

教育シンポジウム 3 : 次世代を担う若手研究者の活躍—若手の交流を深める—

新規バイオマーカーの探索 ～ microRNA を利用した臨床検査の開発を目指して～

塩 津 弘 倫*

要 旨 深部静脈血栓症 (DVT) は血中 D-ダイマー値や種々の画像検査により診断がなされるが、その精度には改善の余地がある。今回我々は、DVT 患者の血中 Large extracellular vesicles (LEVs) 内の microRNA (miRNA) に着目し解析を行った。新規発症 DVT 患者 28 名と健常者 14 名を対象に LEVs を回収し、miRNA 発現を解析した結果、miR-4485-5p が患者群で有意に高値を示した。ROC 解析では AUC 0.79 と良好な診断能を示した。さらに、DVT 患者由来 LEVs を血管内皮細胞と共培養すると、細胞内 miR-4485-5p が増加し、線溶系因子である tPA mRNA の発現を低下させた。これらの結果より、LEVs 内 miR-4485-5p は DVT の病態形成に関与する可能性があり、補助的なバイオマーカーとして有用な可能性が示唆された。

キーワード バイオマーカー、細胞外小胞、microRNA、深部静脈血栓症

I. 序 論

深部静脈血栓症 (Deep Vein Thrombosis: DVT) は、筋膜より深部の静脈に血栓が形成される病態である¹⁾。血栓が進展すると、肺塞栓をはじめとする血栓塞栓症の原因となり得ることから、臨床的に重要な疾患である。DVT の主要なリスク因子は、血流うっ滞、凝固能亢進、血管内皮障害から成るウィルヒョウの三徴 (Virchow's triad) として広く知られている²⁾。近年では、がん患者の増加に伴い、がん関連血栓症 (Cancer associated thrombosis: CAT) が増加傾向にあり、その診断精度の向上は喫緊の課題である³⁾。

DVT の診断は、血中 D ダイマー値による除外診断の後、下肢静脈超音波や造影 CT 等の画像検査によって確定される。血中 D ダイマー値は

陰性的中率に優れる一方で、血管内凝固以外の様々な病態でも上昇するため、偽陽性を呈する症例も多く認める⁴⁾。画像診断の中でも頻用される下肢静脈超音波は、機器性能や検査者の手技、皮下のガス貯留や肥満等、患者背景の影響を受けやすく、診断能にばらつきが生じる課題がある⁵⁾。こうした背景から、高い特異性を有し、安定した診断能が期待できる新規バイオマーカーの探索は重要である。

我々は、DVT の新規バイオマーカー候補として、血中を循環する細胞外小胞 (Extracellular Vesicles: EVs) 内の microRNA (miRNA) に着目した⁶⁾。生体試料中には多様な大きさの EVs が存在し、直径 200 ~ 1,000 nm の小胞は small EVs、1,000 nm 以上の小胞は Large EVs (LEVs) に分類される⁶⁾。LEVs は、主として血小板、血管内皮細胞、単球から

* 九州大学大学院医学研究院保健学部門検査技術科学分野 shiotsu.hiromichi.566@m.kyushu-u.ac.jp

放出されることが知られており、これらの細胞が深く関与する凝固・線溶系の変化を反映する可能性がある⁶⁾。以上の背景を踏まえ、本研究では血中 LEVs を対象とし、その内部に含まれる miRNA の中から、血栓形成を鋭敏に反映し、かつ病態に関与し得る分子の探索を目的とした。

なお本稿は、Laboratory Medicine International 誌に掲載されたものを一部改変し、再構成したものである⁷⁾。

II. 対象および方法

研究には、DVT 患者 28 名 (男性 10 名、女性 18 名、平均年齢 69.1 ± 2.2 歳) と健常者 14 名 (男性が 4 名、女性が 10 名、年齢 67.8 ± 2.9 歳) が参加した。DVT 症例は新規発症例のみを対象とし、DVT の既往がある症例やすでに治療介入が開始されている症例は除外した。研究の参加者から静脈血を採取し、血漿分離後 -80°C にて保管した。

