

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07791

研究課題名(和文) 核内低分子RNA snRNA U2関連断片の機能解明と肺癌予後マーカーとしての評価

研究課題名(英文) Studies on function of an snRNA U2 fragment and evaluation as a prognostic marker for lung cancer

研究代表者

相磯 聡子 (AISO, Toshiko)

杏林大学・保健学部・教授

研究者番号：40195144

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)：肺癌マーカー候補とされる血液中のマイクロRNA miR-1246 (snRNA U2断片) は、データベースmiRBaseに登録されているタイプ (archetype) ではなくアイソフォームの一つが主要であることが分かった。

miR-1246の遺伝子 (snRNA U2遺伝子) はゲノム上で縦列繰返し配列を構成し、繰返し数 (コピー数) は個人で非常に差がある (コピー数多型)。このコピー数と血液中のmiR-1246のレベルには相関がなく、マーカーとしてのmiR-1246のレベルがこの多型の影響を受けないことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液中のマイクロRNA miR-1246 (snRNA U2断片) の詳細な構造を示したことにより、miR-1246レベルを正確に測定するための情報が得られた。miR-1246の調節因子としての機能については、これまで考えられていた標的とは異なる遺伝子群が標的である可能性を示した。

miR-1246の遺伝子 (snRNA U2遺伝子) のコピー数に個人差があるが (コピー数多型)、この違いが血液中のmiR-1246のレベルに影響を及ぼす可能性は低いことを示しマーカーとしての一条件を満たすことが確認できた。

研究成果の概要(英文)：1. It was shown that a 5'-isoform, but not the canonical sequence (miRbase type), is the most abundant sequence of circulating miR-1246 (a fragment of snRNA U2), a candidate biomarker of lung cancer.

2. miR-1246 gene (snRNA U2 gene) is arranged in tandem repeats and the repeat number is highly variable from persons. No correlation between the repeat number and serum miR-1246 level was observed. These results show that the serum miR-1246 levels were not affected by the repeat number.

研究分野：分子生物学

キーワード：マイクロRNA 肺癌マーカー snRNA コピー数多型

1. 研究開始当初の背景

(1) miR-1246 に関するこれまでの知見

がんマーカーおよび調節因子としての知見

体液中のマイクロ RNA は、低侵襲性の診断 / 予後マーカーとして有用とされる。また情報伝達因子として、がんの進展に関わるメッセンジャー RNA を調節すると考えられている。miR-1246 は様々ながん患者の血液中に高濃度に存在し、診断や予後のマーカーとして注目されてきた(1)。また低転移性細胞株に対し遊走能や浸潤能を上昇させるなど、がんの進展を誘導するとの報告がある(2)。

先行研究で得られた知見

肺腺癌患者血清 small RNA の NGS 解析において、再発に先立ち miR-1246 レベルの上昇が見られ、この miR-1246 の多くが miRBase に登録されている archetype ではなく 5' 末端の長さが異なる isoform の一つであることが示された。マイクロ RNA の標的メッセンジャー RNA への結合は 5' 末端側の 2-8 の塩基配列に依存するとされていることから、これまで考えられていたものとは異なる遺伝子を標的とする可能性が示唆された。

miR-1246 遺伝子について

miR-1246 はスプライソソーム RNA snRNA U2 の断片であることが明らかになった(3)。すなわち miR-1246 遺伝子は従来考えられていた遺伝子ではなく、snRNA U2 遺伝子(以下 U2 遺伝子)で、miR-1246 レベルは U2 遺伝子の転写やプロセッシングなどの調節を受けると考えられる。U2 遺伝子は 17 番染色体上でタンデムリピートを構成しコピー数多型を示す(4)。U2 遺伝子本体(188 bp)はリピート単位(約 6 kb)内にあり、コピー数は 5~82 程度と報告されている(5)。他の繰返し配列同様、このリピート配列の発現調節についてほとんど明らかになっていない。

(2) 研究の動機

血清マイクロ RNA のリアルタイム PCR では、archetype と種々の isoform の総量が求められるため、肺癌患者血清中で上昇する miR-1246 が archetype とは限らない。実際には NGS 解析において示されたように 5' isoform なのではないか？

miR-1246 の遺伝子はコピー数多型を示す U2 遺伝子である。このコピー数の違いが miR-1246 の血中レベルに影響を及ぼしているのではないか？

2. 研究の目的

- (1) 肺癌患者において血中レベルが上昇する miR-1246 の 5' 末端配列を明らかにする。
- (2) U2 遺伝子コピー数が血清 miR-1246 (U2 断片) レベルに与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

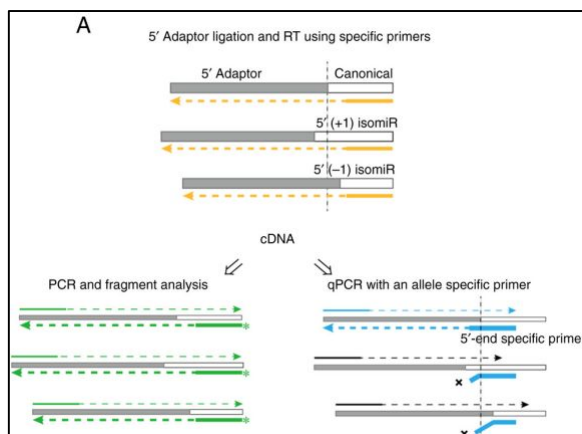
(1) 患者血清およびゲノム DNA

miR-1246 の 5' 末端解析において、杏林大学病院より提供を受けた肺腺癌患者および健常者の血清各 20 例を使用した。U2 遺伝子コピー数解析においては、神奈川県立がんセンターより提供を受けた肺腺癌患者血清およびゲノム DNA 46 例と、杏林大学病院より提供を受けた健常者血清およびゲノム DNA 36 例を使用した。

