

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32645

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15100

研究課題名(和文) 分泌性RNAによる認知症の早期診断法の開発

研究課題名(英文) Development of liquid biopsy against dementia

研究代表者

黒田 雅彦 (Kuroda, Masahiko)

東京医科大学・医学部・主任教授

研究者番号：80251304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：認知症の患者は現在国内で約500万人と推計され、深刻な社会問題となっている。認知症の60%を占めるADには、早期であれば分子標的薬も有効と考えられているが、現在のところ有効な早期診断法は存在しない。このような背景の中、本研究においては、miRNAの発現変動を、健常者と比較AD特異的エクソソームのマーカー単離を行い、アミロイドの沈着前の早期診断を目指した。その結果、特に顕著にAD患者血清中に上昇するmiRNAとして、miR-1234,miR-1238,miR-1280、miR-1471またAD患者血清中で減少するmiRNAとしてmiR-22を同定した。

研究成果の概要(英文)：Dementia is of one the intractable disease that is characterize neurodegeneration. And the number of patients of Alzheimer's disease(AD) is rapidly growing in world wide. Problematic point of AD, the etiology of the is still poorly understood. In addition, we do not have early detection marker of AD and effective drug against AD. MicroRNAs are a family of 19- to 25-nucleotides noncoding small RNAs that primarily function as gene regulators. Aberrant microRNA expression has been observed human disease including human malignancies. Despite this knowledge, there is little information regarding microRNAs in plasma AD patient. In this project, we focused circulating miRNA in AD and whether expression levels of specific microRNAs differ between AD and healthy individuals. And we found some miRNA of plasma was highly expressed in AD patient. These miRNAs have strong potential for clinical application as a novel biomarker for detection of AD.

研究分野：分子病理学

キーワード：Dementia Alzheimer's disease microRNA liquid biopsy exosome

1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA) は 19~24 塩基の短い非コード RNA で、標的となる mRNA に結合し、分化・細胞増殖・アポトーシス・発達などに関与する多数の標的遺伝子の発現を制御することが明らかになってきた。特に、種々のがんにおける miRNA の発現異常等の存在が発見され、がん遺伝子あるいはがん抑制遺伝子としての機能と、腫瘍の発生・進展への関与が示唆されている。一方これまでに研究代表者は、miRNA の医薬品開発と臨床応用にむけて(1)RNase 活性のある血清中に安定的に miRNA が存在すること、(2)種々のがん患者血清中に特異的な miRNA の発現低下があること、(3)血清中の miRNA はエクソソームに存在し細胞間での移行があること、を明らかにし、(4)がん特異的に結合し miRNA を送達するエクソソームの開発に成功した。さらに、(5)脂肪細胞由来幹細胞から分泌されるエクソソームが、細胞において β -amyloid peptide (A β)の減少効果が有ることを明らかにした。このような、研究代表者の学術的背景、技術によって、革新的な AD の早期診断法の開発が期待できるものと考えた。

2. 研究の目的

認知症の患者は現在国内で約 500 万人と推計され、深刻な社会問題となっている。認知症はその原因から、(1)血管性、(2)アルツハイマー型:AD、(3)レビー小体型:DLB、(4)前頭側頭型:FTLD、に分類され、病型ごとに神経に沈着する物質も違い、治療戦略も異なることから、正確な分類が必須である。また、60%を占める AD には、早期であれば分子標的薬も有効と考えられているが、有効な早期診断法は現在のところ存在しない。このような背景の中、我々は血清中に存在する数種の miRNA によって、AD の血清診断の可能性を見出した。本研究においては、miRNA の発現変動を、大規模な範囲で健常者と比較、AD 特異的エクソソームのマーカー単離を行い、アミロイドの沈着前の早期診断、またこれらのプロファイルによって、認知症の正確な病型判断も目指した。これらは経済的にも大きな社会問題である認知症の治療に大きなインパクトとなると考えた。

