

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17369

研究課題名(和文) Ab Initio遺伝子軌道法を用いた新生児疾患関連遺伝子ネットワークの同定

研究課題名(英文) Identification of neonatal disease-related gene networks using Ab initio analysis

研究代表者

柳沼 和史 (Yaginuma, Kazufumi)

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：70839399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、これまで明らかにされていない臍帯血中のエクソソームに含まれる遺伝子の発現解析を行い、新生児低酸素性虚血性脳症(HIE)患者の重症度、予後に関連するバイオマーカーを探索することである。

HIEの新生児例ならびにコントロールである健常新生児例から、出生児の臍帯動脈血を採取し、エクソソームに含まれるマイクロRNAを抽出した後、網羅的にmiRNA遺伝子の発現解析を行なった。

現在アレイ解析から得られた結果を解析中である。今後、その結果をもとに、Real-time PCR法による発現遺伝子の定量解析を行い、新生児HIEの重症度、予後予測に関連するバイオマーカーの探索を引き続き行なっていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、これまで明らかにされていない臍帯血中のエクソソームに含まれる遺伝子の発現解析を行い、新生児低酸素性虚血性脳症(HIE)患者の重症度、予後に関連するバイオマーカーを探索することである。

現時点でアレイ解析から得られた結果を解析中である。今後、その結果をもとに、Real-time PCR法による発現遺伝子の定量解析を行い、新生児HIEの重症度、予後予測に関連するバイオマーカーの探索を引き続き行なっていく。そのことが明らかになればよりHIE患児における早期の重症度分類、治療方法の判断に役立つであろう。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to analyze the expression of exosomal RNA in umbilical cord blood and to identify biomarkers related to the severity and prognosis of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) patients.

Umbilical cord blood was collected from newborns of HIE and healthy newborns as a control, miRNA contained in exosomes were extracted. Then the expression of miRNA genes was comprehensively analyzed by microarray. We are currently analyzing the results obtained from the array analysis. In the future, based on the results, we will carry out quantitative analysis of expressed genes by the Real-time PCR method, and continue to search for biomarkers related to the severity and prognosis of neonatal HIE.

研究分野：新生児医学

キーワード：新生児 低酸素性虚血性脳症 バイオマーカー miRNA エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA から転写される RNA には、タンパク質を作る情報を持ったメッセンジャー RNA (mRNA) とタンパク質をコードしない ncRNA (non coding RNA) がある。ncRNA には tRNA や rRNA 以外にマイクロ RNA (miRNA) や長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) がある。lncRNA や miRNA は mRNA を制御することで生命現象の中心的な役割を果たしていることが近年明らかになってきた。

近年、直径 40-100nm の小胞であるエクソソーム中に miRNA, lncRNA, mRNA が存在すること (Nat Cell Biol. 9:654-59、2007, Gene Cancer. 4:261-72, 2013) が発見されたのを契機に、エクソソームを介した細胞間、lncRNA, miRNA 移送による情報伝達機構の存在が明らかになり、lncRNA, miRNA そしてエクソソームの役割解明に向けた研究が活発化している。

一方、様々な生理現象が多くの分子の複雑な相互作用によって制御されていることが明らかになり、従来の単一もしくは少数の分子に着目した研究手法に限界があることは、今や誰の目にも明白である。また、遺伝情報は、量的変化・構造変化・分解制御・局在変化・複合体形成・クロマチン制御など、多彩な様式で同時に表出され、その変化も連続的あるいは離散的とバラバラであるため、情報の総体を統一的指標で把握することは極めて困難であった。この難問を解決し、複雑系である生命現象を理解して、疾患の予防・治療に役立てるためには、無限次元を扱う情報理論を駆使した新しい解析法が必須である。

研究協力者の森らは、情報理論を応用し、実験操作不要な多次元遺伝子機能解析法を開発し、Ab Initio 遺伝子軌道法 (以下 *ab Initio* 法) と名付けた (国際出願番号: PCT/JP2018/013877)。この技術で、従来は約 10 年も費やした遺伝子機能解析が、わずか数分で行えるようになった。さらに、申請者と研究協力者の郷は、動物実験で、*ab initio* 法の精度を予備的に検討した結果から、予想以上の有用性を強く認識するに至った。

2. 研究の目的

そこで、本研究の第一の目的は、これまで明らかにされていない臍帯血中のエクソソーム lncRNA, miRNA, mRNA の発現解析を早産児から正期産児を含めて大規模に行い、特に新生児低酸素性虚血性脳症 (HIE) の患児について臨床データを含めたデータベースを構築すること、第二の目的として、患児や母体の臨床情報と lncRNA, miRNA, mRNA の発現情報を *ab initio* 法を用い

