

**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



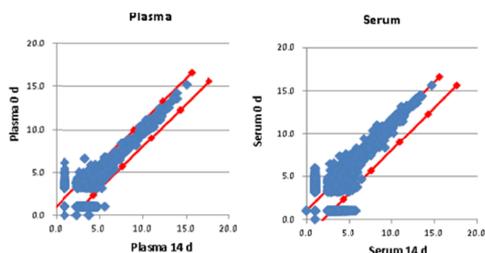
AD 患者血清中で減少する miRNA として miR-22 を同定した。

(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