3. 研究の方法

(1) AD 患者血液中に存在する分泌型 miRNA の同定:

血液中に存在する分泌型 miRNA にはエクソソームに内包されて存在するものと、Ago2 complex に結合して存在するものがある。miRNA は、いずれの状態でも血液中において RNase 抵抗性である。本研究項目では、超遠心法にて miRNA を単離し、マイクロアレイ法によって解析を行った。

(2) AD 患者血液中におけるエクソソーム蛋白解析:

エクソソームは、その分泌様式から細胞膜と同様の成分を持った小胞と考えられており、これまでに、エクソソームに特徴的なタンパク質が同定されている。また、CD63 や CD81 といった 4 回膜貫通型の G 蛋白質(テトラスパニン)は、AD 患者由来エクソソームに共通して発現している事も確認している。本研究においては、AD 患者の検体中から、超遠心法でエクソソームを分離して、LC-MS/MS によるタンパク質の同定を行った。

(3)血清 miRNA 検査のための標準化の検討:

本研究実施中に、検体の採血・保存方法によって、血清 miRNA 検査の結果が異なる可能性が認められた。本研究の最終的な目標は、臨床応用可能な検査手法を開発する事でもあるため、血漿・血清検体の採取方法や保存方法の違いが与える影響について検討した。検体の分離方法や保存条件により生じる結果のばらつきや個人差によるばらつきを補正するために、一般的に外来性因子として *C.elegans* 由来の miRNA(CEL-miR-39)を混入した後に RNA を抽出し、qPCR の結果を cel-miR-39 の検出量によって補正する方法が用いられている。しかし、補正因子も保存中に分解する可能性がある。そこで、検体の血漿と血清に cel-miR-39 を加えて、検体の個体差や保存条件、分離方法による cel-miR-39 の安定性に及ぼす影響について検討を行った。

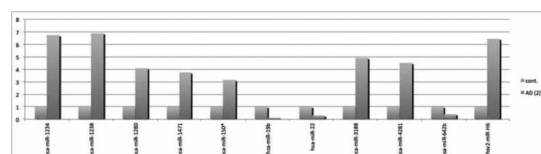
(4) miRNA の抽出法の検討:

血中の miRNA にはエクソソームのみに含まれる miRNA とそれ以外の miRNA が共存するため、どちらを解析対象とするかによって結果に差が生じる可能性があるため miRNA の抽出方法による影響を明確にする必要がある。そこで、同一個体より血漿および血清を分離し保存した後、エクソソームを抽出(exoEasy, QIAGEN)し、RNA 抽出とマイクロアレイ解析を行った。

4. 研究成果

(1) AD 患者血液中に存在する分泌型 miRNA の同定:

本研究においては、AD と診断された患者と、正常者の血漿をアレイ解析し、miRNA の発現パターンを比較検討した。アレイ解析は 3 回に分けて行った。補正因子の候補である miR-6131 で補正し、AD となり得る miRNA を探索した。その結果、下図に示すような、候補 miRNA の同定に成功した。特に、顕著に AD 患者血清中に上昇する miRNA として、miR-1234, miR-1238, miR-1280, miR-1471 また



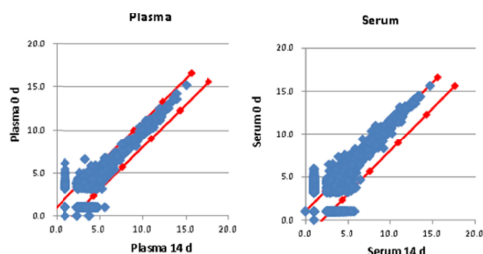
AD 患者血清中で減少する miRNA として miR-22 を同定した。

(2) AD 患者血液中におけるエクソソーム蛋白解析：

今回の研究においては、(1)の項目で検討した超遠心法にて単離された検体(エクソソーム miRNA 複合体)に関して、LC-MS/MS 解析を行った。その結果、幾つかの候補タンパク質を単離したが、明らかな有意差を得ることは出来なかった。

