

令和元年6月24日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08471

研究課題名(和文) 高感度蛍光 in situハイブリダイゼーション法によるmicroRNA発現解析

研究課題名(英文) The analysis of microRNA localization using fluorescence resonance energy transfer based in situ hybridization

研究代表者

菱川 善隆 (Hishikawa, Yoshitaka)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：60304276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：高感度蛍光発色(Fluorescence Resonance Energy Transfer: FRET; 蛍光共鳴エネルギー移動)を利用して、培養細胞や組織切片上での小分子非翻訳RNAであるマイクロRNA発現動態を検出することのできる新たな高感度検出法として、FRET based molecular beacon probe for in situハイブリダイゼーション(FRET-ISH)法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんを含む様々な疾病に關与する小分子非翻訳RNAであるmicroRNA (miRNA)について、組織や細胞での発現動態を解析する新たな検出法として、FRET based in situハイブリダイゼーション(FRET-ISH)法を用いた高感度miRNA 局在検出法を開発した。このFRET-ISH法は、様々なmiRNAの特定の細胞や組織での細胞生物学的役割や疾病への關与について新たな知見が得られる有用な方法論であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have developed a new application of fluorescence resonance energy transfer based molecular beacon probe for in situ hybridization (FRET-ISH) for detection of specific microRNA at the tissue and cellular level.

研究分野：分子組織細胞化学

キーワード：in situハイブリダイゼーション マイクロRNA 蛍光

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

細胞内には mRNA のほかに、25 塩基数以下の小分子非翻訳 RNA である miRNA が多数存在し、タンパク質をコードする遺伝子の少なくとも約 3 分の 1 の発現を制御し、個体の発生、恒常性の維持、再生、あるいはがんや糖尿病、脂質代謝異常などの様々な疾患に関与することがわかってきた (Cell 116, 281-97, 2004, Nature 435, 834-8, 2005, Jpn J Clin Oncol. 43, 596-607, 2013)。その発現解析には、組織や細胞全体での発現量を解析できるノザンブロット法、マイクロアレイ、リアルタイム PCR が利用されるが、miRNA 発現量の比較は可能だが、組織・細胞内での特定の miRNA の発現動態についての解析は困難である (FEBS Letters 589:1694-1701)。

一方、組織・細胞レベルでの mRNA の特異的発現局在の解析法としては、個々の細胞での発現を解析できる ISH 法が頻用されている (J Cell Sci.127:2040-52, 2014, 組織細胞化学 2015, 77-91, 2015)。この方法論では、化学物質 (ジゴキシンゲン等) あるいは蛍光物質 (FITC 等) をプローブ標識として用いて免疫組織化学により間接的に局在を視覚化するのが一般的である。しかしながら、18-25 塩基数程度の短い配列の miRNA の検出には、ハイブリダイゼーション効率や検出感度の問題から未だ ISH 手技が確立しているとはいえない。

研究分担者である石塚らは、従来の蛍光標識とは全く異なる原理で蛍光を発する現象である Fluorescence Resonance Energy Transfer: FRET ; 蛍光共鳴エネルギー移動 (図 1 : 両端が離れることにより Fluorophore が蛍光を発する現象) を利用し、特に染色体上でのテロメア DNA の発現解析を蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) で行っている (J Am Chem Soc. 135, 14-17, 2013. Curr Protoc Nucleic Acid Chem. 13, 1-13, 2015)。

我々は既に、この FRET の原理を利用して、組織切片上で検出可能な ISH 用蛍光標識 28S プローブを作製し、マウス精巣において 28S rRNA を細胞質と核小体に緑色 (あるいは白色) として認め、通常の ISH 法において FRET の有用性を証明している。また、この FRET-ISH 法の利点として、Fluorophore と Quencher の組合せによる多重染色が容易であると考えられ、従来不可能であった、mRNA と miRNA を同時に直接視覚化することも可能となり、細胞内での遺伝子の発現制御に関する詳細な知見が期待できる。

