

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	桑 原 康 秀
論文題目	Increased MicroRNA-1 and MicroRNA-133a Levels in Serum of Patients With Cardiovascular Disease Indicate Myocardial Damage (心血管疾患患者血清におけるマイクロRNA－1とマイクロRNA－1 3 3 a レベルの上昇は心筋傷害を示唆する)		
(論文内容の要旨)			
マイクロRNAは22塩基程度の小さなタンパクをコードしないRNAであり、標的メッセンジャーRNAの翻訳に抑制的に作用する。また心血管疾患の発症や進展にも深く関与していることが知られている。最近、筋肉特異的マイクロRNAが急性心筋梗塞患者の血中において上昇する、という報告がなされているが、その上昇の意義や由来については完全には解明されていない。 そこでまず心血管疾患入院患者 71 名の血清中における筋肉特異的マイクロRNA－1と－1 3 3 a レベルを評価した。マイクロRNA－1とマイクロRNA－1 3 3 a はそれぞれ 40.9%、80.0%の患者で測定可能であり、急性冠症候群と非急性冠症候群間で比較すると急性冠症候群で有意な上昇を認めた。またマイクロRNA－1 3 3 a の発現レベルを疾患別に分類すると、急性心筋梗塞患者のみならず、不安定狭心症患者とタコツボ型心筋症患者血清においても、他の疾患患者血清と比較し有意な上昇を認めた。 血清中マイクロRNA－1と－1 3 3 a が、急性冠症候群に対するバイオマーカーとして有用かどうかを Receiver Operating Characteristic 曲線にて評価したところ、マイクロRNA－1 3 3 a の方がより有用であった。また心筋傷害マーカーとして確立している血清心筋トロポニンT値との相関を評価したところ、共に有意な相関を認め、その相関はマイクロRNA－1 3 3 a で特に強かった。 次にマウス心筋梗塞モデルを用いて、梗塞心筋の筋肉特異的マイクロRNAレベルを評価した。非梗塞領域あるいは偽手術心筋と比較し、境界領域で有意な低下を認め、梗塞領域で更なる低下を認めた。マウス心筋梗塞モデルにおけるマイクロRNA－1 3 3 a の In situ hybridization でも同様の結果であった。またラット心筋芽細胞（H9c2）に虚血刺激を行ったところ、細胞死が誘導される濃度で細胞内マイクロRNA－1 3 3 a レベルの有意な低下を認めた。 生存心筋からマイクロRNAが放出される可能性も検討するため、H9c2細胞に対し、細胞質Ca濃度を上昇させるCaイオノフォアによる刺激を行った。体液中マイクロRNAはエクソソームと呼ばれる顆粒中に存在し、エクソソーム放出は細胞内Ca濃度に依存していると報告されており、心筋からのマイクロRNA放出も同機構による可能性がある。刺激後、培養液中のエクソソームを超遠心にて分離し、そこに含まれるマイクロRNA－1 3 3 a の発現量を評価したところ、細胞死が誘導されない低濃度刺激では有意な上昇は認められなかった。これらの結果は放出されたマイクロRNA－1 3 3 a は主に傷害心筋に由来することを示している。 最後に放出されたマイクロRNAが機能性であるかどうかを検討するため、マイクロRNA－1 3 3 a センサーベクターを作製した。Caイオノフォア刺			

激後にH9c2細胞培養液からエクソソームを分離し、センサーベクターを導入した293FT細胞の培養液に添加したところ、ルシフェラーゼ活性の有意な低下を認めた。この結果は、放出されたエクソソーム内マイクロRNA－1 3 3 a が機能性である可能性を示唆している。 以上の結果から、心血管疾患患者血清における筋肉特異的マイクロRNA－1と－1 3 3 a の上昇は心筋傷害の存在を示唆し、特にマイクロRNA－1 3 3 a は傷害心筋から放出されることが示された。また放出されたエクソソーム内マイクロRNA－1 3 3 a は、他細胞に取り込まれ、遺伝子発現に関与する可能性が示唆された。			
(論文審査の結果の要旨) マイクロRNAは、22塩基程度の小さなタンパクをコードしないRNAであり、細胞内で標的メッセンジャーRNAの翻訳に抑制的に作用する。もしマイクロRNAが血中で測定可能であり、臓器特異性が存在すれば、早期診断や治療効果判定等を行うための新たなバイオマーカーとして用いることが可能である。 そこで今回心血管疾患患者血清における筋肉特異的マイクロRNA－1とマイクロRNA－1 3 3 a の発現量を定量したところ、急性冠症候群患者群において2つのマイクロRNAの有意な上昇を認めた。また共に心筋傷害マーカーである血清心筋トロポニンT値と有意に相関していた。 次にマウス心筋梗塞モデルを用いて、冠動脈結紮後1時間後には両マイクロRNAが血清において有意に上昇すること、また梗塞心筋で筋肉特異的マイクロRNAが低下していることを示した。 最後にラット心筋芽細胞を用いて、カルシウムイオノフォア刺激により、細胞傷害が生じる濃度下で、マイクロRNA－1 3 3 a が培養液中のエクソソームという小顆粒分画に増加することを見出し、さらにマイクロRNA－1 3 3 a センサーベクターを作製し、放出されたマイクロRNA－1 3 3 a が他細胞に取り込まれ、遺伝子発現を制御する可能性があることも示した。			
以上の研究は、心筋細胞からの筋肉特異的マイクロRNA放出の解明に貢献し、心血管疾患患者における新たなバイオマーカーの発見に寄与するところが多い。			
したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成24年1月19日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日： 年 月 日以降			