運動神経細胞・脳梁(オリゴデンドロ細胞)・網膜(色素細胞・外顆粒層・内顆粒層・神経細胞層)

内分泌系：松果体・下垂体(前・後)・甲状腺濾胞細胞・副甲状腺・ランゲルハンス氏島(アルファ及びベータ細胞)・副腎髄質、副腎皮質(球状・束状・網状)・精巢(セルトリ細胞・ライディッヒ細胞)・卵巣(顆粒膜細胞・莖膜細胞)・各種消化管ホルモン産生細胞

筋肉系：消化管平滑筋・大血管平滑筋及び内皮(大動脈瘤)・抵抗血管平滑筋及び内皮・静脈平滑筋及び内皮・骨格筋(速・遅筋)・心筋(心不全)・心房筋・膀胱平滑筋・子宮平滑筋・尿管平滑筋・気管支平滑筋・骨(骨芽細胞・破骨細胞)

内臓系：腎臓(糸球体・近位尿細管・遠位尿細管・集合管)・膵臓外分泌部・肝臓(肝細胞・胆管細胞)・肺(気道上皮・粘液細胞・杯細胞・肺胞上皮)・脂肪細胞(白色皮下・白色内臓・褐色)

下線で示した細胞に関しては、カッコ内に対象疾患を明示しており、より確実に成果を出すために、small RNA library を作成して次世代シーケンサーを用いてプロファイリングを行う場合もある(新規 miRNA の発見及びより正確な網羅的プロファイリングを行うために)。

(2) 疾患モデルでの体液 miRNA 濃度の有用

性の検討

心不全：ダール食塩感受性高血圧ラットを用いる。心機能は超音波エコーと血漿BNPにてモニターする。心不全の進展に伴い心筋細胞の緩徐な脱落が生じると考えられ、血漿トロポニンTとともに心筋由来血漿miRNAで評価可能か検討する。心不全に進行に伴い末梢組織が低酸素状態に陥るが、この指標となりえる血漿miRNAについても検討を行う。

腎臓尿細管障害を尿中miRNAで評価できるのかなど、見出された特異的miRNAに合わせて、順次疾患モデルを増やし有用性を検討する。

4. 研究成果

miR-210は低酸素にて誘導されるマイクロRNAであることを確認した。ダール心不全モデルでは、流血中及び骨格筋でのmiR-210の発現レベルが上昇する。

ヒト心不全状態でも血漿中のmiR-210濃度は上昇するが、BNPとの相関は高くなかった。しかし再入院する患者では退院時のmiR-210が高いことから心不全の予後判定に使える可能性が示唆された。

膵臓外分泌細胞に特異的に発現するマイクロRNAとしてmiR-216a, 216b, 217を見出した。これら3種類のマイクロRNAは染色体上でクラスターを形成している。膵炎モデルで、血清アミラーゼよりも遙かに鋭敏に膵炎を検出できることを確認した。

ヒト心筋梗塞の診断にmiR-499が使えることは報告済みであるが、心不全の進行には微小な心筋壊死が関与している可能性があり、受賞心不全患者でmiR-499を測定してみた。感度を上げる種々の試みも行ったが、心不全の進行に微小な心筋壊死が関与する証拠は見出されなかった。

高血圧性腎障害では間質の線維化が顕著であるが、この時期に尿中miR-21の上昇が観察される。miR-21は、繊維芽細胞、マクロファージやT細胞で発現が高い。

腎臓の線維化の進行指標として使える可能性が示唆された。尿細管で発現レベルの高いmiRNAとしてmiR-200 familyがある。尿細管障害にて尿中のmiR-200a, b, cが著明に上昇することが確認された。

平滑筋、心筋、骨格筋(速筋、遅筋)は、筋肉に特異的に発現しているmiR-1, 133a, 133b, 145, 499の発現パターンで区別できることが判明した。一般的に脂肪細胞由来とされている褐色脂肪細胞のマイクロRNAの発現パターンは、骨格筋に近いことが判明し、幹細胞は骨格筋と共通の者なのだろうと推定された。

5 . 主な発表論文等 (すべて査読有)

(雑誌論文)(計10件)

