

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19302

研究課題名(和文)唾液特異的miRNAマーカーの探索

研究課題名(英文)Exploring of saliva specific miRNA markers.

研究代表者

多木 崇 (Taki, Takashi)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：70408475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：唾液はしばしば犯罪現場等に残される体液であるが、これまで有効なmiRNAマーカーがなかった。本研究では唾液の中で特にエクソソームに含まれるmiRNAの唾液マーカーへの可能性を明らかにするために、唾液と唾液エクソソームの1088種類のmiRNAの量を比較し、大きく量が異なるものがないか調べた。その結果、唾液エクソソームと唾液で存在量が10倍以上異なっていたmiRNAが85種類見つかったが、発現量差には大きな個人間のばらつきが観察された。

研究成果の概要(英文)：Although saliva is often left at crime scenes, no saliva-specific miRNAs have been reported so far. We hypothesized that salivary exosomes contain miRNAs that can be used as saliva-specific markers. In this study, we first prepared the pooled miRNAs derived from either saliva or salivary exosomes of eight donors. We then investigated the expression levels of 1088 miRNAs. We found that 85 miRNAs exhibited more than ten-fold differences in expression levels between saliva and salivary exosomes. We selected the miRNAs that exhibited the greatest differences in expression levels between saliva and salivary exosomes and examined their expression levels in the 8 individual sample. We found these miRNAs showed great variation in expression levels among the donors.

研究分野：分子生物学

キーワード：体液識別 唾液 miRNA エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

法医学では DNA サンプルからの個人識別が、犯罪捜査や血縁関係の証明に利用されている。近年、未知の体液の判別に核酸が利用できる可能性が示唆され、有効な体液特異的マーカーの確立へ向けて、国際的に精力的な研究がなされている。

体液特異的なマーカーの中で、RNA 分子を利用した手法は、特異性の高さなどから有力と期待され、各体液に特異的な発現を示す mRNA や miRNA を探索する研究が現在盛んに行われている。一般に RNA 分子は DNA と比較して水溶液中での安定性が低く、実験室において常に分解に留意しながら実験を行う必要があるが、生体内での RNA はタンパク質と複合体を形成して、RNA 分子単独より分解耐性が高いことが知られている。さらに miRNA は血清中などではエクソソームに内包され、より安定性が高くなっていることが明らかにされてきた。また、ヒトでは 2000 種程存在すると考えられている miRNA は、発生段階から多数の遺伝子の発現制御を通して分化を制御し、miRNA 自体の発現パターンも組織により大きく異なることが分かってきた。miRNA の利点、特徴を活かし、犯罪現場等に残された体液に対して、体液特異的な発現パターンを示す miRNA を探索した研究の成果が 2010 年頃より報告されている。現在までのところ、血液、精液に関してはそれぞれに特異的に発現する複数の miRNA が見出されている()。

2. 研究の目的

本研究ではこのような背景を踏まえ、未だ高い特異性を有する miRNA マーカーが見つからない唾液において、新たにマーカーを見出すことを目指した。これまで被験者の唾液全体から miRNA を抽出・解析した研究より、唾液で発現量が多い miR205 をはじめとした数種類の miRNA が報告されているが、特異性が低く有効なマーカーとはなっていない()。唾液では唾液腺から分泌されるエクソソーム中に miRNA が存在することが最近の研究により明らかにされている()。私は、2014 年から唾液を細胞画分と細胞外画分に分け、細胞内と細胞外に含まれる DNA に違いがあるか STR パターン、メチル化パターンに関して調べ、細胞外にも STR パターン解析やメチル化解析に十分な量の DNA があり、個人識別等に利用できることを見出した。また、分画後の細胞画分に食物残渣の混入が見られる場合や、粘性が高い場合があり、細胞画分の分析では非自己 DNA の量が多くなる、実験操作が難しくなるといった問題につながるケースがあることが分かった。

そこで、唾液中の miRNA の発現解析に関しても、細胞成分とエクソソームを分画し、エクソソームから miRNA 発現パターン解析をすることができれば、食物残渣や粘性の問

題を排除した、安定した実験操作、実験結果が得られると考えられる。

また、唾液の主な細胞画分構成細胞であると考えられる口腔上皮細胞の miRNA 発現パターンと唾液腺由来のエクソソーム中の miRNA 発現パターンとは異なる可能性がある。口腔上皮内細胞を含む細胞画分由来の miRNA 発現パターン、エクソソームの miRNA 発現パターン、唾液全体由来の miRNA 発現パターンを比較することで、miR205 等の唾液で高発現な miRNA に関して、分画解析することで特異性の向上が見られるか評価できると考えられる。さらに単画分の解析により、高い特異性を有する新たな唾液 miRNA マーカーが見出される可能性もある。

