

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：32206

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16988

研究課題名（和文）RNA修飾解析による骨髄異形成症候群の病態進展メカニズムの解明

研究課題名（英文）Analysis between RNA modification and pathogenesis in myelodysplastic syndromes

研究代表者

澁田 樹（Shibuta, Tatsuki）

国際医療福祉大学・福岡保健医療学部・講師

研究者番号：20799192

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：骨髄異形成症候群（Myeloid Dysplastic Syndrome、以下MDS）におけるmRNA中のシトシンメチル化とメチル化酵素に着目し解析を行った。MDSではCD34陽性細胞に比べて転写因子や顆粒球系特異的遺伝子の発現が亢進し、非翻訳領域においてmRNA中のメチル化シトシンが増加していた。またメチル化酵素であるNSUN2が高発現を示しており細胞増殖能に關与することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MDSには芽球比率による病期が存在するが、NSUN2 mRNAがMDSでの病期を推測するための病態進展マーカーとして有用となり、侵襲性の高い検査の回避や検査者の習熟が必要な形態診断を補助できる可能性が高い。またNSUN2阻害剤によりMDSの進展を抑制できる可能性があり、今後さらに検討する必要がある。

研究成果の概要（英文）：Cytosine methylation in mRNA and RNA methyltransferases in myelodysplastic syndrome (MDS) were analyzed. Compared to CD34-positive cells, MDS cells showed increased expression of transcription factors and granulocyte lineage-specific genes, and increased methylated cytosine in the untranslated region. In addition, NSUN2, which is a RNA methyltransferase, was highly expressed in MDS cells, and its expression level was involved in cell proliferation.

研究分野：病態検査学

キーワード：骨髄異形成症候群 RNA修飾

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群(Myeloid Dysplastic Syndrome、以下 MDS)は様々な染色体異常、遺伝子発現異常を含む難治性造血器疾患である。我が国では年間 5000 例以上が発症し、その多くは 60 歳以上の高齢者で増加傾向にある。完治を目指すには造血幹細胞移植が必要となるが、このような高齢者への移植は困難であり、化学療法および支持療法が中心となる。加えて「骨髄異形成関連変化を伴う急性骨髄性白血病」や「MDS から移行した急性骨髄性白血病」は特に予後不良であり治療は困難を極める。「MDS を始めとする造血器腫瘍の治療」と「超高齢化社会」は今後の日本の医療において切り離すことのできないキーワードであると考えられる。

近年、DNA 脱メチル化剤である Vidaza(Azacitidine)が MDS の治療に用いられ良好な成績を上げているが根治的な治療手段ではなく、MDS のより詳細な病態メカニズムの解明と身体的負担の少ない治療薬の開発が求められている。

### 2. 研究の目的

高齢者における造血器腫瘍は完治が困難であり、化学療法に加え支持療法や緩和ケアなど精神的・肉体的・社会的負担は大きく、高齢化の進む日本において抱える課題は多い。骨髄異形成症候群における microRNA 発現異常や周辺組織との相互作用を中心に病態の解析を行ってきたが、疾患の総合的な理解には RNA の発現のみならず転写後の修飾も重要であると考えられた。本研究においては、1)疾患モデル細胞株および次世代シーケンサーを使用した RNA 修飾解析、2)RNA 修飾に関わるタンパクおよび遺伝子の解析、を実施し、骨髄異形成症候群における RNA 修飾を標的とした新規臨床検査および治療薬の開発を目指した検討を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)解析対象

全ての細胞株(MDS-L、K562、HL60、Jurkat)は RPMI1640 培地に 10%の Fetal Bovine Serum(いずれも Gibco)を添加し 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 環境下で培養された。MDS-L はさらに IL-3(Peprotech)を 100ng/mL になるよう添加した。