(3)血清 miRNA 検査のための標準化の検討：

血漿・血清検体の採取方法や保存方法の違いが与える影響について検討した。具体的には正常人検体を血漿と血清に分離した後、cel-miR-39 を加えて、直ちに-80 保存する群 14 日間 4 保存した後-80 保存する群の二つに分けた。その後 RNA 抽出し cel-miR-39 を qPCR 法にて検出した。その結果、同一個体由来であっても血漿と血清では cel-miR-39 の検出値に差が認められた。さらに、14 日間 4 で保存することにより、全ての検体で cel-miR-39 の減少が認められた。さらに同一検体を用いて miRNA アレイ解析を行った。下図に示すように 14 日間 4 で保存することにより、アレイ全体の検出感度が低下した。



これは検討した全ての検体において同様の結果が得られた。以上より 14 日間の 4 保存で miRNA は分解されていることが明らかとなった。

(4) miRNA の抽出法の検討：

本研究項目では、同一個体より血漿および血清を分離し、エクソソームを抽出(exoEasy, QIAGEN)し、RNA 抽出とマイクロアレイ解析を行った。その結果、エクソソーム由来の RNA においても、14 日間 4 で保存した後では検出感度の低下を示した。エクソソーム由来の miRNA はエクソソーム中に存在するため、分解しにくいと考えられているが、本実験結果より、血漿または血清を 14 日間 4 保存した場合、エクソソーム由来の miRNA も分解を生じることが示唆された。従ってこの場合も補正因子が必要となる。血漿 miRNA アレイの結果から、エクソソームについても幾つかの miRNA で補正して 0 d と 14 d の発現量を比較検討した。その結果、2 種類の内部標準 miRNA では、14 日間の 4 保存による miRNA の分解を補正することはできなかった。

今後の検討においては、検体を採取された状態は、完全には統一が難しいため、検査における内部標準マーカーの同定は最重要課題になると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 31 件) 全件 査読有

1. Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M. (7 名 6 番目) PRG4 expression in myxoid liposarcoma maintains tumor cell growth through suppression of an antitumor cytokine IL-24. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;485(1):209-14. doi:10.1016/j.bbrc.2017.02.055.
2. Yamada Y, Takanashi M, Sudo K, Kuroda M. (6 名 6 番目) Novel form of miR-29b suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *PLoS One.* 2017;12(2):e0171957. doi: 10.1371/journal.pone.0171957. 査読有
3. Nakaya M, Watari K, Nakaya T, Kuroda M. (21 名 19 番目) Cardiac myofibroblast engulfment of dead cells facilitates recovery after myocardial infarction. *J Clin Invest.* 2017. Jan;127(1):383-401. doi: 10.1172/JCI83822.
4. Matsumoto Y, Itami S, Kuroda M, Murakami Y. (6 名 3 番目) MiR-29a Assists in Preventing the Activation of Human Stellate Cells and Promotes Recovery From Liver Fibrosis in Mice. *Mol Ther.* 2016; 24(10):1848-59. doi: 10.1038/mt.2016.127.
5. Ohno S, Sudo K, Kuroda M. (12 名 12 番目) Development of Novel Small Hairpin RNAs That do not Require Processing by Dicer or AGO2. *Mol Ther.* 2016; 24(7):1278-89. doi: 10.1038/mt.2016.81.
6. Fujinaga H, Watanabe N, Kuroda M. (10 名 10 番目) Cord blood-derived endothelial colony-forming cell function is disrupted in congenital diaphragmatic hernia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2016; 310(11):L1143-54. doi:10.1152/ajplung.00357.2015.
7. Taketani Y, Usui T, Ohno S, Kuroda M. (12 名 12 番目) Topical Use of Angiopoietin-like Protein 2 RNAi-loaded Lipid Nanoparticles Suppresses Corneal Neovascularization. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2016; 5:e292. doi: 10.1038/mtna.2016.1.
8. Kanekura K, Cammack AJ, Mahadevan J, Kuroda M, Urano F. (8 名 5 番目) Poly-dipeptides encoded by the C9ORF72 repeats block global protein translation. *Hum Mol Genet.* 2016; 25(9):1803-13. doi: 10.1093/hmg/ddw052.
9. Ohno S, Drummen GP and Kuroda M. (3 名 3 番目) Focus on Extracellular Vesicles:

