

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月16日現在

機関番号：33916

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890226

研究課題名（和文） Micro RNA 発現を指標とした新規細胞検出法の開発

研究課題名（英文） Development of novel cell detection system targeting microRNA expression

研究代表者

山田 宏哉（YAMADA HIROYA）

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：80610352

研究成果の概要（和文）：我々は細胞の RNA を分解しない条件で、細胞内・核内蛋白、mRNA の発現を検出し、その発現パターンを指標に細胞を選別して、選別された細胞の遺伝子発現プロフィールを作成する FACS-mQ（mRNA quantification after FACS）の開発をしている。本研究はこの FACS-mQ を発展させ、microRNA を標的とする検出法の確立を目指した基礎検討を行った。

研究成果の概要（英文）： Recently, we have established an in-tube in situ hybridization method named mRNA quantification after fluorescence activated cell sorting (FACS-mQ), in which a specific mRNA in a particular cell type is stained with a fluorescent dye, allowing the stained cells to be selected by FACS without suffering excessive RNA degradation. In this study, we tried to apply this method to micro RNA detecting in the various cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態検査学

キーワード：フローサイトメトリ、細胞検出法、microRNA、遺伝子検査、mRNA quantification after FACS、FACS-mQ

## 1. 研究開始当初の背景

近年の RNA 研究の進展により、microRNA (miRNA) は細胞の増殖・発生・分化、アポトーシス・代謝などの様々な生体調整に関与している事がわかってきた。これまでに、臨床検体での miRNA の発現解析は数多く報告され、癌、感染症、生活習慣病などの様々な疾患との関連が大きな注目を集めている。しかし、これらの報告は組織全体での miRNA 発

現の解析のみであり、細胞 1 個 1 個での解析や特定の miRNA 発現細胞の DNA や RNA 発現などの解析は不可能である。また、今後の癌診断や再生医療などの分野に臨床応用を考えると少数の細胞を効率よく解析する技術が必須である。そこで、本研究はフローサイトメトリーを用いて細胞 1 個 1 個の micro RNA(miRNA) 発現を解析し、さらに miRNA を指標に細胞分離し、遺伝子発現解

析を可能にする新規の細胞検出法の確立を目的とする。

申請者らはこれまでに FACS (fluorescence activated cell sorting) を用いて、種々の検体中に存在する少数の細胞に対して、任意の mRNA 発現などをマーカーとして解析・分離し、回収された細胞の性質を解析するより汎用性のある技術を開発し、この手法を FACS-mQ (mRNA quantification after FACS) と名付けた。

・ Maruo R, Yamada H, Watanabe M, Hidaka Y, Iwatani Y, Takano T. mRNA quantification after fluorescence activated cell sorting using locked nucleic acid probes. *Mol Biotechnol* 2011;49(1):42-7,

・ Yamada H, Maruo R, Watanabe M, Hidaka Y, Iwatani Y, Takano T. Messenger RNA quantification after fluorescence-activated cell sorting using in situ hybridization. *Cytometry Part A* 2010 77(11):1032-7.

・ Yamada H, Maruo R, Watanabe M, Hidaka Y, Iwatani Y, Takano T. Messenger RNA quantification after fluorescence activated cell sorting using intracellular antigens. *Biochem Biophys Res Commun* 2010 397(3):425-8.)

通常の FACS を用いた細胞分離では適切な表面抗原を有していること、抗原に対して適切な抗体を用意できることが必須である。さらには採取された細胞の性質を解析するためにその後の煩雑な培養が必要である。このような制約の中では適応できる細胞種は限られてしまう。しかし、FACS-mQ は細胞に発現している mRNA を指標に細胞解析・分離を可能とするので、目的とする細胞の遺伝子発現さえわかっているならば、臨床検体中に存在する細胞の有無や数の定量が可能となり、さらには細胞を回収して遺伝子プロフィールを作成することで細胞の性質の同定をすることができる。

本方法は、従来では不可能であった組織中を含めた細胞 1 個 1 個の miRNA の発現強度、組織中での発現細胞の割合、さらには miRNA を指標に分離した細胞の遺伝子発現や DNA 解析など一連の解析が可能となる。細胞生物学や生化学の新規の実験手法としてだけでなく、血液、髄液、穿刺検体など様々な臨床サンプルに適用することで、癌、炎症性疾患、感染症などの幅広い疾患の病態解明や診断法に繋がることを期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究はフローサイトメトリーを用いて細胞 1 個 1 個の micro RNA (miRNA) 発現を解析し、さらに miRNA を指標に細胞分離し、