健康人ヒト末梢血に塩化アンモニウム溶血剤を添加し得られた全白血球に標識抗体を反応させセルソーター(BD FACSAriaII)により、顆粒球(CD33<sup>+</sup>/SSC<sup>high</sup>)、単球(CD14<sup>+</sup>)、T 細胞(CD3<sup>+</sup>)、B 細胞(CD19<sup>+</sup>)、NK 細胞(CD56<sup>+</sup>)を分取した。(n=3)

理化学研究所細胞バンクから研究用ヒト臍帯血材料を購入し、CD34 細胞を同様に分取した。

細胞数はトリパンブルー染色液とビュルケルチュルク計算盤を用いて生細胞数および生細胞率を算出した。

#### (2)RNA 抽出

5x10<sup>5</sup>の各細胞から NucleoSpin RNA(Takara Bio)を用いて total RNA を抽出した。さらに RNA-seq 解析のために MDS-L と CD34 細胞からは別途 50μg 以上の total RNA を抽出した。

#### (3)逆転写反応、定量的 PCR

抽出された 1ng の total RNA を PrimeScript RT reagent Kit(Takara Bio)を用いて cDNA を作製した。この cDNA および TB Green Premix Ex Taq II(Takara Bio)、標的遺伝子特異的なプライマーセットを用いて定量的 PCR を実施した。定量的 PCR の解析は GAPDH を内在性コントロール遺伝子として Ct 値を算出して行った。

#### (4)ウエスタンブロッティング

20μg のタンパクを SDS-10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、PVDF メンブレン(ATTO)に転写した。このメンブレンに対し 1000 倍希釈した一次抗体(anti-NSUN2、TRDMT1:いずれも R&D systems)を 4 °Cで一晩反応させた。メンブレンは洗浄後、1000 倍した抗ウサギ IgG 二次抗体(Abcam)を室温で 2 時間反応させた。メンブレン洗浄後、Western Lightning ECL Pro(Perkin Elmer)およびケミルミ撮影装置(Biotools)で検出し、画像を ImageJ で処理し各バンドの輝度を数値化した。

#### (5)RNA-Seq

抽出された total RNA 50μg と Direct RNA Sequencing Kit(Oxford Nanopore Technology: ONT)を用いて poly-A(+) RNA ライブラリを作製した。このライブラリを MinION Mk1C およびフローセル(R9.4.1)(いずれも ONT)で読み込んだ。得られたデータからリード数の解析およびメチル化シトシンの解析を行った。

#### (6)標的遺伝子のノックダウン

NSUN2 および TRDMT1 を標的とする shRNA と puromycin 耐性遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクターを作製し、MOI = 1 で MDS-L 細胞にトランスダクションした。1 週間 puromycin に暴露し、耐性株を回収することで各遺伝子のノックダウン細胞を作製した。



写因子や顆粒球系特異的遺伝子の発現が亢進し、非翻訳領域において RNA 中のメチル化シトシンが増加していることが分かった。さらに RNA 内のシトシンメチル化に関与する酵素 NSUN2 は骨髄系造血器腫瘍で高発現を示しており、同遺伝子をノックダウンすることで細胞増殖能を低減させることができた。

