

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860375

研究課題名(和文) 血清microRNAの生理的変動要因の解明：臨床検査への応用を目指して

研究課題名(英文) Association circulating miRNAs and lifestyle : aiming at application to clinical examination

研究代表者

山田 宏哉 (Yamada, Hiroya)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：80610352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：血清miRNAを臨床検査へ応用するためには、測定値がどのような要因で変動するのかというエビデンスは必須である。しかしながら、血清miRNAの生理的変動要因(性別、年齢、喫煙、飲酒習慣など)は不明である。そこで、本研究は血清miRNAを臨床検査に応用するための基礎となるデータ、『血清miRNAの生理的変動』を明らかにすることを目的とする。生理的変動要因を明らかにするために、一般住民を対象として血清miRNAsと生活習慣(飲酒、喫煙、栄養など)との関連が解析した。肥満や喫煙などで変動する血清miRNAが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Circulating micro (mi)RNA profiles are influenced by various medical conditions, and miRNAs have been examined as potential biomarkers for cancer, cardiovascular disease, and diabetes. However, few studies have investigated whether circulating miRNAs and life style factors, such as cigarette smoking and drinking, are correlated. Our aim was to determine the association between smoking status and expression of various miRNAs in a Japanese population sample. We found that life style factors is associated with elevated expression of various serum miRNAs. Our results suggest that it is necessary to consider the confounding effect caused by lifestyle when evaluating expression of serum miRNAs for diagnosing pathological conditions.

研究分野：病態検査学

キーワード：microRNA Circulating miRNA Serum miRNA 遺伝子検査 生活習慣 変動要因 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

micro-RNA (miRNA) は標的 mRNA に結合して翻訳阻害を引き起こす。最近の研究で血液中に miRNA が安定的に存在することが示された。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、この数年間で癌を中心として多くの疾患や病態により変動する有望な血清 miRNA が同定された。これら血清 miRNA は、早期発見や病態把握について既存のバイオマーカーの成績を上回っており、臨床応用が期待されている。

2. 研究の目的

臨床検査値の変動は病態変動と生理的変動より成り立っている。将来、血清 miRNA を臨床検査へ応用するためには、測定値がどのような要因で変動するのかというエビデンスは必須である。しかしながら、血清 miRNA の生理的変動要因 (性別、年齢、喫煙、飲酒習慣など) は不明である (図)。そこで、本研究は血清 miRNA を臨床検査に応用するための基礎となるデータ、『血清 miRNA の生理的変動』を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

生理的変動要因を明らかにするためには患者ではなく一般人を対象にする必要がある。申請者は一般住民を対象とした健康診断に参画しており、検診時の血清を得ることができる。さらにこの健康診断は疫学研究にも利用されており、飲酒、喫煙、栄養状態、運動習慣など多くの生活習慣データを得ることができる。この受診者の血清を用いることで生活習慣や環境要因との関連が解析し、血清 miRNA の生理的変動を明らかにする。

癌、循環器疾患、糖尿病などの生活習慣病において、臨床応用が期待されている miRNA は 20 種程度をピックアップして、これらの血清 miRNA に関してアッセイ系を構築する。対象は一般住民として健康診断に参画しており、検診時の血清を利用する。これらの対象者については、検診項目である身長、体重、body mass index、血圧、尿検査、血液検査は勿論の事、食習慣、喫煙習慣、飲酒習慣、職業など多彩な情報をアンケート調査により得ている。

血清 miRNA の測定結果と健診データや生活習慣・環境因子などの調査結果をまとめ、データベースを作成する。作成したデータベースを使用して、性別、年齢、体型、肥満度などの身体的特性との関連を明らかにする。健診データ、飲酒習慣、喫煙、栄養状態、運動歴、既往歴、ストレス度など多くの調査項目に関して解析する。

4. 研究成果

喫煙との関連について、対象者を 280 人の喫煙者 (53.2%)、現在の喫煙者 (13.5%)、76 人、元喫煙者 (170 人) (32.3%) として解析した。非喫煙者と喫煙者の miRNA の相対値を表に示す。

