

運動後の拘束ストレスが血清および心臓のmicroRNA 発現量に与える影響

| | |
|--------|---|
| 著者 | 細谷 直 |
| 学位授与機関 | Tohoku University |
| 学位授与番号 | 11301甲第16866号 |
| URL | http://hdl.handle.net/10097/00096867 |

学 位 論 文 要 約

博士論文題目

運動後の拘束ストレスが血清および心臓の microRNA 発現量に与える影響

.....東北大学大学院医学系研究科 医科学専攻

.....社会医学講座 法医学分野

学籍番号 B2MD5113 氏名 細谷 直

【背景】

法医解剖の中には激しい体動後に複数の制圧者から暫く制圧・拘束されている間に心肺停止に陥り、そのまま死に至る例を希ならず存在する。そして解剖によっても致命的な外傷や器質的疾患は確認できず、直接死因として急性循環不全と診断せざるをえない。このような際にストレスによる不整脈の惹起といった説明がなされるが、あくまでも一般論としての推測でしかなく、個々の症例に対して何らかのエビデンスに基づいた診断はできなかった。このストレス負荷後の死亡例に対し、生前のストレス程度を定量化できるバイオマーカーの探索が当分野において行われてきたが、過去に注目した副腎におけるカテコラミン合成酵素の messengerRNA に関しては死後変化の影響を強く受けてしまう。当分野ではその後、死後の microRNA の安定性を調べ、法医実務における microRNA 利用の可能性を報告してきた。microRNA の法医学的に注目すべき要素は、鎖長が短いがために死後の変性に強い、すなわち死後も暫くは安定して存在できるという点である。更に最近、乳児急死例で特定の microRNA の関与の報告もあり、microRNA が死因診断にも利用できる可能性が示されている。microRNA は実験動物とヒトとの間で共有性も認められている。そこで実験動物に特定のストレスを与え比較することで、有意に増減する microRNA を見だしストレスマーカーとして有用となりうるかに着目した。しかし、この成果を得るには 1000 種にも及ぶ microRNA 特定の数種を選び出す必要がある。最近の技術革新により、その解決のための方法としてマイクロアレイに加え、次世代シーケンサーによる解析も用いることが可能となった。このような網羅的検索を利用し、ストレスにより変動する microRNA が同定できれば、これまで法医学の領域では全くの推測にすぎなかった運動後の拘束ストレスと死との関係に、ある程度のエビデンスを与えることが期待される。

【目的】

運動後拘束ストレスのモデルラットを作成し、ストレス負荷による microRNA 発現量の違いを測定する。またストレス負荷時間を変化させることにより、ストレス強度の違いによって microRNA 発現が異なるかを調べる。

【方法】

(書式18) 課程博士

運動状態をトレッドミル負荷で、その後の拘束を水袋による圧迫でモデル化することで症例の再現を試みた。なおわが国では、このような死亡例において酩酊状態のことが少なくないため、ストレス負荷群ラットすべてに最初に 21%エタノールを 3.8g/kg 相当経口投与した。負荷の種類は以下の 4 群にわけ、かつストレス負荷をしないコントロール群(C)を加えて全 5 群とした。

- (1) 20 分間の運動のみの群(R20)
- (2) 90 分間の運動のみの群(R90)
- (3) 20 分の運動ののち 2kg の水袋で 20 分間圧迫群(P20)
- (4) 90 分の運動ののち 2kg の水袋で 90 分間圧迫群(P90)。

microRNA 発現量の測定は血清と心筋で行った。血清ではマイクロアレイ後に、群間で発現量の差が多い microRNA に加え、心臓や筋組織に関連する microRNA を 8 種(miR-1, -24, 133a/b, -199a, -208a, -212, -296-5p)を選び、定量リアルタイムポリメラーゼチェーンリアクション法(quantitative real time polymerase chain reaction; qRT-PCR)を行った。また心筋に関しては C 群・R90 群・P90 群について左室心筋の total RNA を使用し、microRNA 発現について次世代シーケンシングを行った。

【結 果】

マイクロアレイと qRT-PCR により C 群に対し R20 群・P20 群で血清 miR-199a が上昇し、R90 群・P90 群で血清 miR-1, -24, 133a/b がそれぞれ上昇した。一方、血清 microRNA では運動ストレスと拘束ストレス間の違いは明らかにならなかった。

次世代シーケンシングを使用した心筋 microRNA の RNA-seq では、miR-16-5p, -22-3p, -26-5p, -29a-3p, -29b-3p, 126a-3p, -143-3p の 7 種の microRNA についていずれかのストレス処置群(R90 群, P90 群)と C 群との間で有意差を認めた。また miR-126a-3p と miR-29a-3p は C 群・R90 群に対して P90 群でのみ有意差を認めた。

