

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：32644

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893278

研究課題名(和文) ヒト急性心筋梗塞組織における網羅的マイクロRNA解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of microRNAs using patients' tissues with acute myocardial infarction.

研究代表者

垣本 由布 (KAKIMOTO, Yu)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：40734166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：(1)法医解剖例のうち、死後1日以内に冷蔵保存され、1週間以内にサンプリングが行われた組織では、miRNAが安定して検出された。(2)ホルマリン固定組織では、miRNAは長いRNAよりも劣化しにくいものの、固定期間と相関して検出量は減少した。(3)ホルマリン固定期間が2ヶ月以内の組織では、長さの一致したmiRNAを内部標準として用いれば、qPCRによるmiRNAの定量解析は可能であった。(4)次世代シーケンサーで同定された心臓miRNA1,134種のうち、14miRNAが心房で、11miRNAが心室で優位に発現していた。(5)miR-208familyは著明な房室局在を示した。

研究成果の概要(英文)：(1)MiRNAs were stably detected in the autoptic cases, where the bodies were moved to the morgue within a day and the tissues were sampled within a week. (2)Under formalin fixation, miRNAs were more stably detected than longer RNAs, but decreased depending on the fixation period. (3)MiRNAs in FFPE tissues within 2-month fixation could be quantified by real-time PCR with the miRNA-size control. (4)Among 1,134 miRNAs identified by next-generation sequencing, 14 miRNAs were upregulated in atrium, and 11 miRNAs were upregulated in ventricle. (5)MiR-208 family showed significant chamber-specificity in the human heart.

研究分野：法医学

キーワード：miRNA 心房 心室 ヒト組織 解剖検体 心筋梗塞

## 1. 研究開始当初の背景

法医学分野で扱われる内因性突然死の過半数は心疾患による突然死である。なかでも最も頻度の高い急性心筋梗塞 (AMI) は、法医学実務においてしばしば診断に苦慮する重要な疾患である。心電図などの生理学的検査が行えない解剖事例では、組織学的検索が不可欠であるが、超急性期には肉眼的な変化が認められない。顕微鏡の下ではごく早期のAMIを診断することができるが、ホルマリン固定標本の作製には時間がかかるため、迅速な診断が難しいのが実情である。

現在AMIの診断マーカーとしては、梗塞心筋から血中に逸脱するタンパク質が主に用いられている。しかし、迅速診断キットとして広く臨床利用されているトロポニンTは発症後3時間以内では偽陰性が多く、より早期から血中濃度が上昇するミオグロビンは骨格筋にも多量に発現しているため疾患特異性が低いなどの問題点がある。

これに対し、およそ22ヌクレオチドの極めて小さいRNAであるマイクロRNA (miRNA) の中には、AMI発症後1時間以内から有意に血中濃度が上昇するものもあり、特に心臓での発現が多いmiR-208、miR-499などのmiRNAは新たな診断マーカーとして期待されている。

miRNAは、タンパク質を直接コードしないノンコーディングRNAであり、メッセンジャーRNAの翻訳を阻害することで、タンパク質の発現を制御している。miRNAはRNaseによる分解を受けにくく、血液中でも安定に存在する。循環器分野においては、これまで患者の血液や尿、あるいは動物の心臓を利用してmiRNA研究が行われてきたが、患者の心筋組織を用いた検討は未だ十分に行われていない。そのため、血液や尿中で存在量が変化するmiRNAが具体的に心臓のどの部位由来しているのかについては確証が得られていない。例えば、AMI患者血液中が増加するmiRNAに

ついても、傷害心筋から逸脱しているのか、あるいは残存心筋から対償的に分泌されているのかは明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

(1)剖検検体における死後の経過時間、ホルマリン固定期間がmiRNA解析に与える影響を明らかにする。死後環境におけるmiRNAの安定性を評価することで、miRNAの定量性が保たれる標本条件を検討する。(2)健常心房と健常心室における包括的なmiRNA発現を明らかにする。心臓は、主に神経ホルモン分泌に携わる心房と、物理的なポンプ作用を担う心室で形態が大きく異なる。心臓のなかでも部位特異的に発現するmiRNAが存在する可能性は高い。しかし、これまでヒトの健常心臓における部位別のmiRNA発現を調べた報告はない。正常心臓でのmiRNA発現データから、心房と心室の生理的機能分担に関わるmiRNAを特定する。(3)AMI患者の心臓組織を用いてmiRNA解析を行う。これまでAMI患者の心臓組織を用いた包括的な解析は行われていない。法医解剖では心臓を摘出後、全周性に組織標本作製するため、詳細な病理所見に基づくサンプリングが可能となる。ミクロレベルでAMI組織標本を用い、miRNA解析を行うことで、これまでの血液や尿サンプルのみの研究では得られなかった新たなバイオマーカー候補の発見が期待される。さらに、本研究は死亡前に病院受診に至らなかったAMI突然死症例を対照とするため、入院後の血液サンプルを試料とする臨床研究に比べて、より発症早期に変動を示すmiRNAを捉えられる可能性がある。