LEVs の回収には、17,000 g、20 分の遠心と孔径 1,000 nm のメンブレンフィルタを用いたフィルトレーションを併用した。まず各群 6 例ずつを対象とし、FACS Verse フローサイトメトリー (BD Biosciences) を用いて、回収した LEVs の粒子数を解析した。あわせて、抗 CD31 抗体、および抗 CD61 抗体を標識し、LEVs 表面抗原の解析を行った。

回収した LEV からは total RNA を抽出し、マイクロアレイ (3D-Gene, 東レ) を用いた網羅的解析により候補となる miRNA を選定した上で、定量解析を RT-qPCR にて行った。RT-qPCR には、TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit、および TaqMan MicroRNA Assay (Thermo Fisher Scientific) を用いた。解析法には $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法を用い、外部コントロールとして、1f mol の線虫由来 miR-39 をスパイクインした。

なお、本研究は九州大学 (許可番号 2020-50) および熊本大学 (許可番号 2016) の倫理委員会の承認を得て実施された。

III. 結 果

患者群において、DVT 発症の背景となる合併

症について解析した (表 1)。全症例のうち、71% ががんに罹患していた。そのほかの合併症は、膠原病や静脈瘤が認められた。

フローサイトメトリー解析により血中 LEV を計測したところ、LEV 総数に変化はなかったものの、CD31 陽性および CD61 陽性の LEVs の割合は患者群で増加していた。これにより、血小板由来 LEV が増加している可能性が示唆された。

次に、LEV 内 miRNA に対して、マイクロアレイ解析と RT-qPCR 解析を併用し、DVT を特異的に反映する miRNA を探索した。その結果、miR-4485-5p は患者群において健常群の 10.9 倍と有意に高値を示した。ROC 解析による診断能評価では、miR-4485-5p の AUC 値は 0.79 と良好な診断能を示した (図 1)。

さらに、miR-4485-5p がもつ病態生理学的意義を検討した。In silico 解析を用いて、miR-4485-5p と相補的配列を持つ標的を検索したところ、組織プラスミノゲンアクチベータ (tPA) の 3' 側非翻訳領域および翻訳領域の両方に結合し得ることが分かった。そこで血管内皮初代培養細胞を DVT 患者由来 LEV と共培養したところ、細胞内の miR-4485-5p は LEV 未添加の対照群と比べ有意

表 1 DVT 患者群の合併症の内訳

合併症	n (%)
がん	20 (71.4)
頭頸部がん	6 (21.4)
子宮がん	5 (17.8)
造血腫瘍	2 (7.1)
食道がん	2 (7.1)
卵巣がん	2 (7.1)
膵臓がん	1 (3.6)
乳がん	1 (3.6)
膀胱がん	1 (3.6)
膠原病	2 (7.1)
静脈瘤	1 (3.6)
治療のための固定	1 (3.6)
合併症なし	4 (14.3)