て、様々な新生児疾患の発症や重症化に關与する疾患關連 lncRNA-microRNA-mRNA ネットワークを同定することとした。

3. 研究の方法

1) 臍帯血採取と血清分離

対象は 37 週 0 日から 41 週 6 日までに出生した低酸素性虚血性脳症の児ならびに健常新生児で、ご家族の同意が得られた児の臍帯血を採取する。検体採取後、3000 回転、10 分間で血清を遠心分離し、-80 で保存する。

2) エクソソームの抽出

エクソソーム抽出キットを用いて、血清からのエクソソーム抽出を行う。抽出されたエクソソームは PBS100ul で溶解し、lncRNA, miRNA, mRNA 発現解析用の total RNA 抽出とエクソソーム粒子数と粒子径測定に用いる。

3) エクソソームからの total RNA 抽出と micro array

RNA 抽出キットを用いてエクソソーム中の total RNA (exosomal RNA)を抽出する。抽出した total RNA からアレイ解析を行い、HIE 患児に特有の lncRNA, microRNA, mRNA を同定する。(Screening phase)

4) エクソソームの粒子数と粒子径の測定

Nano tracking analysis (Malvern Panalytical)を用いてエクソソームがブラウン運動している画像を確認し、エクソソームの粒子数ならびに粒子径を測定する。

5) 新生児疾患關連 lncRNA, miRNA, mRNAの同定: Validation Phase

Screening Phaseで同定された候補 lncRNA, miRNA, mRNAの各プライマーを購入し、real-time PCR法による定量的解析を行う。HIEの発症もしくは重症化と關連のある lncRNA-miRNA-mRNA ネットワークを *ab Initio*法を用いて同定する。

6) lncRNA-miRNA-mRNA発現と患児、母体情報を用いた解析

得られた lncRNA, microRNA, mRNAの発現解析データおよび患児のパラメータと母体のパラメータを用いて多次元解析を行う。

4. 研究成果

血清中の exosomal RNA が非常に微量であることから、プロトコール、手技の確立に時間を要したものの、HIE の臨床的重症度分類である Sarnat 分類で中等症～重症の 8 検体、コントロールである健常新生児 4 検体から、エクソソーム抽出ならびに total RNA の抽出をし得た。

これらの検体について、アレイ解析を行い、現在結果の解析中である。

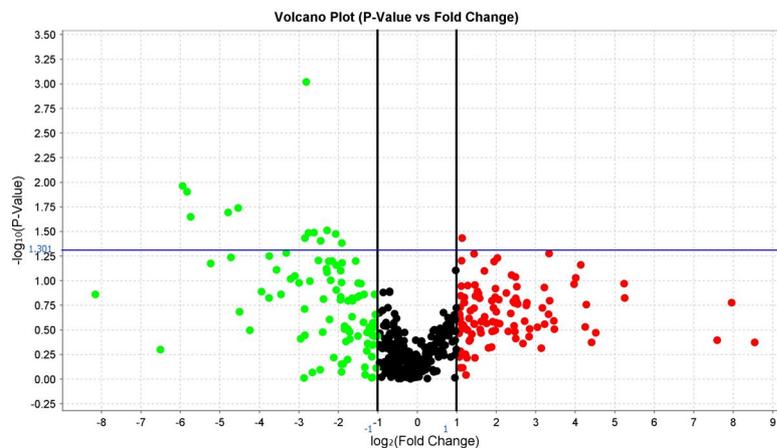


図1 中等症HIE 患児とコントロール群における miRNA の発現量を比較した Volcano Plot

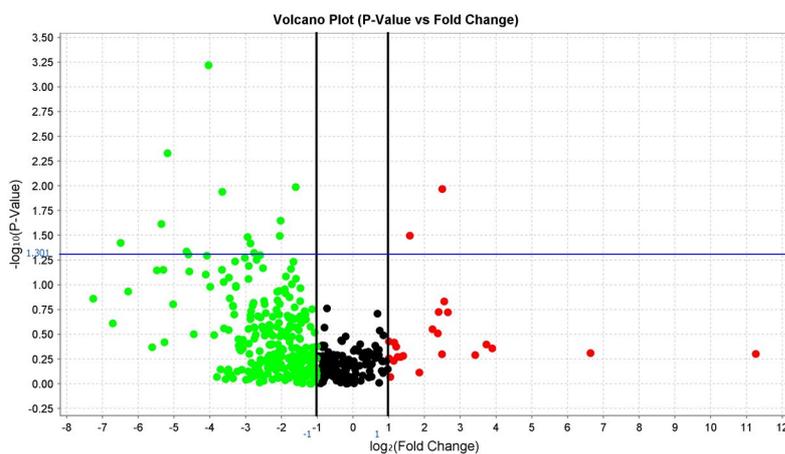


図2 重症HIE 患児とコントロール群における miRNA の発現量を比較した Volcano Plot

また、HIE 患児の臨床検体について、現在まで 25 検体を収集しており、今後 50 検体を目標に収集を続けていく。今後、アレイ解析の結果を基に、validation phase を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------