## 3. 研究の方法

(1)健常な左室自由壁の凍結標本(n=11、死後10-154時間)とホルマリン固定標本(n=17、固定期間1週間-37カ月)からRNAを抽出し(mirVana miRNA Isolation kit, RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation kit)、電気泳動(2100BioAnalyzer)での波形を比較した。(2)また、同サンプルを用い、リード長の異なるsmall RNA(21-106 nt; U6 snRNA, U47,

RNU6B, miR-191, miR-26b, miR-1, miR-208b, miR-499a)のリアルタイム PCR を行い、各 RNA の検出量を比較した。(3)ホルマリン固定(<2 ヶ月)された AMI 左室組織(n=4)と健常左室組織(n=7)を用い、既知の AMI バイオマーカー(miR-1, miR-208b, miR-499a)について、リアルタイム PCR で定量比較した。内部標準としては、ホルマリンの影響を受けにくい miR-191 と miR-26b を使用した。(4) 凍結健常心臓(n=4)の左房組織(LA)と左室組織(LV)から RNA を抽出し、Deep Sequencing(IonPGM, 318chip)を行い、網羅的な定量解析を行った。発現差がみられた miRNA については、リアルタイム PCR で再度定量を行った。

#### 4. 研究成果

(1)電気泳動では、死後 1 週間まで miRNA のバンドピークが確認された。ホルマリン固定組織でも miRNA のバンドピークは確認されたが、200 nt 以下の small RNA 全体量が経時的に増加しており、mRNA などの長い RNA が断片化していると考えられた(図 1)。

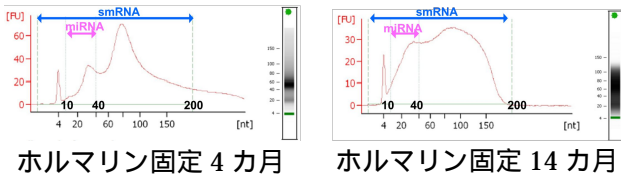


図 1

(2)リアルタイム PCR では、死後 1 週間まで各 small RNA が安定して検出された。一方、ホルマリン固定組織では、いずれの small RNA も、固定期間と相関して検出量が減少した( $0.80 < R^2 < 0.98$ )。ただし、Small RNA のなかでも、40 nt 以上の U6 snRNA, U47, RNU6B の減少が目立ち、miRNA の減少率は低かった(図 2)。よって、miRNA は、長期ホルマリン固定下でも、他の RNA より安定であることが確認された。

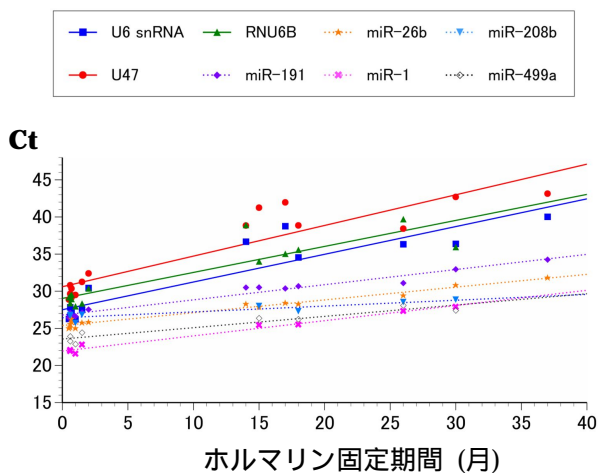


図 2

(3)梗塞組織のリアルタイム PCR では、miR-1

と miR-499a が減少、miR-208b が増加した(図 2)。この変動は先行研究と一致する。以上の結果から、ホルマリン固定された剖検組織検体でも、リアルタイム PCR にて、miRNA の定量解析が行えることが示された。