図1 The principle of fluorescent in situ hybridization

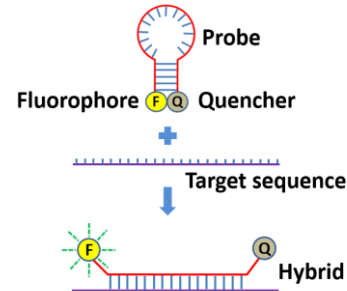
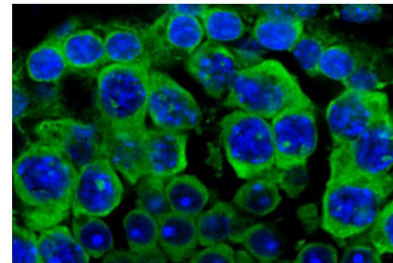


図2 In situ localization of FAM-28S rRNA



2. 研究の目的

高感度蛍光発色 : FRET を利用して、組織切片上で特定の細胞での小分子非翻訳 RNA である microRNA (miRNA) 発現動態を解析する新たな検出法として、FRET based in situ ハイブリダイゼーション (FRET-ISH) 法を開発し、組織・細胞レベルでの miRNA 局在検出法を確立する。この方法論を用いて、ラット肝再生モデルや培養細胞等をもちいて特定の miRNA 発現と細胞増殖・分化・再生ならびにがんとの関連性を解明すると共に、エレクトロポレーションを用いて肝臓および培養細胞に miRNA 阻害剤を導入し、miRNA 制御による新たな治療戦略の可能性を探る。

3. 研究の方法

新規高感度蛍光標識プローブによる FRET-ISH 法を開発し、miRNA の組織・細胞内局在の視覚化並びに細胞増殖・分化・再生機構への関与を解明する為、以下の研究を計画する。①通常の ISH の陽性コントロール用 28S rRNA 配列を基にした miRNA に対応する短いプローブを作製し最適な FRET-ISH 条件 (温度、溶液組成、洗浄条件等) を確立する。②正常組織で大量に存在する miRNA である miR-122 による FRET-ISH 陽性コントロールを確立する。③ラット肝 70% 切除モデルを作製し miR-21 の経時的な発現動態を検討すると共に miR-21 発現抑制を行い、細胞増殖・分化・再生に関与する諸因子との関連性を検討する。

4. 研究成果

FRET-ISH 法による、組織・細胞レベルでの新たな miRNA 局在検出法を開発するために、標的とする miRNA 自体が 25 塩基以下と非常に短いことより、miRNA 用プローブのハイブリダイゼーション条件の最適化を行うと共に、複数の RNA の同時検出についての可能性も検討した。

具体的には、大量に組織内に発現している 28S rRNA について、通常 ISH 陽性コントロールに使う 28S rRNA 検出

プローブ配列 (39 塩基数) から、miRNA の塩基数に対応した 22 塩基数の短いプローブ配列を選択し、蛍光色素を標識した FRET 標識プローブを作製し、マウス臓器のパラフィン切片を用いて①プローブ濃度、②ハイブリダイゼーション温度、③ハイブリ