遺伝子発現解析を可能にする新規の細胞検出法 (miRNA をターゲットとした FACS-mQ) の確立を目標とし、そのための基礎検討を行うこととする。

## 3. 研究の方法

将来的には臨床サンプルを用いた解析を考えているが、今回の 2 年間は比較的扱いが容易である細胞株を用いて miRNA を指標とした FACS-mQ の基本プロトコルの確立を目指した。具体的には細胞の RNA や DNA を保持した状態で、

- ① In Tube で細胞のターゲット miRNA を蛍光標識
- ② 蛍光標識した細胞をフローサイトメトリーにより解析
- ③ フローサイトメトリーにより細胞分離し、分離した細胞の遺伝子発現などの性質を同定

これら一連の技術を開発し、汎用性の高い方法にすることである。

期間中の研究方法を以下に示す。

### (1) 細胞株での miRNA の発現解析

miRNA を指標にした FACS-mQ 開発の基礎検討を行うために、標的の miRNA が発現している細胞 (positive control) と発現していない細胞 (negative control) を選定する。

これまでに申請者は甲状腺細胞株を用いた実験経験があるので、甲状腺細胞で発現が報告されている miRNA (miR-146b, 181b, 21, 221, 222 など) を中心に検討していく (Proc Natl Acad Sci U S A 2008 20;105:7269-74., J Clin Endocrinol Metab 2011 96:546-543)。具体的な方法としては、数種類の甲状腺細胞株から miRNA を抽出・精製し、miRNA を逆転写し cDNA を作成し、リアルタイム PCR 法を用いて発現解析・評価する。

### (2) miRNA に対する LNA プローブの作成

細胞 1 個 1 個の miRNA の検出法として、LNA 技術を用いた In-tube In situ hybridization 法を考えている。LNA とは Locked Nucleic Acid の略で、リボ核酸の 2' 位の酸素原子と 4' 位の炭素原子が架橋した 2 つの環状を持つ核酸である。オリゴ配列に LNA を導入することにより、二本鎖の安定性が上がり Tm 値が上昇し、その結果、高い特異性と再現性を実現できるため SNP 解析、発現プロファイリング、発現量の低い RNA の解析などに応用される事が期待されている。実際、whole mounts, 組織切片などの miRNA の検出で数多くの実績をあげている。甲状腺細胞株の miRNA 発現解析の結果を基に標的の miRNA に対して、LNA 技術を用いたオリゴプローブを作成し、Northern blotting などでプローブの感度・

特異度を含めた精度を評価する。

(3) 細胞の miRNA 蛍光標識の条件検討  
細胞の miRNA を蛍光標識するための条件を検討する。甲状腺細胞株を用いて

- ・細胞の前処理条件  
(固定法、透過性)
- ・hybridization 反応の条件  
(反応液の組成、時間、温度など)
- ・洗いの条件
- ・蛍光標識条件

などを決定し、高感度で特異性が高い検出条件を決定する。

(4) miRNA を指標とした FACS による細胞解析・細胞分離の確立

In tube で細胞の miRNA を蛍光標識し、FACS で細胞解析・分離するための条件を設定する。また発現強度の異なる細胞株などを用いて解析能・分離能を評価し、さらに高める改良をおこなう。

#### 4. 研究成果

(1) 細胞株での miRNA の発現解析

miRNA を指標にした FACS-mQ 開発の基礎検討を行うために、数種類の細胞株から miRNA を抽出・精製し、miRNA を逆転写し cDNA を作成し、リアルタイム PCR 法を用いて発現解析・評価した。標的の miRNA が発現している細胞 (positive control) と発現していない細胞 (negative control) を選定し、これら細胞株を用いて miRNA をターゲットとした細胞検出法 (miRNA をターゲットとした FACS-mQ) の条件検討を行っていくことにした。

