



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	血漿中microRNA網羅的発現解析によるもやもや病発病・病態修飾因子の探索的研究 [全文の要約]
Author(s)	内野, 晴登
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2339 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12835号
Issue Date	2017-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67468
Type	doctoral thesis
File Information	Haruto_Uchino_summary.pdf



学位論文（要約）

血漿中 microRNA 網羅的発現解析による
もやもや病発病・病態修飾因子の探索的研究

(Genome-wide microRNA profiling in circulating plasma
-An exploratory research in epigenetic aspects of
moyamoya disease)

2017 年 9 月

北海道大学

内野晴登

学位論文（要約）

血漿中 microRNA 網羅的発現解析による
もやもや病発病・病態修飾因子の探索的研究

(Genome-wide microRNA profiling in circulating plasma
-An exploratory research in epigenetic aspects of
moyamoya disease)

2017 年 9 月

北海道大学

内野晴登

学位論文内容の要約

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 内野 晴登

学 位 論 文 題 名

血漿中 microRNA 網羅的発現解析によるもやもや病発病・病態修飾因子の探索的研究
(Genome-wide microRNA profiling in circulating plasma
-An exploratory research in epigenetic aspects of moyamoya disease)

【背景と目的】 もやもや病は頭蓋内主幹動脈の進行性狭窄もしくは閉塞により脳卒中を引き起こす脳血管疾患である。1969 年、脳血管撮影で見られる微細な異常血管にちなんで、もやもや病と命名され、国際的にも moyamoya disease として疾患概念が確立された。しかし、未だ疾患の本態となる細胞・組織は完全に解明されていない。2011 年、日本を含む東アジア人患者における疾患感受性遺伝子 RNF213 が同定され、その後の研究で、同遺伝子変異により血管内皮細胞の血管新生能が低下することが示された。ただし遺伝子改変動物モデルでは頭蓋内血管の狭窄病変は再現されていない。RNF213 の浸透率が低いこと、Caucasian 患者では RNF213 多型が認められないこと、RNF213 多型だけでは説明できない多彩な臨床型があることなどから、RNF213 以外に疾患発症や病態修飾に関与している因子の存在が想定されている。そこで、エピジェネティクスの観点から本疾患の病態を明らかにするため miRNA に着目した。miRNA は多くの生理的プロセスを制御し、その異常が複数の疾患と関連していることが近年報告されてきている。本疾患でも、miRNA を含めたエピゲノムの関与が想定されるが、関連する研究は限られている。本研究では、血漿 miRNA および iPS 細胞誘導内皮細胞 (iPSECs) における miRNA 発現の解析を行った。

【対象と方法】 表現不一致一卵性双生児 1 組 2 名 (Discovery cohort)、成人もやもや病患者 9 名からなる一般患者群と、特に疾患背景のない 8 名からなる健常対照群 (Validation cohort) の血漿サンプルを用いて、マイクロアレイによる miRNA 網羅的発現解析を行った。患者は、日本人で RNF213 ヘテロ多型、また血行再建術が実施され病態が安定している者の中から選択した。

血漿サンプルは、血液を採取後、すみやかに遠心分離し、上清として回収し、-80°C で超凍結分注保存した。凍結血漿 200 μ l から抽出キットを用いて抽出した RNA サンプルは、脱リン酸化反応、ラベル化反応の後、2588 種の miRNA を検出可能な SurePrint G3 Human miRNA microarray (8 $\times$ 60K Rel. 21.0) (Agilent Technology Inc., Urdorf, Switzerland) を用いてハイブリダイゼーションを行った。シグナルの数値化データを取り込み、全サンプルで signal detect flag の立たなかった miRNA は除外した後、quantile shift ノーマライゼーションを行った。続いて主成分解析を実施し、全対象者の血漿 miRNA 発現のプロファイルを確認した。さらに Discovery cohort 1 では fold change cut off を 1.2、Validation cohort

では Welch 検定による $FDR < 0.3$ かつ fold change cutoff 1.2 を発現変動の基準とした。両 cohort で共通変動する miRNA を抽出し、その中からリアルタイム PCR による定量解析を行うものを選択した。リアルタイム PCR は、Validation cohort の total RNA 溶液の逆転写反応にて得られた cDNA から TaqMan MicroRNA Assay (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)を用いて行った。発現定量は、各プライマーの増幅効率により補正可能な比較定量法 (Pffafli 法) を採用した。2 群間の比較は student-t 検定を行い、 $P < 0.05$ を統計学的有意とした。

さらに別 cohort の患者 3 名と健常者 3 名の単核球から樹立・誘導した iPSECs における miRNA の発現解析も行った。細胞内 total RNA を抽出し、血漿と同様の方法で定量解析を行った。続いて発現変動を認めた miRNA の予測標的遺伝子および iPSECs のトランスクリプトームデータ (既報) から pathway 解析を行い、発現変動した miRNA の機能検証を行った。miRNA の標的遺伝子予測、pathway 解析にはデータ解析ソフト Ingenuity Pathways Analysis (QIAGEN)を用いた。

【結果】全対象者の血漿 miRNA を網羅的にアレイ解析した結果、搭載されている全 probe のうち、21.1% (537/2549) が flag call として検出された。quantile normalization 後の全 537 miRNA のシグナル値を用いた対象者の血漿 miRNA 発現プロファイルを、PCA 3D プロットとして解析した。この閾値を設定しない miRNA 発現プロファイルでは、患者群と健常対照群がそれぞれ別クラスターとして分離できるのが確認できた。ただし、表現不一致一卵性双生児の発現プロファイルは、両者とも患者群のクラスターに属しており、発現閾値の設定なしでは、これらは類似した発現パターンであることが示唆された。

