

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19300

研究課題名(和文) 刺激伝導系を中心とした心臓性突然死関連マイクロRNAの局在解析

研究課題名(英文) Localization analysis of microRNAs relating to sudden cardiac death in conduction system of the human heart

研究代表者

垣本 由布 (KAKIMOTO, Yu)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：40734166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：初めに、同一剖検例の心臓凍結組織とホルマリン固定(FFPE)組織のシーケンス定量結果を比較した。FFPE組織では主に3'末端側から断片化が進行し、とくにGC含有が40%未満のmiRNAは検出リード数が減少した。よってFFPE組織では信頼性のある定量結果が得られないと判断した。次に解析対象と致死性心肥大として、凍結組織を用いて肉眼的にサンプリングが可能な左室作業心筋の解析を行った。心肥大を伴う心臓性突然死(SCH)、生理的心肥大(CCH)、心肥大のない健常例を比較すると、SCHとCCHでmiR-221が段階的に増加しており、miR-221が心肥大患者の突然死リスクマーカーとなる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：At first, we performed miRNA deep sequencing using frozen and formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cardiac tissues from identical patients. The comparison revealed that more bases were lost at the 3' end of miRNAs, and miRNAs with GC% of less than 40% were significantly degenerated in FFPE specimens. Therefore we concluded that miRNA deep sequencing using FFPE tissue does not produce reliable quantitative results, and decided to use frozen tissue thereafter. Next, we performed miRNA deep sequencing using working myocardia from left ventricles, which can be sampled macroscopically. The comparison among sudden cardiac death with cardiac hypertrophy (SCH) patients, compensated cardiac hypertrophy (CCH) subjects, and control cases revealed stepwise increase of miR-221 in SCH and CCH. MiR-221 may be a predictive and diagnostic biomarker for sudden death in cardiac hypertrophy subjects.

研究分野：法医学

キーワード：マイクロRNA 心臓性突然死 心肥大 次世代シーケンサー ホルマリン固定組織

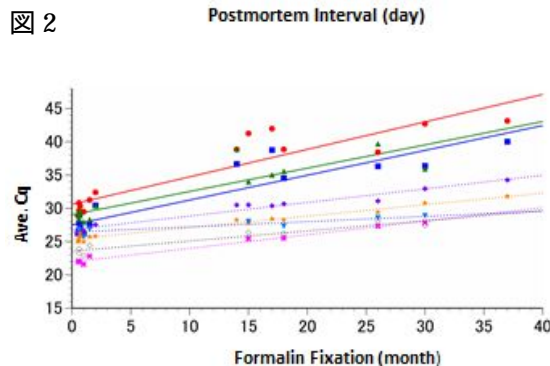
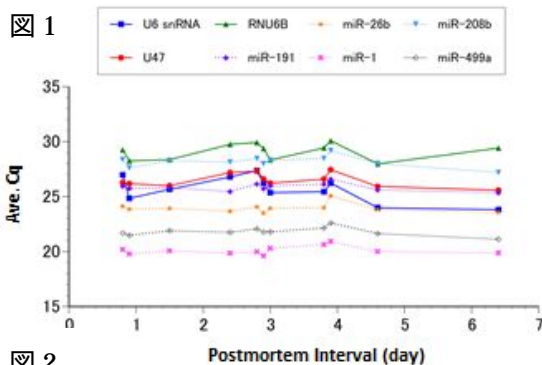
## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 心臓性突然死診断の問題点

心臓性突然死は、法医解剖において最も多く遭遇する内因性の突然死因である。しかし、その診断は必ずしも容易ではない。心電図が得られない剖検例では、致死性不整脈の生理学的診断は行えない。また、致死性不整脈は心筋梗塞発症直後の死因としても重要であるが、超急性期の心筋梗塞の肉眼的な組織変化はきわめて乏しい。そのため、法医実務においては患者組織を顕微鏡下で観察し、より詳細なミクロ所見を得ることが求められるが、組織学検査でも明らかな形態変化が認められない症例も少なくない。