表. 喫煙者と喫煙者の血清 miRNA の相対値

	All	Non-smoker	Smoker	p
N	354	280	74	
miR-197 ^a	1.00 (0.62-1.86)	0.88 (0.54-1.58)	1.38 (0.93-2.39)	<0.001 ^b
let7d ^a	1.00 (0.14-2.86)	0.68 (0.11-2.55)	2.27 (0.45-4.32)	<0.001 ^b
miR-150 ^a	1.00 (0.52-2.05)	0.90 (0.44-1.80)	1.51 (0.94-3.55)	<0.001 ^b
miR-122 ^a	1.00 (0.26-3.65)	0.93 (0.22-3.15)	1.91 (0.59-5.75)	0.010 ^b
miR-21 ^a	1.00 (0.46-3.09)	0.93 (0.41-2.19)	1.76 (0.70-4.75)	0.002 ^b
miR-20a ^a	1.00 (0.37-3.17)	1.00 (0.35-2.90)	0.75 (0.38-3.73)	0.762 ^b
miR-92 ^a	1.00 (0.43-2.77)	0.90 (0.41-2.32)	1.49 (0.56-4.84)	0.010 ^b
miR-130a ^a	1.00 (0.44-2.22)	1.02 (0.43-2.14)	0.95 (0.47-3.13)	0.803 ^b
miR-199 ^a	1.00 (0.27-3.25)	1.04 (0.23-2.91)	0.96 (0.39-3.82)	0.212 ^b
miR-17 ^a	1.00 (0.42-2.18)	0.91 (0.40-2.00)	1.45 (0.58-3.73)	0.030 ^b
miR-195 ^a	1.00 (0.35-2.68)	0.94 (0.35-2.62)	1.16 (0.38-3.47)	0.553 ^b
miR-27a ^a	1.00 (0.38-3.91)	1.04 (0.38-4.02)	0.81 (0.40-3.30)	0.876 ^b
miR-103 ^a	1.00 (0.18-8.96)	1.10 (0.19-8.72)	0.93 (0.10-15.01)	0.469 ^b
miR-192 ^a	1.00 (0.43-1.91)	0.91 (0.39-1.61)	1.26 (0.65-2.96)	<0.001 ^b
miR-34a ^a	1.00 (0.58-1.66)	0.93 (0.52-1.55)	1.34 (0.89-2.18)	0.006 ^b
miR-146 ^a	1.00 (0.34-2.06)	0.98 (0.30-1.81)	1.23 (0.47-2.79)	0.072 ^b
miR-222 ^a	1.00 (0.55-1.68)	0.95 (0.55-1.64)	1.09 (0.64-2.09)	0.263 ^b
miR-221a ^a	1.00 (0.32-4.67)	1.07 (0.32-4.67)	0.93 (0.35-4.56)	0.699 ^b
miR-133a ^a	1.00 (0.45-2.35)	0.99 (0.49-2.32)	1.08 (0.39-2.41)	0.999 ^b
miR-1 ^a	1.00 (0.47-1.74)	0.99 (0.47-1.74)	1.05 (0.40-2.21)	0.518 ^b
miR-126 ^a	1.00 (0.41-2.14)	0.96 (0.41-2.14)	1.19 (0.50-2.73)	0.233 ^b
miR-320 ^a	1.00 (0.61-1.53)	0.94 (0.57-1.41)	1.24 (0.80-2.34)	<0.001 ^b

^a 中央値 (25th-75th), ^b Willcoxon検定(Non-smoker vs Smoker)

交絡変数の調整後の喫煙状況に応じた参加者の血清 miRNA レベルを示す。現在の喫煙者は、喫煙者と比較して、致死 (let) -7d、miRNA (miR) -150、miR-192、miR-197、および miR320 の血清レベルが有意に高かった。以前の喫煙者では、血清 miR-150 濃度が有意に高かった。また、喫煙状況に応じて上昇した血清 miRNA に対する 95%CI を有する調整されたオッズ比で、現在の喫煙者は、喫煙者ではないよりも、上昇した let-7d、miR-21、miR122、miR-146、miR-150、miR-192、miR-197、miR320 が有意に高かった。一方、以前の喫煙者は、上昇した血清 miR-1、miR-146、miR-150、miR195、および miR-320 の有意に高いことが明らかとなった。

また、肥満指標の関連を明らかにするために、対象者の BMI、内蔵脂肪、皮下脂肪、体脂肪率などとの関連を解析した。miR-21、miR-27a、miR-103a は内臓脂肪量と関連があることが明らかとなった。miR-27 や miR-103a は BMI と関連が認められた。これらの結果より、血清 miRNA は体格などに影響されることが明らかとなった。

現在使用されている臨床検査項目は Evidence Based Laboratory Medicine: EBLM に基づいており、生理的変動要因が明らかになっている。血清 miRNA についても生理的変動を明らかにして、臨床応用への基礎とすることが必要である。本研究は、臨床応用が期待されている血清 miRNA について解析