1. Fukushima Y, Nakanishi M, Nonogi H, Goto Y, **Iwai N**. Assessment of plasma miRNAs in congestive heart failure. *Circ J* 2011;75:336-340.
2. Weng H, Shen C, Hirokawa G, Ji X, Takahashi R, Shimada K, Kishimoto C, **Iwai N**. Plasma miR-124 as a biomarker for cerebral infarction. *Biomed Res* 2011;32:135-141.
3. Kato N, Takeuchi F, Tabara Y, Kelly TN, Go MJ, Sim X, Tay WT, Chen CH, Zhang Y, Yamamoto Y, Katsuya T, Yokota M, Kim YJ, Ong RTH, Nabika T, Gu D, Chang LC, Kokubo Y, Huang W, Ohnaka K, Yamori Y, Nakashima E, Jaquish CE, Lee JY, Seielstad M, Isono M, Hixson JE, Chen YT, Miki T, Zhou X, Sugiyama T, Jeon JP, Liu JJ, Takayanagi R, Kim SS, Aung T, Sung YJ, Zhang X, Wong TY, Han BG, Kobayashi S, Ogihara T, Zhu D, **Iwai N**, Wu JY, Teo YY, Tai ES, Cho YS, He J. (**Iwai N**, 44 番目 /49 人中 Co-last author) Meta-analysis of genome-wide association studies identifies five novel variants associated with blood pressure in East Asians. *Nat Genet* 2011;43:531-538
4. International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies, Ehret GB, Munroe PB, Rice KM, Bochud M, Johnson AD, Chasman DI, Smith AV, Tobin MD, Verwoert GC, Hwang SJ, Pihur V, Vollenweider P, O'Reilly PF, Amin N, Bragg-Gresham JL, Teumer A, Glazer NL, Launer L, Zhao JH, Aulchenko Y, Heath S, Söber S, Parsa A, Luan J, Arora P, Dehghan A, Zhang F, Lucas G, Hicks AA, Jackson AU, Peden JF, Tanaka T, Wild SH, Rudan I, Igl W, Milanecchi Y, Parker AN, Fava C, Chambers JC, Fox ER, Kumari M, Go MJ, van der Harst P, Kao WH, Sjögren M, Vinay DG, Alexander M, Tabara Y, Shaw-Hawkins S, Whincup PH, Liu Y, Shi G, Kuusisto J, Tayo B, Seielstad M, Sim X, Nguyen KD, Lehtimäki T, Matullo G, Wu Y, Gaunt TR, Onland-Moret NC, Cooper MN, Platou CG, Org E, Hardy R, Dahgam S, Palmen J, Vitart V, Braund PS, Kuznetsova T, Uiterwaal CS, Adeyemo A, Palmas W, Campbell H, Ludwig B, Tomaszewski M, Tzoulaki I, Palmer ND; CARDIoGRAM consortium; CKDGen Consortium; KidneyGen Consortium;

EchoGen consortium; CHARGE-HF consortium, Aspelund T, Garcia M, Chang YP, O'Connell JR, Steinle NI, Grobbee DE, Arking DE, Kardina SL, Morrison AC, Hernandez D, Najjar S, McArdle WL, Hadley D, Brown MJ, Connell JM, Hingorani AD, Day IN, Lawlor DA, Beilby JP, Lawrence RW, Clarke R, Hopewell JC, Ongen H, Dreisbach AW, Li Y, Young JH, Bis JC, Kähönen M, Viikari J, Adair LS, Lee NR, Chen MH, Olden M, Pataro C, Bolton JA, Köttgen A, Bergmann S, Mooser V, Chaturvedi N, Frayling TM, Islam M, Jafar TH, Erdmann J, Kulkarni SR, Bornstein SR, Grässler J, Groop L, Voight BF, Kettunen J, Howard P, Taylor A, Guarrera S, Ricceri F, Emilsson V, Plump A, Barroso I, Khaw KT, Weder AB, Hunt SC, Sun YV, Bergman RN, Collins FS, Bonnycastle LL, Scott LJ, Stringham HM, Peltonen L, Perola M, Vartiainen E, Brand SM, Staessen JA, Wang TJ, Burton PR, Artigas MS, Dong Y, Snieder H, Wang X, Zhu H, Lohman KK, Rudock ME, Heckbert SR, Smith NL, Wiggins KL, Doumatey A, Shriner D, Veldre G, Viigimaa M, Kinra S, Prabhakaran D, Tripathy V, Langefeld CD, Rosengren A, Thelle DS, Corsi AM, Singleton A, Forrester T, Hilton G, McKenzie CA, Salako T, **Iwai N**, Kita Y, Ogihara T, Ohkubo T, Okamura T, Ueshima H, Umemura S, Eyheramendy S, Meitinger T, Wichmann HE, Cho YS, Kim HL, Lee JY, Scott J, Sehmi JS, Zhang W, Hedblad B, Nilsson P, Smith GD, Wong A, Narisu N, Stančáková A, Raffel LJ, Yao J, Kathiresan S, O'Donnell CJ, Schwartz SM, Ikram MA, Longstreth WT Jr, Mosley TH, Seshadri S, Shrine NR, Wain LV, Morken MA, Swift AJ, Laitinen J, Prokopenko I, Zitting P, Cooper JA, Humphries SE, Danesh J, Rasheed A, Goel A, Hamsten A, Watkins H, Bakker SJ, van Gilst WH, Janipalli CS, Mani KR, Yajnik CS, Hofman A, Mattace-Raso FU, Oostra BA, Demirkan A, Isaacs A, Rivadeneira F, Lakatta EG, Orru M, Scuteri A, Ala-Korpela M, Kangas AJ, Lyttikäinen LP, Soininen P, Tukiainen T, Würtz P, Ong RT, Dörr M, Kroemer HK, Völker U, Völzke H, Galan P, Hercberg S, Lathrop M, Zelenika D, Deloukas P, Mangino M, Spector TD, Zhai G, Meschia JF, Nalls MA, Sharma P, Terzic J, Kumar MV, Denniff M, Zukowska-Szczechowska E, Wagenknecht LE, Fowkes FG, Charchar FJ, Schwarz PE, Hayward C, Guo X, Rotimi C, Bots ML, Brand E, Samani NJ, Polasek O, Talmud PJ, Nyberg F, Kuh D, Laan M, Hveem K, Palmer LJ, van der Schouw YT, Casas JP, Mohlke KL, Vineis P,