MDS には芽球比率による病期が存在するため、今後実際の臨床検体を集積し *NSUN2* mRNA が MDS での病態進展マーカーとして有用であるか、また NSUN2 阻害剤により MDS の進展を抑制できるかを検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takada Yukichi, Shibuta Tatsuki, Hatano Mayu, Sato Kenichi, Koga Mari, Ishibashi Ayaka, Harada Tetsuhiro, Hisatomi Takashi, Shimura Hanae, Fukushima Noriyasu, Leecharoenkiat Kamonlak, Chamnanchanunt Supat, Svasti Saovaros, Fucharoen Suthat, Umemura Tsukuru	4. 巻 10
2. 論文標題 Pre-Analytical Modification of Serum miRNAs: Diagnostic Reliability of Serum miRNAs in Hemolytic Diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 5045 ~ 5045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10215045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 梅村 創, 南 杜萌, 高田 勇吉, 澁田 樹, 佐藤 謙一
2. 発表標題 血中マイクロRNA解析に及ぼすPre-analytical因子の検討
3. 学会等名 国際医療福祉大学学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澁田 樹
2. 発表標題 Direct RNA-seqを用いた腫瘍細胞中RNA修飾の解明(第二報)
3. 学会等名 国際医療福祉大学学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 南 杜萌, 佐藤 謙一, 高田 勇吉, 澁田 樹, 安田 聖子, 富安 聡, 香月 耕多, 永沢 善三, 若松謙太郎, 梅村 創
2. 発表標題 血清マイクロ RNA 解析による新型コロナウイルス感染症(COVID-19)重症度マーカーの開発
3. 学会等名 日本臨床検査医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸岡 恵利奈, 富安 聡, 澁田 樹, 高田 勇吉, 佐藤 謙一, 梅村 創, 太田 昭一郎
2. 発表標題 子宮体癌の早期発見に有用な特異的microRNAの同定および機能解析
3. 学会等名 日本臨床化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅村 創, 高田 勇吉, 澁田 樹, 廣岡 良隆
2. 発表標題 循環細胞外小胞のアレイ解析の疾患バイオマーカーへの応用
3. 学会等名 国際医療福祉大学学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澁田 樹
2. 発表標題 Direct RNA-seqを用いた腫瘍細胞中RNA修飾の解明
3. 学会等名 国際医療福祉大学学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 謙一, 若松 謙太郎, 片平 雄之, 香月 耕多, 澁田 樹, 富安 聡, 高田 勇吉, 永沢 善三, 梅村 創
2. 発表標題 新型コロナウイルス感染症(COVID-19)バイオマーカーとしての血清マイクロRNA解析
3. 学会等名 日本臨床検査医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高田 勇吉, 澁田 樹, 石橋 郁佳, 古賀 眞理, 小野 恭裕, 廣岡 良隆, 梅村 創
2. 発表標題 型糖尿病患者における血清マイクロRNAの解析
3. 学会等名 日本臨床検査医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大塚 百華, 富安 聡, 四丸 知弥, 澁田 樹, 宿谷 賢一, 大田 喜孝, 三宅 康之, 佐藤 信也
2. 発表標題 Masson trichrome染色におけるクロム酸フリー時間短縮法の検討
3. 学会等名 日本医学検査学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 富安 聡, 大塚 百華, 四丸 知弥, 澁田 樹, 宿谷 賢一, 大田 喜孝, 三宅 康之, 佐藤 信也
2. 発表標題 クロム酸フリー-azan染色における時間短縮法の検討
3. 学会等名 日本医学検査学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tatsuki Shibuta, Yukichi Takada, Tsukuru Umemura
2. 発表標題 Interaction via exosome miRNAs between myelodysplastic cell and normal Treg.
3. 学会等名 International Society for Extracellular Vesicles (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukichi Takada, Tatsuki Shibuta, Tsukuru Umemura
2. 発表標題 Circulating miR-451a is a useful biomarker for hemolysis
3. 学会等名 International Society for Extracellular Vesicles (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澁田 樹, 清水 穂乃香, 富安 聡, 佐藤 謙一, 梅村 創
2. 発表標題 Nanopore Sequencerを用いた骨髄異形成症候群由来細胞中RNA塩基修飾解析
3. 学会等名 日本臨床検査医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高田 勇吉, 澁田 樹, 古賀 眞理, 石橋 郁佳, 小野 恭裕, 廣岡 良隆, 梅村 創
2. 発表標題 表面プラズモンイメージングによる細胞外小胞(EV)解析
3. 学会等名 日本臨床検査医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澁田 樹
2. 発表標題 Nanopore SequencerによるH0XA9 splicing variantの検出
3. 学会等名 国際医療福祉大学学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------