した結果、生理的変動要因でこれら miRNAs が変動することが明らかとなった。これら成果は血清 miRNA 研究が臨床検査に応用するためには必須であり、重要な基礎データとなる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1. Hiratsuka I, Yamada H, Munetsuna E, Hashimoto S, Itoh M. Circulating microRNAs in Graves' Disease in Relation to Clinical Activity. *Thyroid*. 2016; 26(10):1431-1440.
2. Yamazaki M, Munetsuna E, Yamada H et al. Fructose consumption induces hypomethylation of hepatic mitochondrial DNA in rats. *Life Sci*. 2016; 149:146-52.
3. Suzuki K, Yamada H, et al. Association of cigarette smoking with serum microRNA expression among middle-aged Japanese adults. *FMJ*. 2016; 2(1).
4. Ohashi K, Munetsuna E, Yamada H, et al. High fructose consumption induces DNA methylation at PPAR and CPT1A promoter regions in the rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;468(1-2):185-9.
5. Yamada H, Ohashi K, Suzuki K, Munetsuna E, Ando Y, Yamazaki M, Ishikawa H, Ichino N, Teradaira R, Hashimoto S. Longitudinal study of circulating miR-122 in a rat model of non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Chim Acta*. 2015; 15;446:267-71.
6. Watarai R, Yamada H et al. Association between serum levels of carotenoids and serum asymmetric dimethylarginine levels in Japanese subjects. *J Epidemiol*. 2014;24(3):250-7.
7. Yamada H, Itoh M, Hiratsuka I, Hashimoto S. Circulating microRNAs in autoimmune thyroid diseases. *Clinical Endocrinology (Oxf)*. 2014; 81(2):276-81.

[学会発表](計 9 件)

1. Yamazaki M, Suzuki K, Yamada H, Ohashi K, Ichino N, Ishikawa H, Osakabe K, Sugimoto K, Munetsuna E, Mizuno G, Kondo K, Inoue T, Teradaira R. Serum levels of mir-20a and mir-27a are associated with NAFLD in a general Japanese population: the

Yakumo study. IFCC - EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, EUROMEDLAB PARIS 2015. Paris, France. 2015

2. Yamazaki M, Yamada H, Ando Y, Ohashi K, Suzuki K, Ichino N, Ishikawa H, Taromaru N, Nagura A, Osakabe K, Sugimoto K, Inoue T, Hamajima N, Teradaira R. Associations between circulating microRNAs miR-20a or miR-27a and non-alcoholic fatty liver disease in a general Japanese population: the Yakumo study. IFCC International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, WorldLab Istanbul 2014. Istanbul, Turkey. 2014
3. Nagura A, Yamada H, Ohashi K, Ishikawa H, Ichino N, Ando Y, Taromaru N, Yamazaki M, Watarai R, Inoue T, Hamajima N, Teradaira R. Circulating microRNA, miR197, let7d, miR150, miR92 is influenced by smoking status in general population. IFCC International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, WorldLab Istanbul 2014. Istanbul, Turkey. 2014
4. 山崎未来、山田宏哉、安藤嘉崇、大橋鉦二、鈴木康司、市野直浩、石川浩章、名倉鮎里、太郎丸奈央、刑部恵介、杉本恵子、井上孝、寺平良治: 住民健診受診者における血清 miR-20a、miR-27a、miR-146、miR-320 と NAFLD との関連性 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会; 福岡.福岡国際会議場 (福岡市) 2014.
5. 山崎未来、山田宏哉、鈴木康司、市野直浩、石川浩章、刑部恵介、杉本恵子、宗綱栄二、近藤奏子、水野元貴、村瀬悠理、井上孝、寺平良治、大橋鉦二: 住民健診受診者における血清 miRNA 値と皮下脂肪・内臓脂肪との関連 第 55 回日本臨床化学会年次学術集会; 大阪. 大阪大学コンベンションセンター(吹田市) 2015.
6. 山田 宏哉. 新規バイオマーカーとしての分泌型 microRNA と臨床検査への応用(シンポジウム). 第 55 回日本臨床化学会; 大阪. 2015 . 大阪大学コンベンションセンター(吹田市) 2015.
7. 山田 宏哉. 新規バイオマーカーとしての血中 microRNA と臨床検査への応用(教育講演). 第 25 回日本臨床検査医学会近畿支部総会. 大阪. 大阪大学コンベンションセンター (吹田市) 2015.
8. 山崎未来、山田宏哉、安藤嘉崇、近藤奏子、水野元貴、村瀬悠理、太田駿瑠、石川浩章、宗綱栄二、鈴木康司、大橋鉦二: 非アルコール性脂肪性肝疾患モデル動物

における miR-20a, miR-27a の経時的変化 第 56 回日本臨床化学会年次学術集会; 熊本, くまもと県民交流館パレア(熊本市) 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 宏哉 (Yamada, Hiroya)
藤田保健衛生大学・医学部・助教
研究者番号：80610352

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()