- Development of Extracellular Vesicle-Based Therapeutic Systems. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17(2). doi: 10.3390/ijms17020172.
10. Takanashi M, Sudo K, Ohno S, Kuroda M. (11 名 11 番目) Novel Types of Small RNA Exhibit Sequence- and Target-dependent Angiogenesis Suppression Without Activation of Toll-like Receptor 3 in an Age-related Macular Degeneration (AMD) Mouse Model. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2015;4:e258. doi: 10.1038/mtna.2015.34
 11. Yoon JH, Sudo K, Kuroda M, Taniguchi T, Weinstein M, Mamura M. (18 名 3 番目) Phosphorylation status determines the opposing functions of Smad2 and Smad3 as STAT3 cofactors in TH17 differentiation. *Nature communications.* 2015 ;6:7600. doi: 10.1038/ncomms8600.
 12. Nakama T, Kuroda M and Ishibashi T. (20 名 19 番目) Inhibition of choroidal fibrovascular membrane formation by new class of RNA interference therapeutic agent targeting periostin. *Gene Ther.* 2015; 22(2):127-37. doi: 10.1038/gt.2014.112.
 13. Toyono T, Usui T, Kuroda M, Amano S. (8 名 6 番目) Angiopoietin-like 7 is an anti-angiogenic protein required to prevent vascularization of the cornea. *PLoS One.* 2015; 10(1):e0116838. doi: 10.1371/journal.pone.0116838.

〔学会発表〕(計 54 件)