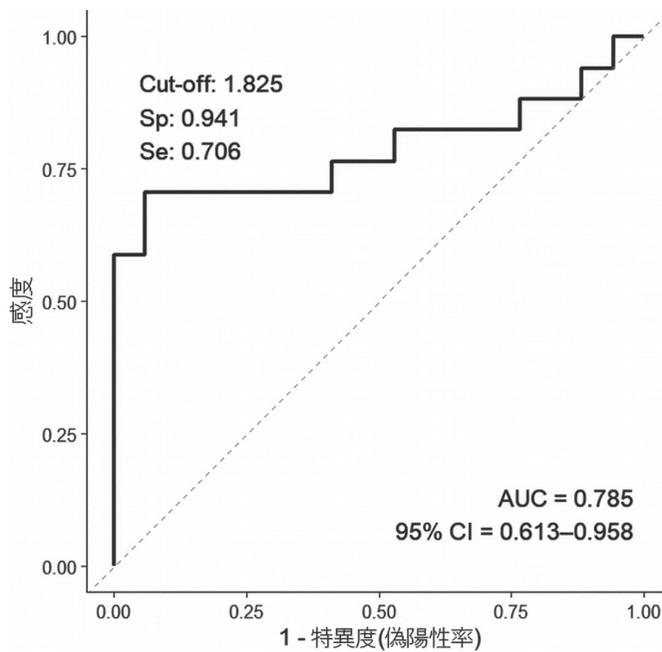


図1 miR-4485-5pを用いた深部静脈血栓症のROC解析

に増加した。一方で、tPAのmRNA発現量は対照群に比べ減少したものの、統計学的有意差は認められなかった。

IV. 考 察

本研究では、DVT患者由来LEVs内miRNAを解析することで、病態形成への関与およびバイオマーカーとしての可能性を検討した。その結果、DVT患者群においてLEVs内miR-4485-5pの発現上昇を認め、同miRNAがtPA発現を抑制する可能性を示した。これらの結果は、LEVs内miR-4485-5pが線溶抑制を介して血栓形成に寄与する可能性を示唆するものであり、DVT診断の補助的バイオマーカーとしての有用性が期待される。

miR-4485-5pの発現上昇は、ミトコンドリアの機能障害との関連が報告されている^{8)~12)}。ミトコンドリア機能障害を有したマウス血管組織ではmiR-4485-5pとその前駆体であるアンチセンス非コードミトコンドリアRNA (ASncmtRNA-2)の両方の増加が認められている^{10)~12)}。さらにBurgerらは、ミトコンドリア機能が低下した細胞におい

てLEV産生が増加することを報告している¹³⁾。これらの知見を踏まえると、がん等の基礎疾患により血小板や血管内皮細胞のミトコンドリア機能障害が生じると、細胞内miR-4485-5pが増加し、それを含むLEVsが血流中に放出される可能性が考えられる^{14)~18)}。一方で、LEVsを介して血管内皮細胞に取り込まれたmiR-4485-5pは、線溶系の主要因子であるtPAを抑制し、DVTの病態形成を促進する仮説が考えられる。

現行のDVT診断は、血中D-ダイマー測定と超音波検査やCTによる画像診断により確立されている。しかし、D-ダイマーの偽高値例や血栓の描出不良症例等では診断に難渋することも多く、高い特異度を有する補助的バイオマーカーの必要性は依然として高い。こうした観点から、miR-4485-5pの臨床的有用性についてさらなる検討が求められる。

本研究にはいくつかの限界がある。症例数が限られている点、患者群の大半ががんを合併しておりLEVsおよびmiR-4485-5pの増加への関与について詳細な解析ができていない点、LEVの起源

となる細胞が同定できていない点等が挙げられる。これらは今後、miRNA バイオマーカーの一般化と臨床応用に向けた重要な課題である。

静脈血栓塞栓症の中でも、誘因のない VTE 症例 (unprovoked VTE : uVTE) では約 10% が 1 年以内がんと診断され、原発不明癌の 60% 以上は uVTE の発症後早期に診断されることが分かっている¹⁹⁾。これらの知見は DVT ががんの早期指標となり得る可能性を示唆している。したがって、DVT の診断性能を向上させるバイオマーカーの確立は重要であり、LEVs 内 miR-4485-5p は、この一端を担う分子として期待される。

謝 辞

本稿で紹介した研究の遂行には、熊本大学病院循環器内科学 末田 大輔先生、国立研究開発法人 国立がん研究センター 中央病院 松井 啓隆先生をはじめ、共同研究者の先生方から多くのご指導と貴重なご助言を賜りました。