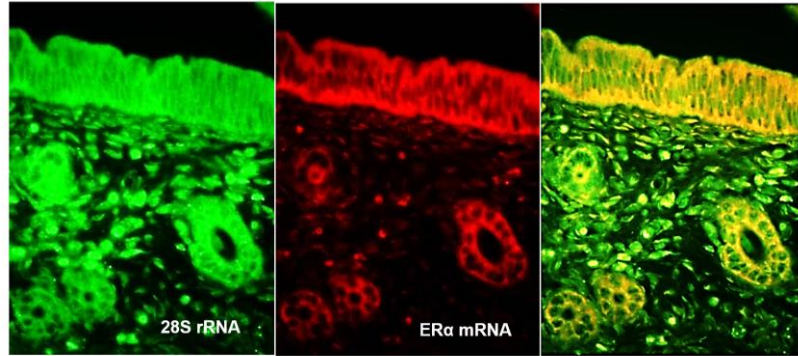


図3. FRET-ISHによるマウス子宮での28S rRNAとエストロゲン受容体mRNAの局在

ダイゼーション溶液組成、④ハイブリダイゼーション反応時間と洗浄条件、を検討して小分子 RNA 検出のための FRET-ISH 法の最適な条件検討を行った。その結果、通常の ISH 法と比較して、プローブ濃度は 1/10 に、ハイブリダイゼーション反応時間は 3 時間 (通常 17 時間) で検出可能であった。更に、FRET を用いることで、通常は困難な同一切片上での複数の遺伝子局在証明も可能となった (図 3)。

この条件を基に、肝臓に豊富に存在する miR-122 の FRET プローブを作製しマウス肝組織内発現を検討した。その結果、miR122 は、正常肝組織内の中心静脈周囲の肝細胞での発現が強く認められ、miRNA 発現が組織内の部位により異なっている可能性があることが判明した (図 4)。

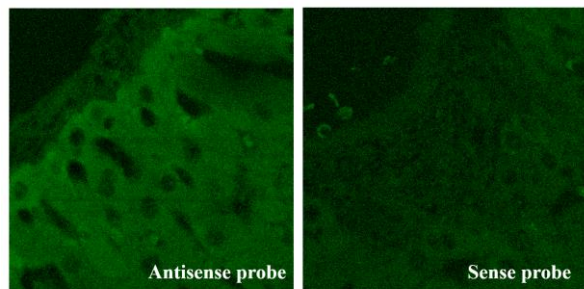


図4. 正常肝臓でのmiR122の局在

以上、我々は、組織細胞内での miRNA の発現局在の検出に関する新たなツールとして FRET-ISH 法の開発に成功し、その有用性について明らかにした。

今後、本技術を基盤として、ラット肝再生モデルや培養細胞等をもちいて特定の miRNA 発現と細胞増殖・分化・再生ならびにがんとの関連性を解明していく予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件)

1. Mochizuki H, Phyu KP, Aung MN, Zin PW, Yano Y, Myint MZ, Thit WM, Yamamoto Y, Hishikawa Y, Thant KZ, Maruyama M, Kuroda Y.: Peripheral neuropathy induced by drinking water contaminated with low-dose arsenic in Myanmar. *Environ Health Prev Med.* 2019 Apr 23;24(1):23. doi: 10.1186/s12199-019-0781-0. (査読有)
2. Kyaw MTH, Yamaguchi Y, Choijookhuu N, Yano K, Takagi H, Takahashi N, Oo PS, Sato K, Hishikawa Y.: The HDAC Inhibitor, SAHA, Combined with Cisplatin Synergistically Induces Apoptosis in Alpha-fetoprotein-producing Hepatoid Adenocarcinoma Cells. *Acta Histochem. Cytochem.* 2019, 52:1-8. (査読有)
3. Fukaya T, Fukui T, Uto T, Takagi H, Nasu J, Miyanaga N, Arimura K, Nakamura T, Koseki H, Choijookhuu N, Hishikawa Y, Yamashita Y, Sato K.: Pivotal role of IL-22BP in the epithelial autoregulation of IL-22 signaling in the control of skin