図 1 . miR-1246 の isoform 特異的定量

(2) miR-1246 の isoform 特異的定量

図 1 の通り、マイクロ RNA の 5' 末端にアダプターを連結し逆転写後、PCR 増幅しフラグメント解析を行った。データの解析には Peak Scanner (Thermo Fisher Scientific, Inc.)を用いた。さらにこの cDNA と、共通フォワードプライマーおよび各種 5' isoform 特異的リバースプライマーを用いて 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Inc.)により 5' 特異的 miR-1246 定量を行った。総 miR-1246 量は MiR-X miRNA First-Strand and TB Green qRT-PCR システム(Takara Bio, Inc.)を用いて測定した。総 miR-1246 レベルと 5' isoform レベルの相関についてスピアマンの順位相関係数を用いて解析した。



- (3) miR-1246 の archetype および isoform の標的遺伝子予測
miRDB - Custom Prediction により標的遺伝子予測を行った。

(4) U2 遺伝子コピー数解析

ゲノム DNA を *Hind*III で処理しリピート単位を切り離した後、QuantStudio Absolute Q Digital PCR System (Thermo Fisher Scientific, Inc.)を用い、RNase Pを標準として細胞内のU2 遺伝子コピー数を求めた。マン・ホイットニーの順位解析により患者群とコントロール群とのU2 遺伝子コピー数の比較を行った。

(5) U2 遺伝子コピー数と血清 miR-1246 レベルとの相関解析

スヘアマンの順位相関解析により、患者群、コントロール群それぞれについて、U2 遺伝子コピー数と血清 miR-1246 レベルとの相関分析を行った。

4. 研究成果

(1) 肺癌患者において血中レベルが上昇する miR-1246 の 5' 末端配列 について

フラグメント解析による血清 miR-1246 isoform の半定量的結果、健常者および患者において、5' 末端が 2 塩基短い 5' -isoform (-2) が miR-1246 総量のそれぞれ約 53% および 58% で、いずれにおいても archetype は 10% に満たなかった。5' -isoform 特異的定量では、患者において archetype や 5' -isoform (-1) のレベルは寧ろ有意に減少した。また総 miR-1246 量と 5' -isoform (-2) 量の相関解析の結果からは、健常者、患者何れにおいても総 miR-1246 量と 5' -isoform (-2) 量は有意な正の相関を示した。

本解析により、血液中の主要な miR-1246 は 5' -isoform (-2) であり、肺癌患者における miR-1246 レベルの上昇はこの isoform の上昇に起因することが明らかになった。さらにこの 5' -isoform の標的遺伝子予測の結果は、これまで考えられていた遺伝子とは異なる遺伝子群が miR-1246 の標的である可能性を示唆した。この結果は肺癌の進展に關与する情報伝達因子として miR-1246 を考える上で、有益な情報と考えられる。

この結果は論文によって公表した (Aiso T, Ueda M: 5' -isomiR is the most abundant sequence of miR-1246, a candidate biomarker of lung cancer, in serum. *Mol Med Rep* 27, art, 2023, doi: 10.3892/mmr.2023.12979)。

(2) U2 遺伝子コピー数多型が血清 miR-1246 (U2 断片) レベルに与える影響について

患者群および健常者群のゲノム DNA における U2 遺伝子コピー数測定の結果、患者群 26 ~ 99/cell、健常者群 31 ~ 82/cell で、マン・ホイットニーの順位解析により 2 群間に有意差はなかった ($p=0.283$)。ゆえに少なくともゲノムにおける細胞当たりの U2 遺伝子総コピー数が、肺腺癌の關連因子である可能性は低い。

健常者において、U2 遺伝子コピー数と血清 miR-1246 レベルとの間に相関は見られなかった (r_s 値: -0.269)。ゆえにゲノムの U2 遺伝子コピー数多型が血清 miR-1246 レベルに影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。これは患者においても同様であった。

U2 遺伝子コピー数と血清 miR-1246 レベルとの間に相関が見られないことから、スプライソソーム構成因子 snRNA U2 の遺伝子発現において遺伝子量補償が働いている可能性が示唆された。

U2 遺伝子領域は、リピート単位が 6 kb と大きいいためマクロサテライトのカテゴリーに入る。マクロサテライト内にハウスキーピング遺伝子がある例は極めて稀で、反復数が非常に多様な点においても他に例を見ない。反復数に關連したクロマチン構造などへの影響や発現調節など、ほとんど明らかになっていない。本研究で得られた知見はこれらの解明のための糸口を与えた。

引用文献

1. Jones CI. et al. *British J Cancer* 107, 1987-1996, 2012.
2. Sakha S et al. *Sci Rep.* 6, 38750, 2016.
3. Xu Y.- F. et al. *RNA Biol.* 16, 770-784, 2019.
4. Pavelitz T. et al. *EMBO J.* 14, 169-177, 1995.
5. Tessereau C. et al. *Nucleic Acids Res.* 42, 9121-9130, 2014.

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 Aiso, T., & Ueda, M.	4. 巻 27
2. 論文標題 5' isomiR is the most abundant sequence of miR-1246, a candidate biomarker of lung cancer, in serum.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2023.12979	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 相磯聡子, 上田真樹子
2. 発表標題 リアルタイムPCR法を用いた高コピー数多型の解析
3. 学会等名 第68回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2021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
研究分担者	大西 宏明 (OHNISHI Hiroaki) (80291326)	杏林大学・医学部・教授 (32610)	

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
---------	---------