ここに深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Cushman M, Barnes GD, Creager MA, Diaz JA, Henke PK, Machlus KR, et al. Venous thromboembolism research priorities: A scientific statement from the American Heart Association and the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Circulation* 2020; 142: e85-94.
- 2) Stone J, Hangge P, Albadawi H, Wallace A, Shamoun F, Knuttien MG, et al. Deep vein thrombosis: Pathogenesis, diagnosis, and medical management. *Cardiovasc Diagn Ther* 2017; 7: S276-84.
- 3) Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer* 2021; 149: 778-89.
- 4) Lim W, Le Gal G, Bates SM, Righini M, Haramati LB, Lang E, Kline JA, et al. American Society of Hematology 2018 guidelines for management of venous thromboembolism: Diagnosis of venous thromboembolism. *Blood Adv* 2018; 2: 3226-56.
- 5) Kelly J, Rudd A, Lewis RR, Hunt BJ. Plasma D-dimers in the diagnosis of venous thromboembolism. *Arch Intern Med* 2002; 162: 747-56.
- 6) O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol* 2018; 9:402.
- 7) Shiotsu H, Sueta D, Shinriki S, Ryu M, Usuku H, Nakata M, et al. miR-4485-5p in large extracellular vesicles as a new potent biomarker for diagnosis of deep vein thrombosis. *Laboratory Medicine International* 2024; 3: 95-107.
- 8) Bianchessi V, Badi I, Bertolotti M, Nigro P, D'Alessandra Y, Capogrossi MC, et al. The mitochondrial lncRNA ASncmtRNA-2 is induced in aging and replicative senescence in Endothelial Cells. *J Mol Cell Cardiol* 2015; 81:62-70.
- 9) Fitzpatrick C, Bendek MF, Briones M, Farfán N, Silva VA, Nardocci G, et al. Mitochondrial ncRNA targeting induces cell cycle arrest and tumor growth inhibition of MDA-MB-231 breast cancer cells through reduction of key cell cycle progression factors. *Cell Death Dis* 2019; 10: 423.
- 10) Burzio VA, Villota C, Villegas J, Landerer E, Boccardo E, Villa LL, et al. Expression of a family of noncoding mitochondrial RNAs distinguishes normal from cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 9430-4.
- 11) Borgna V, Villegas J, Burzio VA, Belmar S, Araya M, Jeldes E, et al. Mitochondrial ASncmtRNA-1 and ASncmtRNA-2 as potent targets to inhibit tumor growth and metastasis in the RenCa murine renal adenocarcinoma model. *Oncotarget* 2017; 8: 43692-708.
- 12) Farfán N, Sanhueza N, Briones M, Burzio LO, Burzio VA. Antisense noncoding mitochondrial RNA-2 gives rise to miR-4485-3p by Dicer processing in vitro. *Biol Res* 2021; 54: 33.
- 13) Burger D, Kwart DG, Montezano AC, Read NC, Kennedy CR, Thompson CS, et al. Microparticles induce cell cycle arrest through redox-sensitive processes in endothelial cells: implications in vascular senescence. *J Am Heart Assoc* 2012; 1: e001842.
- 14) Konkoth A, Saraswat R, Dubrou C, Sabatier F, Leroyer AS, Lacroix R, et al. Multifaceted role of extracellular vesicles in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2021; 319: 121-31.
- 15) Zhou B, Tian R. Mitochondrial dysfunction in patho-

- physiology of heart failure. *J Clin Invest* 2018; 128: 3716-26.
- 16) Thaler J, Koder S, Kornek G, Pabinger I, Ay C. Micro-particle-associated tissue factor activity in patients with metastatic pancreatic cancer and its effect on fibrin clot formation. *Transl Res* 2014; 163: 145-50.
- 17) Branchford BR, Carpenter SL. The Role of inflammation in venous thromboembolism. *Front Pediatr* 2018; 23: 142.
- 18) Signorelli SS, Oliveri Conti G, Fiore M, Cangiano F, Zuccarello P, Gaudio A, et al. Platelet-derived microparticles (MPs) and thrombin generation velocity in deep vein thrombosis (DVT) : Results of a case-control study. *Vasc Health Risk Manag* 2020; 16: 489–95.
- 19) Carrier M, Lazo-Langner A, Shivakumar S, Tagalakis V, Zarychanski R, Solymoss S, et al. Screening for occult cancer in unprovoked venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2015; 373: 697-704.