### (2) 死後診断における miRNA の有用性

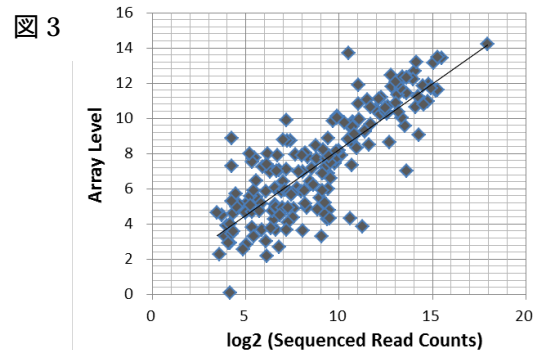
近年循環器分野でも注目されているマイクロ RNA (miRNA) は、20 - 25 ヌクレオチドの極めて小さい RNA である。miRNA はタンパク質を直接コードしないノンコーディング RNA であるが、様々なメッセンジャー RNA に相補的に結合し、翻訳を阻害することで遺伝子の発現を幅広く制御している。miRNA の中には、心房細動などの不整脈患者組織で発現が変化しているもの、急性心筋梗塞の超急性期に発現が変化するものが知られている。また、miRNA は RNase による分解を受けにくく、高温や pH 変化に曝されても劣化しにくいいため、法医学分野における死後診断でも活用できる可能性が高い。我々はこれまでに、剖検組織において死後 1 週間まで miRNA が安定して存在すること (図 1)、またホルマリン固定 (FFPE) 組織においても適切な内部標準を用いれば miRNA のリアルタイム PCR による定量分析が可能であることを確認した (図 2)。



### (3) 剖検組織の網羅的 miRNA 発現解析

現在広く用いられている遺伝子解析の網羅的解析ツールとしては、マイクロアレイとシーケンシングが挙げられる。

そこで、剖検例の凍結心臓組織を用いてマイクロアレイと次世代シーケンサーによる解析結果を比較したところ、同定された miRNA 数はマイクロアレイで 222 種、次世代シーケンサーで 451 種であった。さらに、発現量の多かった上位 191 種について、マイクロアレイのシグナル強度とシーケンスのリード数を比較したところ、 $r=0.86$  の高い相関を認められた (図 3)。したがって、死後組織検体を用いても miRNA の網羅的解析は可能であり、マイクロアレイと次世代シーケンサーの定量性はほぼ同定であることが示された。ただし、次世代シーケンサーの方が低発現の miRNA まで検出でき、miRNA の同定数は 2 倍以上となること、データベースに存在しない新規の miRNA も検出できることなどのメリットがあり、同コストで分析できる場合は次世代シーケンサーが優先される。



## 2. 研究の目的

### (1) ホルマリン固定組織を用いた miRNA シーケンスの検討

心臓組織からその局在に応じて心筋細胞を切り出すためには、ミクロレベルで細胞構築が観察できる FFPE 標本からの切り出しが望ましい。従来 FFPE 標本での DNA シーケンスは困難とされてきたが、断片化しにくい miRNA については近年成功例が報告されている。法医解剖で得られたホルマリン固定標本を用いた miRNA シーケンスの条件検討を行う。

### (2) ヒト健常例および心臓性突然死例における miRNA 発現分布解析

ヒトの心臓において、刺激伝導系を構成する特殊心筋は作業心筋とは異なる分化を示しており、それぞれの心筋が独自の miRNA 発現プロファイルを有すると想定される。そこで、各部位から採取した組織を用い、次世代シーケンサーで網羅的な解析を行う。著明な局在が示唆された miRNA については、サンプル数を増やしてリアルタイム PCR で発現量を確認する。

また、刺激伝導系での局在が確認された miRNA について、心臓性突然死例で発現量に変動がみられないか検討する。

### 3. 研究の方法

第一段階では、バイオマーカー探索の前段階として、FFPE 組織の miRNA シーケンシングで信頼性のある定量結果が得られるかを検討した。同一剖検例 (n=3) の心臓凍結組織と FFPE 組織について、次世代シーケンサー IonPGM を用いて miRNA の網羅的定量解析を行った。十分な相関が確認されれば、FFPE 組織で刺激伝導系に沿ったミクロレベルでのサンプリングを行い、miRNA の発現解析を行う予定であった。