Raitakari O, Ganesh SK, Wong TY, Tai ES, Cooper RS, Laakso M, Rao DC, Harris TB, Morris RW, Dominiczak AF, Kivimaki M, Marmot MG, Miki T, Saleheen D, Chandak GR, Coresh J, Navis G, Salomaa V, Han BG, Zhu X, Kooner JS, Melander O, Ridker PM, Bandinelli S, Gyllensten UB, Wright AF, Wilson JF, Ferrucci L, Farrall M, Tuomilehto J, Pramstaller PP, Elosua R, Soranzo N, Sijbrands EJ, Altshuler D, Loos RJ, Shuldiner AR, Gieger C, Meneton P, Uitterlinden AG, Wareham NJ, Gudnason V, Rotter JI, Rettig R, Uda M, Strachan DP, Wittteman JC, Hartikainen AL, Beckmann JS, Boerwinkle E, Vasani RS, Boehnke M, Larson MG, Jarvelin MR, Psaty BM, Abecasis GR, Chakravarti A, Elliott P, van Duijn CM, Newton-Cheh C, Levy D, Caulfield MJ, Johnson T, Tang H, Knowles J, Hlatky M, Fortmann S, Assimes TL, Quertermous T, Go A, Iribarren C, Absher D, Risch N, Myers R, Sidney S, Ziegler A, Schillert A, Bickel C, Sinning C, Rupprecht HJ, Lackner K, Wild P, Schnabel R, Blankenberg S, Zeller T, Münzel T, Perret C, Cambien F, Tiret L, Nicaud V, Proust C, Dehghan A, Hofman A, Uitterlinden A, van Duijn C, Levy D, Whitteman J, Cupples LA, Demissie-Banjaw S, Ramachandran V, Smith A, Gudnason V, Boerwinkle E, Folsom A, Morrison A, Psaty BM, Chen IY, Rotter JI, Bis J, Volcik K, Rice K, Taylor KD, Marcic K, Smith N, Glazer N, Heckbert S, Harris T, Lumley T, Kong A, Thorleifsson G, Thorgeirsson G, Holm H, Gulcher JR, Stefansson K, Andersen K, Gretarsdottir S, Thorsteinsdottir U, Preuss M, Schreiber S, Meitinger T, König IR, Lieb W, Hengstenberg C, Schunkert H, Erdmann J, Fischer M, Grosshennig A, Medack A, Stark K, Linsel-Nitschke P, Bruse P, Aherrahrou Z, Peters A, Loley C, Willenborg C, Nahrstedt J, Freyer J, Gulde S, Doering A, Meisinger C, Wichmann HE, Klopp N, Illig T, Meinitzer A, Tomaschitz A, Halperin E, Dobnig H, Scharnagl H, Kleber M, Laaksonen R, Pilz S, Grammer TB, Stojakovic T, Renner W, März W, Böhm BO, Winkelmann BR, Winkler K, Hoffmann MM, O'Donnell CJ, Voight BF, Altshuler D, Siscovick DS, Musunuru K, Peltonen L, Barbalic M, Melander O, Elosua R, Kathiresan S, Schwartz SM, Salomaa V, Guiducci C, Burt N, Gabriel SB, Stewart AF, Wells GA, Chen L, Jarinova O, Roberts R, McPherson R, Dandona S, Pichard AD, Rader DJ, Devaney J, Lindsay JM, Kent KM, Qu L, Satler L, Burnett MS, Li M, Reilly MP, Wilensky R, Waksman R, Epstein S,