3. 研究の方法

8 名の健常人から得た数 ml の唾液の一部から遠心分離によって細胞成分等を除去した後、超遠心分離によって唾液エクソソームを得た。唾液、唾液エクソソームから市販の RNA 抽出キットを用いて total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を得た。8 名分の cDNA を唾液量等量となるように混合し、PCR で miRNA を増幅した後、1008 種類の miRNA の発現量をリアルタイム PCR により測定した。唾液と唾液エクソソームで発現量の大きく異なっていた miRNA に関しては、8 名の個別サンプルから得た miRNA を逆転写し、PCR で miRNA を増幅したのち、リアルタイム PCR で発現量を測定し、個人間のばらつきを調べた。

4. 研究成果

(1) 8 名のサンプルを混合して得た混合サンプルに関して、リアルタイム PCR での定量を行ったところ、調べた 1008 種類の miRNA のうち、唾液エクソソームでは 748 種類、唾液では 955 種類の miRNA が定量できた。これは、1088 種類の miRNA のうちそれぞれ 74%、95% に相当する。また、唾液でエクソソームと唾液両方で定量できた miRNA は 734 種類に登った。今回定量に用いた唾液サンプルは数 ml と比較的少量であったが、8 名分のサンプルを混合し、またリアルタイム PCR で定量を行う前に PCR で miRNA を増幅する方法を用いたことで、多くの miRNA を定量できることが示された。

(2) 混合サンプルでの miRNA 発現量定量において、唾液エクソソームと唾液で発現量が大きく異なっていた miRNA に関しては、唾液エクソソーム中の方が唾液中に比べ 10 倍以上存在していた miRNA が 36 種類、唾液の方が唾液エクソソームに比べて 10 倍以上存在していた miRNA が 49 種類見つかった。両者合わせると、唾液エクソソームと唾液で発現量が 10 倍以上異なっていた miRNA が 85 種類見つかった。

(3)混合サンプルを用いたスクリーニングで得られた、唾液と唾液エクソソームで発現量に大きな差があった miRNA のうち 10 種類の miRNA を 8 名の個別サンプルを用いて定量したところ、スクリーニングの結果と 8 名の個別サンプルの定量結果は一致しない場合もあった。これはスクリーニングの際、等量の RNA を混合するのではなく、等量の唾液を混合したためと考えられる。また、唾液と唾液エクソソーム間の存在量の差に関しては、10 種類の miRNA いずれも、個人によるばらつきが非常に大きいことが分かった。個人間のばらつきが非常に大きくなった原因としては、微量の miRNA を定量するために、miRNA をリアルタイム PCR で測定する前に、PCR で増幅を行なったため、計 2 回 PCR を行なったことが原因の 1 つとして考えられる。

(4)今回の研究により、唾液エクソソームと唾液で発現量の異なる miRNA の存在が示唆された。これらの miRNA に関しては、唾液腺においてエクソソームを多量に分泌している細胞と、その他の上皮細胞等、唾液サンプルに含まれる細胞とで miRNA 発現プロファイルが異なっている可能性がある。或いは特定の miRNA 種がエクソソームに特異的に内包され分泌されるために、細胞成分を多く含む唾液サンプルと、唾液エクソソームサンプルで miRNA の存在量プロファイルが異なっていることも考えられる。

(5)個別サンプルを用いて定量した miRNA に関しては、唾液と唾液エクソソーム間の存在量の差に関して、個人間のばらつきが大きく、唾液識別のマーカーへの応用は難しいと考えられる。本研究では、スクリーニング実験の結果で唾液と唾液エクソソームで存在量に大きな差があった 10 種類の miRNA に関して個別サンプルで調べたが、今回個別サンプルで調べなかった miRNA の中に、個人間の存在量のばらつきが小さな miRNA が含まれる可能性はある。そのような miRNA の中に単独で、あるいは複数の存在量を調べることで唾液の存在を示唆するマーカーとなる miRNA がないかは今後明らかにする必要がある。また、微量の miRNA を、PCR による増幅を抑えて存在量測定する技術の開発も待たれる。

<引用文献>

Zubakov, D., Boersma, A. W. M., Choi, Y., van Kuijk, P. F., Wiemer, E. A. C., & Kayser, M. (2010). MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *International Journal of Legal Medicine*, 124(3), 217-226.

Hanson, E. K., Lubenow, H., & Ballantyne, J. (2009). Identification of forensically relevant body fluids using a panel of

differentially expressed microRNAs. *Analytical Biochemistry*, 387(2), 303-314.

Michael, A., Bajracharya, S. D., Yuen, P., Zhou, H., Star, R. A., Illei, G. G., & Alevizos, I. (2011). Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Diseases*, 16(1), 34-38.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

多木 崇、木林和彦 唾液 miRNA と唾液エクソソーム miRNA の発現比較解析 第 101 次日本法医学会学術全国集会 2017 年

Takashi Taki, Kazuhiko Kibayashi A comparative analysis of miRNA expression in human whole saliva and human saliva-derived exosomes. 21st Triennial Meeting of the International Association of Forensic Sciences 2017 年

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

多木 崇 (TAKI, Takashi)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号: 70408475

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

木林 和彦 (KIBAYASHI, Kazuhiko)

町田 光世 (MACHIDA, Mitsuyo)