(2) miRNA に対する LNA プローブの作成  
細胞 1 個 1 個の miRNA の検出法として、LNA 技術を用いた In-tube In situ hybridization 法を採用した。LNA とは Locked Nucleic Acid の略で、リボ核酸の 2' 位の酸素原子と 4' 位の炭素原子が架橋した 2 つの環状を持つ核酸である。オリゴ配列に LNA を導入することにより、二本鎖の安定性が上がり Tm 値が上昇し、その結果、高い特異性と再現性を実現できるため発現プロファイリング、発現量の低い RNA の解析などに応用できる。細胞株の miRNA 発現解析の結果を基に標的の miRNA に対して、LNA オリゴプローブを作成し、Northern blotting などでプローブの感度・特異度を含めた精度を評価した。作成した LNA プローブの内、いくつかは良好な感度と特異度を示した。このプローブを用いて In-tube In situ hybridization 法により染色した細胞をフローサイトメトリーで解析していく。

(3) 細胞の miRNA 蛍光標識の条件検討

細胞の miRNA 発現を LNA プローブによる In-tube In situ hybridization 法で蛍光標識するための条件検討を行った。具体的には、甲状腺細胞株を用いて細胞の前処理条件、hybridization 反応の条件 (反応液の組成、時間、温度など)、洗いの条件、蛍光標識条件などを決定し、高感度で特異性が高い検出条件を検討した。しかしながら、良好な感度・特異度が得られなかった。そこで、TSA (Tyramide Signal Amplification) システムなどのシグナル増幅などによる高感度化も検討した。チラミド (Tyramide) 化合物は、過酸化水素の存在下において、西洋わさびパーオキシダーゼ (HRP) の触媒作用によりラジカル化され、その近傍にある芳香属化合物と非特異的に共有結合で結びつき。TSA システムではこの性質を利用し、HRP 標識の抗体やプローブを用いて、ハプテン標識のチラミドを作用させる。チラミドは HRP によりラジカル化されますが、このラジカルの寿命は非常に短いため、HRP の近傍にあるサンプル組織やブロッキング剤に含まれるアミノ酸 (チロシンやトリプトファン) などの芳香属化合物とのみ共有結合し、HRP の周辺のみハプテン標識のチラミドが集積する。つまり、一つのハプテン分子を基点とし、それを拡散することなくハプテンの増幅を行うことができるので、高感度な蛍光シグナルを検出できる。この TSA システムを LNA プローブによる In-tube In situ hybridization 法に応用することにより検出感度は向上したが、非特異反応も多くなり良好な S/N 比は得られていない。細胞の前処理条件、hybridization 反応の条件 (反応液の組成、時間、温度など)、洗いの条件、蛍光標識条件などを含め、再度検討が必要である。

(4) 今後の展望

本研究はフローサイトメトリーを用いて細胞 1 個 1 個の miRNA 発現を解析し、さらに miRNA を指標に細胞分離し、遺伝子発現解析を可能にする新規の細胞検出法 (miRNA をターゲットとした FACS-mQ) の確立を目標とし、そのための基礎検討を行った。LNA プローブを用いて細胞中の miRNA を標識し、検出できるようになったが、良好な S/N 比は得られず、フローサイトメトリーでの解析はできなかった。今後は、細胞の固定法、前処理、hybridization 反応の条件等、さらなる検討を加えることにより良好な S/N 比を得られる条件を確立させる。将来的には血液、髄液、穿刺検体など様々な臨床サンプルに適用することで、癌、炎症性疾患、感染症などの幅広い疾患の病態解明や診断法に繋げていきたい。

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1件)

- ① 山田宏哉 新規臨床検査法：FACS-mQの開発 [Development of mRNA quantification after fluorescence activated cell sorting]. 臨床病理 60(2):139-144 2012 (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

- ① 第54回日本検査医学会近畿支部総会 山田宏哉 シンポジウム次世代臨床検査診断法の最前線 新規臨床検査法：FACS-mQの開発 臨床検査医学会近畿支部総会(滋賀)2011. 10. 29
- ② 山田宏哉、鈴木康司、市野直浩、安藤嘉崇、沢田章、大橋鉦二、寺平良治、井上孝、橋本修二：住民健診受診者を対象とした脂肪肝における血清microRNA(miR-122, miR-34a)の解析 第59回日本臨床検査医学会学術総会(京都)、2012. 11. 30
- ③ 山田宏哉、鈴木康二、井上孝、伊藤宜則、浜島信之、橋本修二：住民健診受診者における脂肪肝と血清microRNA(miR-21, miR-34a, miR-122)との関連 第71回日本公衆衛生学会総会(山口)2012. 10. 25

〔図書〕(計0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

山田 宏哉 (YAMADA HIROYA)  
藤田保健衛生大学・医学部・助教  
研究者番号：80610352

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：