- inflammation. *Frontiers. Immunol.* 2018 Jun 21;9:1418. doi: 10.3389/fimmu.2018.01418. eCollection 2018. (査読有)
4. Lee D, Taniguchi N, Sato K, ChoiJookhuu N, Hishikawa Y, Kataoka H, Morinaga H, Lotz M Chosa E.: HMGB2 is a novel adipogenic factor that regulates ectopic fat infiltration in skeletal muscles. *Sci. Rep.* 2018, doi:10.1038/s41598-018-28023 (査読有)
 5. Ali MN, ChoiJookhuu N, Takagi H, Srisowanna N, Huynh MNH, Yamaguchi Y, Oo PS, Kyaw MTH, Sato K, Yamaguchi R, Hishikawa Y.: The HDAC Inhibitor, SAHA, Prevents Colonic Inflammation by Suppressing Pro-inflammatory Cytokines and Chemokines in DSS-induced Colitis. *Acta Histochem. Cytochem.* 2018, 51:33-40. (査読有)
 6. Oo PS, Yamaguchi Y, Sawaguchi A, Kyaw MTH, ChoiJookhuu N, Ali MN, Srisowanna N, Hino SI, Hishikawa Y.: Estrogen Regulates Mitochondrial Morphology through Phosphorylation of Dynamin-related Protein 1 in MCF7 Human Breast Cancer Cells. *Acta Histochem. Cytochem.* 2018, 51:21-31. (査読有)
 7. Uto T, Takagi H, Fukaya T, Nasu J, Fukui T, Miyanaga N, Arimura K, Nakamura T, ChoiJookhuu N, Hishikawa Y, Katsuaki Sato.: Critical role of plasmacytoid dendritic cells in induction of oral tolerance. *J Alle Clin Immunol.* 2018 141:2156-2167. (査読有)
 8. Matsumoto J, Suzuki K, Yasuda M, Yamaguchi Y, Hishikawa Y, Imamura N, Nanashima A.: Photodynamic therapy of human biliary cancer cell line using combination of phosphorus porphyrins and light emitting diode. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2017, 25:6536-6541. (査読有)
 9. Nakamura T, Ueyama T, Ninoyu Y, Sakaguchi H, ChoiJookhuu N, Hishikawa Y, Kiyonari H, Kohta M, Sakahara M, de Curtis I, Kohmura E, Hisa Y, Aiba A, Saito N.: Novel role of Rac-Mid1 signaling in medial cerebellar development. *Development.* 2017, 144:1863-1875. (査読有)
 10. Honda A, ChoiJookhuu N, Izu H, Kawano Y, Inokuchi M, Honsho K, Lee AR, Nabekura H, Ohta H, Tsukiyama T, Ohinata Y, Kuroiwa A, Hishikawa Y, Saitou M, Jogahara T, Koshimoto C.: Flexible adaptation of male germ cells from female iPSCs of endangered Tokudaia osimensis. *Sci Adv.* 2017 May 12;3(5):e1602179. doi: 10.1126/sciadv.1602179 (査読有)
 11. Honda A, Kawano Y, Izu H, ChoiJookhuu N, Honsho K, Nakamura T, Yabuta Y, Yamamoto T, Takashima Y, Hirose M, Sankai T, Hishikawa Y, Ogura A, Saitou M.: Discrimination of Stem Cell Status after Subjecting Cynomolgus Monkey Pluripotent Stem Cells to Naïve Conversion. *Sci Rep.* Mar 28;7:45285. 2017 doi: 10.1038/srep45285 (査読有)
 12. Batmunkh B, ChoiJookhuu N, Srisowanna N, Byambatsogt U, Oo PS, Ali MN, Yamaguchi Y, Hishikawa Y.: Estrogen accelerates cell proliferation through estrogen receptor alpha during rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Acta Histochem. Cytochem.* 2017, 50:39-48. (査読有)
 13. Tsuchiya K, Ikeda T, Batmunkh B, ChoiJookhuu N, Ishizaki H, Hotokezaka M, Hishikawa Y, Nanashima A.: Frequency of CD4+CD161+ T cell and interleukin-10 expression in inflammatory bowel diseases. *Acta Histochem. Cytochem.* 2017, 50:21-28. (査読有)
 14. Chayapong J, Madhyastha H, Madhyastha R, Nurrahmah QI, Nakajima Y, ChoiJookhuu N, Hishikawa Y, Maruyama M.: Arsenic trioxide induces ROS activity and DNA damage, leading to G0/G1 extension in skin fibroblasts through the ATM-ATR-associated Chk pathway. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2016 Dec 24. DOI 10.1007/s11356-016-8215-7 (査読有)
 15. Arimura K, Takagi H, Uto T, Fukaya T, Nakamura T, ChoiJookhuu N, Hishikawa Y,