血清と心臓との microRNA 発現量の変化については、血清の qRT-PCR において使用した 8 種の microRNA 中 5 種は有意差があったが、心臓の microRNA では有意な変化を認めなかった。一方で、心臓 microRNA で有意差のあった 7 種(miR-16-5p, -22-3p, -26a-5p, -29a-3p, -29b-3p, -126a-3p, -143-3p)では、マイクロアレイの結果で各群に発現量の差が認められるものもあった。

なお本研究モデルではエタノール経口摂取の影響を調べるために、エタノール経口摂取群と生理食塩水摂取群を別に用意した。前述の microRNA について血清試料から qRT-PCR を行ったところ、いずれの microRNA でも有意な差は認めなかった。

【考 察】

本研究結果から、運動後の拘束ストレスにより発現量に変化する microRNA があることが示された。加えてストレス強度の違いによって発現する microRNA が異なることが示唆された。

血清試料において miR-199a は軽度なストレスをモニターし、一方 miR-1, -24, -133a/b はいずれも強度なス

(書式18) 課程博士

トレスのみをモニターしている可能性がある。ただし、運動のみのストレスと運動後拘束ストレスとに差は出ていない。今回のストレスモデルは条件が複雑であり、拘束ストレスのみを負荷した群を作ることで拘束ストレスが **microRNA** に与える影響を調べる必要があると思われた。

本研究ではエタノール投与と **microRNA** 発現に関連があるとはいえなかった。ただし本研究で使用したエタノール量および投与方法はラットの血中ではそのピークが **1.0mg/ml** 以下であることが示されており、この量はヒトにおいては弱度酩酊相当である。しかし高濃度エタノール投与についてはラットが酩酊状態となり、トレッドミルでの長時間の運動が困難になると予想されることから行わなかった。

本研究では心筋をターゲットとした次世代シーケンシングによって **7** 種類の **microRNA** について有意な変化がみとめられた。このうち **miR-29a-3p** と **miR-29b-3p** は比較的似た構造を持つ **miR-29** ファミリーであり、心臓では再灌流障害や心筋梗塞とのかかわりも指摘されている。更にラットに対する先行研究では、持続的な運動によって心筋内の **miR-29a** と **miR-29c** が上昇することが示されている。この内容は本研究と対照的な結果となっているが、急激な一過性の運動後の拘束ストレスと持続的な運動という点で相違があり、同じ **microRNA** であってもストレス負荷の方法によって異なる挙動をとる可能性もある。**miR-22-3p** と **miR-26a-5p** は **C** 群と比較し **R90** 群、**P90** 群でともに有意な増減をみとめたが、血清で有意な上昇のあった **microRNA** と同様に運動ストレスと運動後の拘束ストレスとを区別することができなかった。一方で、**miR-29a-5p** と **miR-126a-3p** はともに **P90** 群でのみ有意な増減があり、**R90** 群との差が明らかになった。この **2** 種の **microRNA** は運動後の拘束ストレス、またはストレス負荷時間が長くなることによって発現が変化する可能性がある。

ところで血清と心臓との **microRNA** 発現量の変化の相関についてはサンプルサイズが小さく、今後 **PCR** 等によって個別の確認が必要と思われる。そもそも本研究における血清 **microRNA** 発現量の違いについて、その原因となった組織は同定されていない。ただし血清 **microRNA** はいずれも発現量が極めて少ないことから、絶対量としてさほど大きな変化でなかったとしても、発現比率では大きくなることを考慮すると、心筋と血清に発現量変化の相関がなかったことが直ちに血清 **microRNA** 発現量の増加が心筋由来ではないことを示すわけではないと思われる。それに加え血清や血漿中の **microRNA** についてその由来となる組織を確認するための確立された手法は現在のところないこと、かつ多種の組織に同時に発現している **microRNA** もあり、本研究ではこれ以上の考察は困難である。

本研究結果は運動後の拘束ストレスとある種の **microRNA** 発現変動の関連性を示唆するものではあるが、蓋然性を持ってそれが診断マーカーになると判断し、かつ実務応用に利用するには、ストレス負荷時間やストレス自体の負荷強度を細分化し、**microRNA** 発現への影響を更に詳しく検討していきたい。加えて死後も比較的安定と考えられている **microRNA** ではあるが、実務応用には **microRNA** ごとの死後経過に伴う変性耐性について実験モデルを用いて確認する必要があると考えられる。

【結 論】

(書式18) 課程博士

血清・心筋それぞれで、ある種の **microRNA** が運動後の拘束ストレスマーカーになり得る可能性が指摘できた。ただしあくまでも **microRNA** の網羅的解析結果に基づいたものである。それぞれの **microRNA** が身体的ストレスとしての「真の」診断マーカーであると判断するには、各群症例数の増加に加え、ストレス負荷時間やストレス強度を更に細分化した解析とともに、実務応用には **microRNA** ごとの死後経過に伴う変性も確認する必要がある。