Matthai W, Knouff CW, Waterworth DM, Hakonarson HH, Walker MC, Mooser V, Hall AS, Balmforth AJ, Wright BJ, Nelson C, Thompson JR, Samani NJ, Braund PS, Ball SG, Smith NL, Felix JF, Morrison AC, Demissie S, Glazer NL, Loehr LR, Cupples LA, Dehghan A, Lumley T, Rosamond WD, Lieb W, Rivadeneira F, Bis JC, Folsom AR, Benjamin E, Aulchenko YS, Haritunians T, Couper D, Murabito J, Wang YA, Stricker BH, Gottdiener JS, Chang PP, Wang TJ, Rice KM, Hofman A, Heckbert SR, Fox ER, O'Donnell CJ, Uitterlinden AG, Rotter JI, Willerson JT, Levy D, van Duijn CM, Psaty BM, Wittteman JC, Boerwinkle E, Vasani RS, Köttgen A, Pattaro C, Böger CA, Fuchsberger C, Olden M, Glazer NL, Parsa A, Gao X, Yang Q, Smith AV, O'Connell JR, Li M, Schmidt H, Tanaka T, Isaacs A, Ketkar S, Hwang SJ, Johnson AD, Dehghan A, Teumer A, Paré G, Atkinson EJ, Zeller T, Lohman K, Cornelis MC, Probst-Hensch NM, Kronenberg F, Tönjes A, Hayward C, Aspelund T, Eiriksdottir G, Launer LJ, Harris TB, Rampersaud E, Mitchell BD, Arking DE, Boerwinkle E, Struchalin M, Cavalieri M, Singleton A, Giallauria F, Metter J, de Boer J, Haritunians T, Lumley T, Siscovick D, Psaty BM, Zillikens MC, Oostra BA, Feitosa M, Province M, de Andrade M, Turner ST, Schillert A, Ziegler A, Wild PS, Schnabel RB, Wilde S, Munzel TF, Leak TS, Illig T, Klopp N, Meisinger C, Wichmann HE, Koenig W, Zgaga L, Zemunik T, Kolcic I, Minelli C, Hu FB, Johansson A, Igl W, Zaboli G, Wild SH, Wright AF, Campbell H, Ellinghaus D, Schreiber S, Aulchenko YS, Felix JF, Rivadeneira F, Uitterlinden AG, Hofman A, Imboden M, Nitsch D, Brandstätter A, Kollerits B, Kedenko L, Mägi R, Stumvoll M, Kovacs P, Boban M, Campbell S, Endlich K, Völzke H, Kroemer HK, Nauck M, Völker U, Polasek O, Vitart V, Badola S, Parker AN, Ridker PM, Kardia SL, Blankenberg S, Liu Y, Curhan GC, Franke A, Rochat T, Paulweber B, Prokopenko I, Wang W, Gudnason V, Shuldiner AR, Coresh J, Schmidt R, Ferrucci L, Shlipak MG, van Duijn CM, Borecki I, Krämer BK, Rudan I, Gyllensten U, Wilson JF, Wittteman JC, Pramstaller PP, Rettig R, Hastie N, Chasman DI, Kao WH, Heid IM, Fox CS, Vasani RS, Glazer NL, Felix JF, Lieb W, Wild PS, Felix SB, Watzinger N, Larson MG, Smith NL, Dehghan A, Grosshennig A, Schillert A, Teumer A, Schmidt R, Kathiresan S, Lumley T, Aulchenko YS, König IR, Zeller T, Homuth G, Struchalin M, Aragam J, Bis

