

# 血清マイクロRNAを用いた急性心筋梗塞の二次予防法の確立

大阪大学大学院 医学系研究科 遺伝子機能制御学教室  
河原 行郎

## 1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

心疾患は日本の三大死因の一つで、このうち急性心筋梗塞を含めた虚血性心疾患は6割以上を占めており、依然としてその予後改善が社会的に求められている。近年、急性心筋梗塞は急性期治療の進歩により短期的な予後は改善している。しかしながら、結果的に退院後、心不全を発症するケースが増加していることから、長期的な予後の観点からは改善の余地が残る。これには、急性心筋梗塞後、心不全に至るケースを簡便に予測できる生化学的バイオマーカーの確立が必要であり、我々はバイオマーカー候補としてマイクロRNAに着目した。マイクロRNAは遺伝子発現を転写後レベルで制御する小さな機能性RNAであり、ヒトでは約1500種類が同定されている。血清や血漿中のマイクロRNAは、かつては不安定ですぐに分解されると考えられていたが、現在はexosomeと呼ばれる分泌顆粒中において安定的に存在していることが分かっている (Skog et al, Nat Cell Biol, 2008)。さらに癌細胞においては、発がん関連マイクロRNAがexosomeに内包されて細胞外に分泌され、遠隔の細胞に入り込んで機能することが知られている。このため、血清中の特定のマイクロRNA発現解析は、簡便に診断可能な腫瘍マーカーとして、あるいは予後予測マーカーとして応用できると期待されている (Mitchell et al, PNAS, 2008)。

一方、急性心筋梗塞後に心不全を発症するケースが少なからずあるが、これを簡便かつ網羅的に予測できるバイオマーカーは現在なく、二次予防による長期予後の改善という観点からも確立が期待されている。このような心不全発症例においては、梗塞後の心臓組織または血管内皮細胞から、発症に関与するマイクロRNAがexosomeに内包されて分泌されていると可能性があることから、そのようなマイクロRNAが同定できれば、優れたバイオマーカーとして活用できると考えた。したがって、本研究においては、心筋梗塞二次予防につながる簡便かつ網羅的に評価可能なバイオマーカーを確立するため、心筋梗塞後の心不全発症に関与するマイクロRNA群を血清中から同定し、更にこれらのマイクロRNA群がどのように心不全発症に関与するのか、その分子メカニズムを統合的に解明することを目的とした。

## 2. 方法

本研究では、大阪大学医学部循環器内科(小室一成教授)が中心となって運用している大阪急性冠症候群研究会(OACIS)と呼ばれるデータベースを活用した。OACISとは、1998年4月より開始し、近畿圏の25の心臓救急施設から急性心筋梗塞症例を登録している多施設共同前向き観察研究である。2010年6月現在で9790例の登録者の中から、慢性期に血清を保存している症例を抽出し、更に、心不全非発症群(退院後心血管事故を起こさず2年以上経過)と発症群(退院後1年以内に心不全を発症)の二群を、患者背景の傾向分析スコアマッチング法によりマッチングさせた。まず一次スクリーニングとして各群7例ずつ選択し、凍結保存血清から抽出したRNAを用いて、マイクロRNAマイクロアレイ(ABI社)を用いた網羅的スクリーニングを行った。次に二次スクリーニングとして心不全発症群21例、非発症群65例まで症例数を増やし、一次スクリーニングの結果候補として残ったマイクロRNA個々に対して定量RT-PCR法を用いて発現量を定量・比較した。内在性コントロールとして、U6 snRNA, let-7d, miR-766の3つを用いて検討した。さらに、血清を、ExoQuick Exosome Precipitation Solution (System

Biosciences社)を用いて、Exosome分画とそれ以外の上清分画に分け、各分画でのマイクロRNA発現量も併せて定量・比較した。

### 3. 結果 研究成果

はじめに、患者背景をマッチングさせた心不全発症群と非発症群各7例の凍結血清からRNAを抽出し、アレイを用いて発現に差を認めるマイクロRNAを網羅的にスクリーニングした。この結果、17個のマイクロRNAに有意差、ないし発現に差を認める傾向を認めた。このため、心不全群21例、非発症群65例に症例を増やし、17個の候補マイクロRNAに対して個々に定量RT-PCR法を用いて定量・比較した。その結果、14個のマイクロRNAには発現に有意差を認めなかったが、3個のマイクロRNA (miR-192, miR-194, miR-34a)が、心不全発症群で有意に発現上昇していることが確かめられた (図1)。これら3つのマイクロRNAは、内在性コントロールをU6 snRNA, let-7d, miR-766のいずれにしても有意差を認めた。次に、心筋梗塞後に心不全を発症した34例において、血清を採取した時点から心不全発症までの日数と、miR-192の発現量との相関関係を解析したところ、緩い相関関係を認めた (図2)。この結果は、血清中のmiR-192の発現量が高いほど、早期に心不全を発症することを示唆しており、心不全予測バイオマーカーとして利用できる可能性があると考えられた。