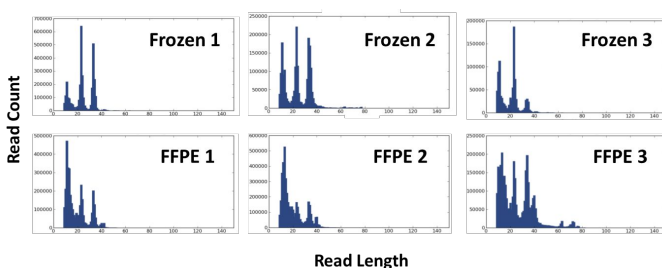
しかし凍結組織との比較の結果、FFPE 組織では一部の miRNA の定量結果が変動することが確認されたため以降の実験方針を変更した。第二段階では、凍結組織でもサンプリングが可能な作業心筋を分析試料とし、心肥大を伴う心臓性突然死 (SCH, n=10)、生理的心肥大 (CCH, n=8)、心肥大のない健常例 (Con, n=8) の解析を行った。SCH 症例は、虚血性心不全、高血圧性心不全、大動脈硬化症による突然死例であり、遺伝子変異が主病因となる肥大型心筋症や拡張型心筋症は除外した。

### 4. 研究成果

#### (1) FFPE 組織の miRNA 定量シーケンス

(a) 同定結果：凍結組織からはライブラリ平均約 215 万リード、FFPE 組織からは平均 380 万リードが得られた。両組織ともに約 22nt のリードピークを認めたが、FFPE 組織では 11nt のリード数がより多かった (図 4)。凍結組織では 32% のリードがヒトゲノムにマッピングされたが、FFPE 組織では 9.4% のマッピング率にとどまった。FFPE 組織では、主に 3' 末端側から断片化が進行しており、リード数の増加とマッピング率の低下を招いたと考えられた。

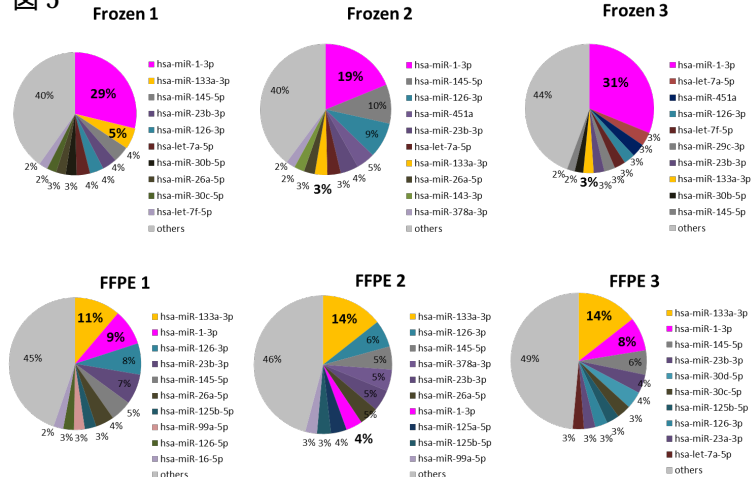
図 4



(b) 定量結果：発現上位 240 種の miRNA について、凍結組織・FFPE 組織での発現量は指数関数では良好な相関を認めた ( $0.88 < r < 0.92$ )。しかし、99 種の miRNA は両組織間で 2 倍以上の増減がみられた。FFPE 組織で減少した 30miRNA は GC 含有率が低く ( $36 \pm 6\%$ )、増加した 69miRNA は GC 含有率が高かった ( $54 \pm 9\%$ )。そのため、シーケンス結果を総リード数で標準化した場合、発現最多の miRNA は凍

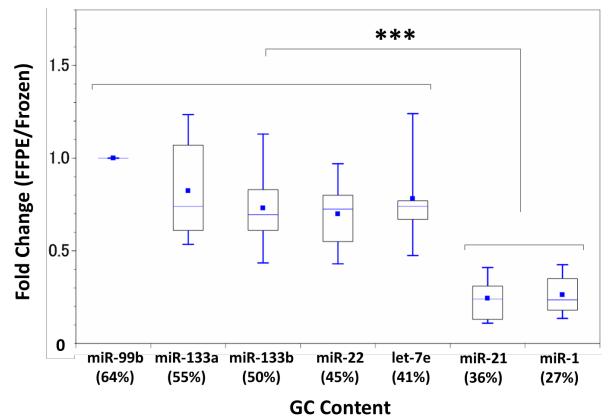
結組織では miR-1-3p だったのに対して、FFPE 組織では miR-133a-3p となるような不一致がみられた。(図 5)