全 537miRNA のうち、Discovery cohort で、発現比の絶対値が 1.2 以上であった miRNA は、計 143 種であった (upregulated in MMD: 76 miRNAs, downregulated in MMD: 47 miRNAs)。続いて Validation Cohort において volcano plot による比較解析 (Fold change cutoff 1.2, $FDR < 0.3$) を行うと、計 98 種の発現変動 miRNA (upregulated in MMD: 45 miRNAs, downregulated in MMD: 33 miRNAs) が検出された。その結果、両 cohort で共通の発現変動をしていた計 23 種の miRNA (upregulated in MMD: 10 miRNAs, downregulated in MMD: 13 miRNAs) が抽出された。

続いて real-time PCR による定量を行う miRNA を以下の基準で選択した。すなわち、Taqman assay が利用できるものの中で、Discovery cohort で発現差の大きいもの、Validation cohort での有意差の大きいもの、マイクロアレイでのシグナル強度が十分であるもの、病態に関連しうる標的遺伝子をもつものを基準とし、5 種 (miR-6722-3p, miR-328, miR-718, miR-6850-5p, miR-150-5p)の miRNA を選択し、Validation cohort の血漿サンプルを用いて、それらの発現定量を行った。miR-6722-3p、miR-328、miR-150-5p の 3 種では、健常対照群に対する一般患者群の相対発現値はそれぞれ、1.35 ($P = 0.049$)、3.98 ($P = 0.011$)、5.01 ($P = 0.043$) と有意差をもって上昇しており、マイクロアレイ解析と矛盾しない結果であった。miR-718、miR-6850-5p の増幅曲線は検出されなかったが、一定のサ

サンプル内に含まれる RNA 量が検出以下であるか、それぞれの Taqman assay がうまく機能しなかったことが考えられた。

血漿で有意な発現変動を認めた miR-6722-3p、miR-328、miR-150-5p については、iPSECs 細胞内 RNA でも同様に定量を行った。各 miRNA の健常群に対するもやもや病群の相対発現値は、それぞれ 3.85 (P = 0.15)、6.46 (P = 0.15)、2.07 (P = 0.40) であった。有意差は認めなかったが、全ての発現変動の方向が血漿と一致しており、特に miR-6722-3p、miR-328 は大きな発現変動を認めた。さらに、これらの miRNA の予測標的遺伝子による制御方向と発現方向が一致した 296 iPSECs 遺伝子の pathway 解析では、PTEN シグナル系を筆頭とし、細胞増殖、細胞生存、細胞接着などにかかわる経路が示された。

【考察】miRNA は同じ疾患でも病勢・病状により発現が変化しうるため、本研究の患者群の選択に関して配慮した。脳虚血の急性期に変動する miRNA を除外するため、患者群は血行再建術後で状態が安定している者とした。また、より均質な群とするため、発症型、RNF213 遺伝子型が一致する者を選択した。もやもや病における既報の circulating miRNA 解析研究は限られている上、このように検体採取時期、患者背景に配慮したものは皆無である。さらに本研究では同じ DNA 配列でも表現型が異なる表現不一致一卵性双生児を対象に含めたことは、エピゲノムの観点から、より疾患の発症・病態に関連するバイオマーカーが抽出できた可能性があり、非常に意義が高いと考えた。

Pathway リストの第 1 位に挙げた PTEN シグナル系は複数の血管新生因子 (VEGF、angiopoietin、b-FGF、PDGFB、TGF- β など) からの刺激などを制御し、血管恒常性において極めて重要な役割を果たしている。さらに PTEN は、PI3K/AKT シグナル系を抑制的に制御しているが、同シグナル系は、血管内皮細胞の様々な機能 (細胞生存、遊走、管腔形成、一酸化窒素産生) の他、endothelial progenitor cell の細胞生存・遊走・分化にも関与する。また血管平滑筋においても、PI3K はその細胞収縮、細胞増殖を制御し、血管リモデリング、新生内膜肥厚に関与している。さらに、これら血管内皮細胞、血管平滑筋の相互作用は血管リモデリング、血管形成において重要である。したがって、今回発現変動している miRNA が血管内皮細胞の遺伝子発現に影響し、血管恒常性・血管形成の過程に異常をきたしている可能性が示唆される。

本研究における課題の第一は、対象数や患者の臨床型が限定されていることが挙げられ、今後、より多数例でも検証していく必要がある。第二は、マイクロアレイで絞られた 23 miRNA のうち、real-time PCR で発現定量できたのは、3 種のみで、その他にも重要な miRNA は含まれていると考えられる。2 つの cohort を用いることで、マイクロアレイ解析でも意義の高いバイオマーカー候補が絞られたと考えられるが、偽陽性が含まれている可能性がある。今後、ハイスループットで定量性の高い測定技術の開発が期待される。

【結論】circulating miRNA はもやもや病における疾患バイオマーカーとなる可能性があり、その中には血管内皮細胞の遺伝子発現に影響し、血管恒常性に異常をきたすことで、もやもや病の発病・病態に関与している miRNA があることが示唆された。