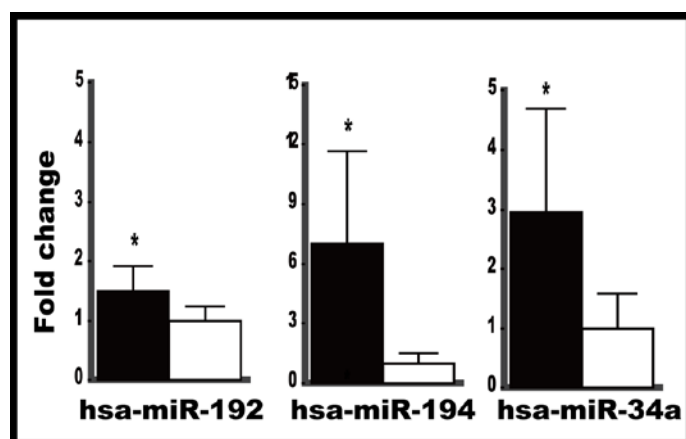


図1.心筋梗塞後心不全発症群で有意に発現上昇を認めた血清マイクロRNA。黒が心不全発症群、白が非発症群。

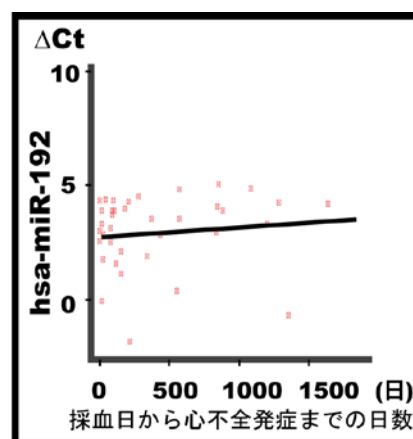


図2.血清 miR-192 の発現量と心不全発症までの日数との相関。R = 0.363, p < 0.05, n = 34)。

心不全症例の血清中で発現上昇を認めた3つのマイクロRNAが、exosomeに内包されているのかどうかを解析するため、血清をexosome分画と上清分画に分離した。その上でRNAを各分画から抽出し、3つのマイクロRNAの発現量を定量した。その結果、いずれのマイクロRNAもexosome分画に濃縮されていることが確かめられた (図3A)。更に、心不全症例の血清中で発現上昇を認めた3つのマイクロRNAは、いずれもexosome分画のみで発現上昇していることが分かった (図3B)。この結果から、3つのマイクロRNAは、何らかの組織からexosomeに内包されて分泌されていると考えられた。

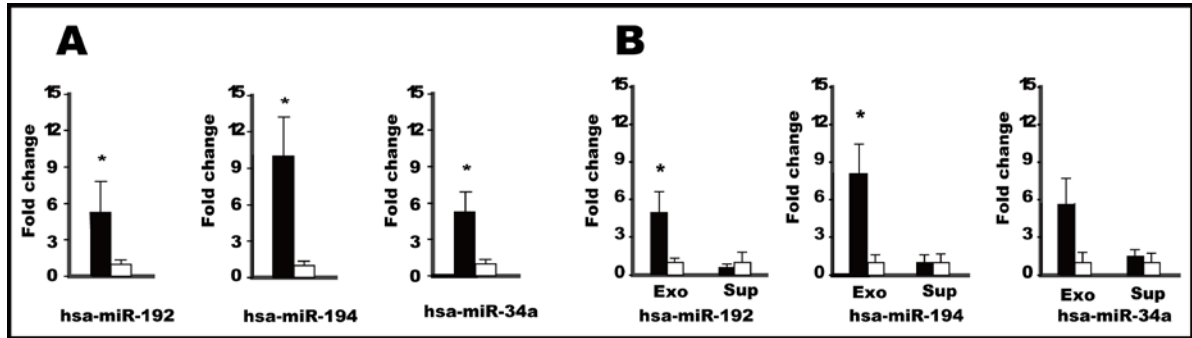


図3.血清 exosome 分画中のマイクロ RNA。A. 通常 miR-192, miR-194, miR-34a はいずれも、上清分画 (白)と比較して有意に exosome 分画 (黒)に高発現している。B. 心不全発症群 (黒)は、非発症群 (白)と比較し、exosome 分画 (Exo)で miR-192, miR-194, miR-34a の発現が上昇しており、上清では差異は認めなかった。

#### 4. 考察 まとめ

心不全症例の血清中で発現上昇を認めた3つのマイクロRNA (miR-192, miR-194, miR-34a)は、いずれも発ガン抑制因子p53によって制御されていることが知られている (Pichiorri F et al, Cancer Cell, 2010)。したがって、心筋梗塞後心不全発症に至る過程で、何らかの組織でp53の発現が上昇し、これに伴ってこれらのマイクロRNAをexosomeに内包後分泌していると考えられた。このため、現在培養細胞株や胎児心筋細胞を用いて、p53の発現を誘導した場合に、これらのマイクロRNAの発現量が細胞内外で増加するかどうかを検討している。また、血清中で上昇していることが、心不全病態に積極的に関与しているのかどうかを解析するため、心不全モデルマウスを用いて現在in vivo解析も同時並行で進めている。今後、尾静脈からマイクロRNAアンチセンス鎖を連続投与し、心不全発症が有意に減少するかどうかを検討する予定である。

これらの成果を踏まえ、将来的に心不全関連マイクロRNAにより焦点を絞った前向き観察研究を大規模に行い、血清マイクロRNAの心不全予測バイオマーカーとして有用性を検証する。さらには、これらマイクロRNAそのものを治療標的として心不全発症を予防することも目指していきたいと考えている。

最後に、本研究をご支援いただきましたアステラス病態代謝研究会にあらためて深謝いたします。

#### 5. 発表論文、参考文献

Skog J et al, Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers. Nat Cell Biol. 2008 Dec;10(12):1470-1476.

Mitchell PS et al, Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jul 29;105(30):10513-10518.

Pichiorri F et al, Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development. Cancer Cell. 2010 Oct 19;18(4):367-381.