図 5



(c) GC 含有率の影響：GC 含有率の異なる miRNA (27 -64%) について、10 名分の凍結組織と FFPE 組織を用いてリアルタイム PCR を行った。FFPE 組織では、GC 含有率 40% 以下の miRNA が有意に減少していた ( $p < 0.0001$ , 図 6)。以上の結果から、FFPE 組織を用いた miRNA シーケンスでは必ずしも定量性が保証されないことが示された。よって以降の実験では凍結組織を用いて定量解析を行った。

図 6



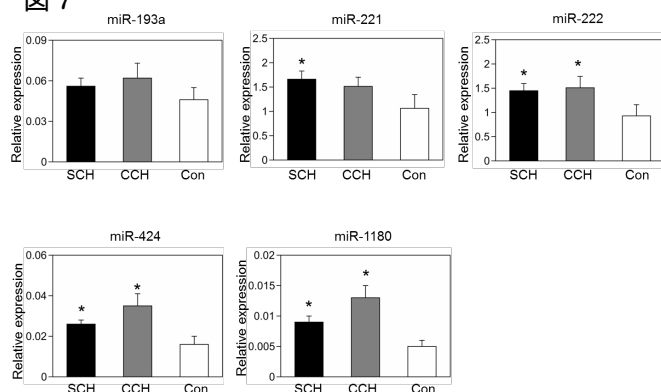
#### (2) 致死性心肥大症例の miRNA 解析

SCH・CCH・Con の 3 群間で年齢・性別に有意な差はなかった。心重量は、各群  $450 \pm 15$ 、 $478 \pm 18$ 、 $325 \pm 19$  g。身長で補正した心重量は  $2.7 \pm 0.1$ 、 $2.9 \pm 0.1$ 、 $2.0 \pm 0.1$  g/cm であり、SCH と CCH はいずれも Con と比較して有意な心肥大所見を示した ( $p < 0.001$ )。また、左室全周性に組織標本作製し、顕微鏡下で測定したところ、心筋径が  $22.1 \pm 1.0$ 、 $18.8 \pm 0.8$ 、 $13.6 \pm 1.6$   $\mu\text{m}$ 、核径が、 $8.4 \pm 0.7$ 、 $7.5 \pm 0.6$ 、 $5.2 \pm 0.5$   $\mu\text{m}$  と、SCH と CCH の心筋肥大所見が確認された ( $p < 0.001$ )。ただし組織学的に SCH と CCH に有意な差は認めなかった。

次に各群それぞれ 4 症例の凍結心臓組織 (左

心室自由壁)から抽出した RNA を、次世代シーケンサーMiSeq を用いて網羅的に定量解析した。その結果、ライブラリ平均 264 万リードのヒト miRNA がシーケンスされ、240 種の miRNA が共通して検出された。このうち SCH と CCH 間で発現量に差が見られた 5 種の miRNA について、リアルタイム PCR で定量分析を行ったところ、miR-221 が SCH で有意に増加していることが確かめられた ( $p < 0.05$ , 図 7)。

図 7



in vitro および動物実験では、miR-221 がオートファジーを阻害して心肥大と心不全を引き起こすことが知られており、本研究で明らかとなった SCH 患者における miR-221 の増加も、心筋のクリアランス不全を表すものと推定される。miR-221 が心肥大症例における突然死のリスクマーカーとなる可能性が示された。

## 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)

Yajima Y, Hiratsuka T, Kakimoto Y, Ogawa S, Shima K, Yamazaki Y, Yoshikawa K, Tamaki K, Tsuruyama T

“Region of Interest analysis using mass spectrometry imaging of mitochondrial and sarcomeric proteins in acute cardiac infarction tissue”

Sci Rep. 2018 May 10;8(1):7493.

doi:10.1038/s41598-018-25817-7.

査読有

Kakimoto Y, Tanaka M, Kamiguchi H, Ochiai E, Osawa M

“MicroRNA Stability in FFPE Tissue Samples: Dependence on GC Content”

PLoS One. 2016 Sep 20;11(9):e0163125.

doi:10.1371/journal.pone.0163125.

査読有

[学会発表](計2件)

「microRNA を用いた法医解剖診断の可能

性」

垣本由布

第 101 次日本法医学会学術全国集会、2017

「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 次日本法医学会学術全国集会、2016

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

垣本 由布 (KAKIMOTO, Yu)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：40734166

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

神口 浩 (KAMIGUCHI, Hiroshi)

田中 政之 (TANAKA, Masayuki)