1. 黒田雅彦、核酸医薬の臨床応用 (招待講演)、第 384 回 CBI 学会講演会、東京、2017 年 5 月 25 日
2. 黒田雅彦 他、RNA 干渉核酸に働く短鎖ヘアピン RNA の探索と機能解析、第 106 回日本病理学会総会、東京、2017 年 4 月 28 日
3. 黒田雅彦 他、miRNA 生成経路を欠損する肺がん細胞株の解析、第 106 回日本病理学会総会、東京、2017 年 4 月 28 日
4. 黒田雅彦 他、浸潤性乳管癌に出現する let-7 発現細胞の検討、第 106 回日本病理学会総会、東京、2017 年 4 月 29 日
5. 黒田雅彦 他、Mir-34a によるがん抑制遺伝子 BLU の発現制御機構、第 106 回日本病理学会総会、東京、2017 年 4 月 29 日
6. 黒田雅彦、RNA ワールドと肺がん発がん機構、(教育講演) 第 108 回 ACCP 日本部会定期教育講演会、東京、2016 年 10 月 29 日
7. 黒田雅彦、エクソソームの臨床応用、(招待講演) エクソソーム 2016、東京、2016 年 10 月 26 日
8. 黒田雅彦 他、新規ヘアピン型 RNA 干渉核酸の探索と機能解析、第 8 回日本 RNAi 研究会、第 3 回日本細胞外小胞体学会、広島、2016 年 8 月 31 日
9. 黒田雅彦 他、肺線維症に対する miR-29b 補充療法、(医学会奨励賞受賞講演) 第 177 回東京医科大学医学会総会、東京、2016 年 6 月 4 日
10. 黒田雅彦、miRNA 補充療法の開発、第 12 回日本臨床プロテオーム研究会、東京、2016 年 5 月 21 日
11. Kuroda M et.al, Development of novel Dicer- and Ago2-independent small hairpin RNAs, American Society of Gene & Cell Therapy(ASGCT) 19th Annual Meeting, Washington,DC, USA, May 4, 2016.
12. 黒田雅彦 他、miRNA 生成経路を欠損する肺がん細胞株の解析、第 105 回日本病理学会総会、仙台、2016 年 5 月 12 日
13. 黒田雅彦 他、肺がんにおける Argonaute ファミリーの機能解析、第 105 回日本病理学会総会、仙台、2016 年 5 月 12 日
14. 黒田雅彦 他、乳がん幹細胞の酸化ストレス抵抗性における miR-27a の作用、第 105 回日本病理学会総会、仙台、2016 年 5 月 12 日
15. 黒田雅彦、エクソソームが開く新しい医療 (特別講演)、第 19 回日本統合医療学会、山口、2015 年 12 月 12 日
16. 黒田雅彦、エクソソームの臨床応用 (招待講演)、近未来医療フォーラム、東京、2015 年 9 月 1 日
17. 黒田雅彦 他、肺線維症に対する miR-29b 補充療法、第 12 回日本病理学会カンファレンス、神戸、2015 年 7 月 25 日
18. 黒田雅彦 他、副作用を軽減した短鎖型核酸医薬の開発、第 12 回日本病理学会カンファレンス、神戸、2015 年 7 月 25 日
19. 黒田雅彦 他、microRNA の生成経路を欠損する肺がん細胞株の解析、第 12 回日本病理学会カンファレンス、神戸、2015 年 7 月 24 日
20. 黒田雅彦 他、肺線維症に対する miR-29b 補充療法、第 104 回日本病理学会総会、名古屋、2015 年 5 月 2 日
21. 黒田雅彦 他、肺がんにおける Argonaute ファミリーの発現・機能解析、第 104 回日本病理学会総会、名古屋、2015 年 5 月 2 日
22. 黒田雅彦 他、肺がん治療を想定した副作用の少ない短鎖型新規核酸医薬の開発、第 104 回日本病理学会総会、名古屋、2015

年 5 月 1 日

23. Kuroda M et al, Development of novel form of mimic microRNA for lung cancer Therapy, AACR Annual Meeting 2015, Philadelphia, Pennsylvania, USA, April 18, 2015
24. Kuroda M, The development of short form of mimic microRNA for lung cancer therapy, 26th EORTC-NCI-ACR Symposium.21th Nov 2014, Barcelona, SPAIN.
25. 黒田雅彦 他、肺がんを効果的に抑制する Mimic microRNA の新規形状の探索、第 55 回日本肺がん学会学術集会、京都、2014 年 11 月 14 日
26. 黒田雅彦、核酸医薬品の新展開 (招待講演)、第 32 回日本ヒト細胞学会学術集会、東京、2014 年 8 月 31 日
27. 黒田雅彦 他、エクソソームによるドラッグデリバリーシステムの応用、第 6 回日本 RNAi 研究会(JARI)、第 1 回日本細胞外小胞学会(JSEV)、広島、2014 年 8 月 28 日
28. 黒田雅彦 他、がんを効果的に抑制する短縮型 Mimic microRNA の開発、第 33 回分子病理学研究会、宮城、2014 年 7 月 26 日
29. 黒田雅彦 (オーガナイザー)、核酸医薬品開発に向けて、次世代医薬“核酸医薬”創出に向けた Strategy2014、東京、2014 年 7 月 15 日

〔図書〕(計 2 件)

1. 黒田雅彦 他、医薬ジャーナル社、miRNA の最新知識-基礎領域から診断・治療応用まで-、2017、195 (145-152)
2. 黒田雅彦 他、文光堂、グリオーマ治療の Decesion Marking 脳神経外科診療プラクティス、2016、304 (260-261)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tokyo-med.ac.jp/molpathol/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 雅彦 (Masahiko Kuroda)
東京医科大学・医学部・主任教授
研究者番号：80251304