- Yamashita Y, Sato K.: Crucial role of plasmacytoid dendritic cells in the development of acute colitis through the regulation of intestinal inflammation *Mucosal Immunol.* 2016, 10:957-970. (査読有)
16. Takagi H, Arimura K, Uto T, Fukaya T, Nakamura T, Choijookhuu N, Hishikawa Y, Sato K.: Plasmacytoid dendritic cells orchestrate TLR7-mediated innate and adaptive immunity for the initiation of autoimmune inflammation. *Sci Rep.* 2016; 6: 24477. doi: 10.1038/srep24477. (査読有)
 17. Yamaguchi Y, Madhyastha H, Madhyastha R, Choijookhuu N, Hishikawa Y, Pengjam Y, Nakajima Y, Maruyama M.: Arsenic acid inhibits proliferation of skin fibroblasts, and increases cellular senescence through ROS mediated MST1-FOXO signaling pathway. *J Toxicol Sci.* 2016; 41: 105-113. (査読有)
 18. 菱川善隆: 遺伝子の局在を見る— in situ hybridization. *Clinical Neuroscience.* 2016; 34: 625-628. (査読無)
 19. Choijookhuu N, Hino SI, Oo PS, Batmunkh B, Hishikawa Y.: The role of estrogen receptors in intestinal homeostasis and disease. *Receptors Clin Investig.* 2016 Vol 3, No 1; doi: 10.14800/rci.1109 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. 菱川善隆: FRET を用いた in situ ハイブリダイゼーションによる遺伝子発現解析 日本顕微鏡学会第 74 回学術集会講演会 (2018 年) (シンポジウム)
2. Choijookhuu Narantsog, 石塚匠, 徐岩, 小路武彦, 菱川善隆: Simultaneous detection of multiple mRNAs using FRET based molecular beacon probes by in situ hybridization. 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2018 年) (ポスター)
3. 菱川善隆: FRET(蛍光共鳴エネルギー移動)標識プローブによる高感度 ISH 法の有用性. 第 58 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 (2017 年) (シンポジウム)
4. Choijookhuu N, 石塚匠, 徐岩, 小路武彦, 菱川善隆: A new strategy of FRET based molecular beacon fluorescent probe for in situ hybridization. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2017 年) (ポスター)
5. Choijookhuu N, 石塚匠, 徐岩, 小路武彦, 菱川善隆: A new approach: FRET based molecular beacon fluorescent probe for in situ hybridization. 第 57 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 (2016 年) (ポスター)

[図書] (計 2 件)

1. 菱川善隆: In situ hybridization の原理と基礎. 組織細胞化学 2018. 135-146, 2018. 日本組織細胞化学会(編), 中西印刷.
2. 菱川善隆: In situ hybridization 法—基礎編. 組織細胞化学 2017. 159-169, 2017. 日本組織細胞化学会(編), 中西印刷.

[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:

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：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等 宮崎大学医学部解剖学講座組織細胞化学分野ホームページ
<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/home/anatomy1/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：石塚 匠
ローマ字氏名：Ishizuka Takumi
所属研究機関名：宮崎大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号（8桁）：50700085

(2) 研究分担者

研究分担者氏名：川口 真紀子
ローマ字氏名：Kawaguchi Makiko
所属研究機関名：宮崎大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号（8桁）：90405598

(3) 研究分担者

研究分担者氏名：チョウジョウフ ナランツオツク
ローマ字氏名：Choijookhuu Narantsog
所属研究機関名：宮崎大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号（8桁）：90640962

(4) 研究分担者

研究分担者氏名：ピュー シンウー
ローマ字氏名：Phyu Synn Oo
所属研究機関名：宮崎大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号（8桁）：90718123

※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、研究者個人に帰属されます。