JC, Rivadeneira F, Erdmann J, Schnabel RB, Dörr M, Zweiker R, Lind L, Rodeheffer RJ, Greiser KH, Levy D, Haritunians T, Deckers JW, Stritzke J, Lackner KJ, Völker U, Ingelsson E, Kullo I, Haerting J, O'Donnell CJ, Heckbert SR, Stricker BH, Ziegler A, Reffelmann T, Redfield MM, Werdan K, Mitchell GF, Rice K, Arnett DK, Hofman A, Gottdiener JS, Uitterlinden AG, Meitinger T, Blettner M, Friedrich N, Wang TJ, Psaty BM, van Duijn CM, Wichmann HE, Munzel TF, Kroemer HK, Benjamin EJ, Rotter JI, Wittteman JC, Schunkert H, Schmidt H, Völzke H, Blankenberg S, Chambers JC, Zhang W, Lord GM, van der Harst P, Lawlor DA, Sehmi JS, Gale DP, Wass MN, Ahmadi KR, Bakker SJ, Beckmann J, Bilo HJ, Bochud M, Brown MJ, Caulfield MJ, Connell JM, Cook HT, Cotlarciuc I, Davey Smith G, de Silva R, Deng G, Devuyst O, Dikkeschei LD, Dimkovic N, Dockrell M, Dominiczak A, Ebrahim S, Eggermann T, Farrall M, Ferrucci L, Floege J, Forouhi NG, Gansevoort RT, Han X, Hedblad B, Homan van der Heide JJ, Hepkema BG, Hernandez-Fuentes M, Hyponen E, Johnson T, de Jong PE, Kleefstra N, Lagou V, Lapsley M, Li Y, Loos RJ, Luan J, Luttrupp K, Maréchal C, Melander O, Munroe PB, Nordfors L, Parsa A, Peltonen L, Penninx BW, Perucha E, Pouta A, Prokopenko I, Roderick PJ, Ruokonen A, Samani NJ, Sanna S, Schalling M, Schlessinger D, Schlieper G, Seelen MA, Shuldiner AR, Sjögren M, Smit JH, Snieder H, Soranzo N, Spector TD, Stenvinkel P, Sternberg MJ, Swaminathan R, Tanaka T, Ubink-Veltmaat LJ, Uda M, Vollenweider P, Wallace C, Waterworth D, Zerres K, Waeber G, Wareham NJ, Maxwell PH, McCarthy MI, Jarvelin MR, Mooser V, Abecasis GR, Lightstone L, Scott J, Navis G, Elliott P, Kooner JS. (**Iwai N**, 183 番目/351 人中) Common polymorphisms impacting blood pressure and cardiovascular disease in diverse populations highlight novel biological pathways. *Nature* 2011;478:103-109.

5 Endo K, Naito Y, Ji X, Nakanishi M, Noguchi T, Goto Y, Nonogi H, Ma X, Weng H, Hirokawa G, Asada T, Kakinoki S, Yamaoka T, Fukushima Y, **Iwai N**. microRNA 210 as a biomarker for congestive heart failure. *Biol Pharma Bull*. 2013;36:48-54

6. Weng H, Ji X, Naito Y, Endo K, Ma X, Takahashi R, Shen C, Hirokawa G,

Fukushima Y, **Iwai N**. Pex11a deficiency impairs peroxisome elongation and division and contributes to nonalcoholic fatty liver in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;304:E187-96

7. Endo K, Weng H, Kito N, Fukushima Y, **Iwai N**. miR-216a and miR-216b as markers for acute phased pancreatic injury. *Biomed Res* 2013;34:179-88

8. Weng H, Ji X, Naito Y, Endo K, Ma X, Takahashi R, Shen C, Hirokawa G, Fukushima Y, **Iwai N**. Pex11a deficiency impairs peroxisome elongation and division and contributes to nonalcoholic fatty liver in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;304:E187-96

9. Endo K, Weng H, Naito Y, Kito N, Sasaoka T, Takahashi A, Fukushima Y, **Iwai N**. Classification of various muscular tissues by miRNA. *Biomed Res* 2013;34:289-299

10. Ji X, Naito Y, Weng H, Ma X, Endo K, Kito N, Yanagawa N, Yu Y, Li J, **Iwai N**. Renoprotective mechanisms of pirfenidone in hypertension-induced renal injury: through anti-fibrotic and anti-oxidative pathways. *Biomed Res* 2013;34:309-319

〔学会発表〕(計3件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩井直温 (I W A I , N A O H A R U)
国立循環器病研究センター・研究所・部長
研究者番号 : 30242978