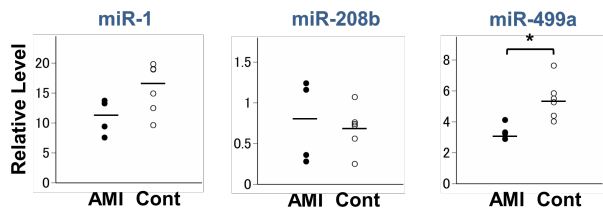


図 3

(4)房室筋のシーケンスで同定された計 19,830,155 リードのうち、35%の 6,975,989 リードが miRNA であり、1,134 種の miRNA が同定された。10 リード以上が検出された 438miRNA のうち、14miRNA が LA 優位、11miRNA が LV 優位に発現していた(図 4)。これら 25miRNA のうち、発現量が多い 10miRNA について、9 名分の心組織でアルタイム PCR を行ったところ、9miRNA でシーケンシングと同様の発現差が確認された(図 5)。とくに miR-208 family については、miR-208a-3p と miR-208a-5p が心房で、miR-208b-3p と miR-208b-5p が心室で優位に発現していることが示された。これまでに、miR-208a は房室間の刺激伝導に関わること、miR-208a の過剰発現で心肥大が引き起こされること、miR-208b が虚血や心肥大などの心負荷時に増加すること知られている。今回明らかとなった miRNA の房室発現プロファイルは、心筋 miRNA の部位特異的な作用を裏付けるものである。

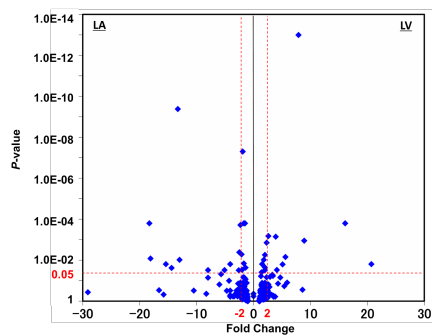


図 4

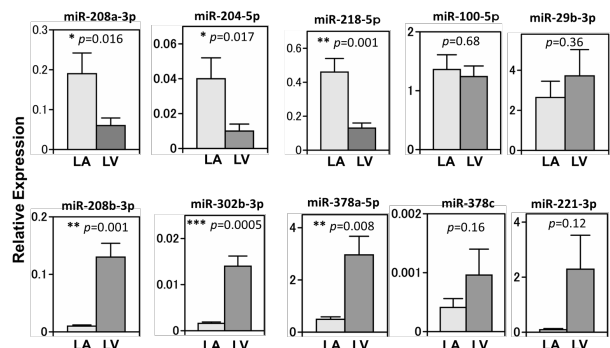


図 5

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2件)

“MicroRNA deep sequencing reveals chamber-specific miR-208 family expression patterns in the human heart.”  
Kakimoto Y, Tanaka M, Kamiguchi H, Hayashi H, Ochiai E, Osawa M: Int J Cardiol. 2016; 211:43-8 (査読あり)

doi: 10.1016/j.ijcard.2016.02.145.

“MicroRNA Stability in Postmortem FFPE Tissues: Quantitative Analysis Using Autoptic Samples from Acute Myocardial Infarction Patients” Kakimoto Y, Kamiguchi H, Ochiai E, Satoh F, Osawa M: PLOS ONE. 2015;10(6):e0129338 (査読あり)  
doi: 10.1371/journal.pone.0129338.

[学会発表](計3件)

「剖検組織検体を用いた microRNA Deep Sequencing の検討」垣本由布、佐藤文子、落合恵理子、大澤資樹：第100次日本法医学学会学術全国集会、2016年6月16日、きゅりあん(東京都品川区)

“Detection of miRNAs in tissue samples at autopsy: A trial for diagnostics at postmortem” Kakimoto Y, Kamiguchi H, Ochiai E, Satoh F, Osawa M: 26th Congress of the International Society for Forensic Genetics, 2015年9月3日、クラクフ(ポーランド)

「マイクロRNAを用いた死後診断の展望：死後経過時間とホルマリン固定期間の影響」垣本由布、佐藤文子、宮下京子、大澤資樹：第99次日本法医学学会学術全国集会、2015年6月12日、かるぼーと(高知県高知市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

垣本 由布 (KAKIMOTO, Yu)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：40734166

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし