

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 6 月 12 日現在

機関番号：11301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590626
 研究課題名（和文） 質量分析による microRNA の網羅的検索とその法医学的応用
 研究課題名（英文） Comprehensive analysis of micro RNA using mass-spectrometry and its forensic application
 研究代表者 橋谷田 真樹
 (HASHIYADA MASAKI)
 東北大学・大学院医学系研究科・技術専門員
 研究者番号：40374938

研究成果の概要（和文）：ノンコード RNA である microRNA(miRNA)は、高次生命現象や病態への関与が注目されているが、死後の挙動に関しての報告は皆無である。我々はラットを用いて死後の miRNA 解析を行った結果、miRNA が法医学的に有効なバイオマーカーとして応用可能であることを見出した。また、本研究では totalRNA からの質量分析による、ラットの死後 miRNA の直接網羅的解析を目的としていたが、残念ながらそれは極めて困難であることも判明した。

研究成果の概要（英文）：Non-coding and small single-stranded RNA molecules, microRNAs (miRNAs), have been found to regulate a variety of physiological functions. We focused on the behavior of miRNAs at postmortem as a biomarker to quantify the physical stress. In this preliminary study on rat, we determined a number of miRNAs that exist after death and found their possibility as a useful tool to as a biomarker to determine the cause of death. Unfortunately, this study revealed that it was prohibitively difficult to analyze the total RNA including miRNAs using the LC/MS/MS directly. We performed comprehensive microarray analysis of rat miRNAs after their death.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：microRNA (miRNA), ラット, 液体クロマトグラフ質量分析, 死後経過時間

1. 研究開始当初の背景

法医実務において、一見軽微な外傷、もしくはストレスを受けた後に死亡し、直接死因として急性循環不全と診断せざるをえないケースが見られることがある。この際に問題となるのは、外傷またはストレスと死の因果関係である。そのような場合しばしば持ち出

されるのが「死亡前に受けた外的ストレスが、交感神経系や視床下部-下垂体-副腎系といったストレス反応系に異常をきたし、血圧上昇や不整脈を介し、突然死に至る。元々の心臓疾患があれば、そのストレスに対し、より脆弱となる」という説明である。しかし、このような考え方は臨床的な知見に基づく推

測でしかなく、少なくとも剖検上はその根拠を示すことはできない。また、損傷だけではなく、最近社会問題となっている老人や小児ネグレクトで経験するように、脱水やタンパク欠乏性低栄養という慢性ストレスについても同様である。そこで、これらの外的ストレスを定量的に示すために高橋は実験動物に種々のストレスを与え、副腎におけるカテコラミン合成酵素の messenger RNA(mRNA)をバイオマーカーとして定量しようと試みた。その結果、外傷損傷については死後比較的早期であれば有用であると報告している(Takahashi S. Tohoku J Exp Med 2008; 216: 239-48)。この死後比較的早期であればという部分が重要であり、mRNAを指標とする限り、死後経過時間が進むにつれ RNAase 等による分解が進み、マーカーとしての意味を失ってしまうことを避けることはできない。そこで我々は最近注目されている micro RNA(miRNA)に着目した。

miRNA はタンパク質をコードしない、いわゆる non-coding RNA の一種であり、その鎖長はわずか18-25塩基と短く、一本鎖の small RNA である。これらは真核生物に広く存在し、自分自身と塩基配列相補性を持つ mRNA を標的としてその分解を導くか、あるいは翻訳を制御することで発生のタイミング、形態形成、アポトーシス、細胞増殖、生殖機能など非常に重要な生物学的機能を制御していることが明らかになっている。また、ガンを含めた各種疾患との関連性も強く指摘されている。

しかしながら、法医学的な miRNA の研究は始まったばかりであり、論文報告も極めてわずかである。その中で、E Hanson らは、血液、唾液、精液など各種ヒト体液痕を作製後、それぞれの痕に特異的な発現をしている miRNA を検索し、体液の同定を試みている。結論として9種の miRNA により同定が可能であり、法医実務に有用であると報告している(EK Hanson et al. Anal Biochemistry 2009; 387: 303-314)。これは、しばらく時間が経過しても miRNA 量が保存されていることを意味しており、我々が目指す、死後時間のある程度経た試料の miRNA 解析の可能性を示すものであるといえる。そこで、実験動物を用いて、死後時間を経ても保存される miRNA の検索を質量分析装置(LC/MS/MS)を用いて行い、有用な miRNA を見出す。その後、法医学的なストレスに対する実験系を組み、交感神経系などの反応系との定量関係をリアルタイム PCR 法等で明らかにし、法医実務に応用しようと考えたのが、着想に至った経緯である。

2. 研究の目的

不整脈、興奮性せん妄などの病態は、死因となりえるにもかかわらず、形態的にはそのエビデンスが表れにくい特徴を持つ。このよ

うな病態を定量的に示すバイオマーカーとして micro RNA(miRNA)に着目した。まず、実験動物を用いた死後変化に強い miRNA の発見が第一の目標となる。これにはナノレベルの液体クロマトグラフとイオントラップ型質量分析装置を組み合わせた LC/MS/MS を用いて網羅的に探索を行う。死後経過時間に強く、また臓器特異的な発現を見せている miRNA 群を確立した後、法医学的なストレス刺激を与えた実験動物の交感神経系や視床下部-下垂体-副腎系といったストレス反応系の miRNA 発現量の変化を測定・解析する。この際、突然死との関連の深いストレス反応系として交感神経-副腎髄質系(sympathoadrenal system)、具体的にはカテコラミン合成酵素関連の miRNA を対象に考えている。また、実験的な法医学特有のストレスとして、外傷損傷・電撃症や熱傷・運動後の拘束による急性ストレス、脱水・栄養制限による慢性ストレスを計画している。これらストレスと関連の高い miRNA マーカー群を、時にはリアルタイム PCR 法も併用しながら確立し、実務への応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) 死後変化に伴う microRNA(miRNA)の経時的挙動

最終的な目的は死後ラットの生体試料から抽出された RNA すべて、いわゆる totalRNA をナノレベルの液体クロマトグラフとイオントラップ型質量分析装置を組み合わせた LC/MS/MS を用いて網羅的に探索を行うことである。しかし、死後も残存する miRNA がどのようなものなのか、予備情報が乏しいため、まずは基礎的な実験として、ある特定のラット miRNA が死後経過時間とともに、どのような挙動を示すのかを検討した。すなわち、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、すい臓の各臓器において既に強発現が報告されている6種のマーカー、let-7a, miR-16, miR-26a, miR-1, let-7b, miR-122 である。

生後約10週のSDラット8匹(平均重量426g)を用い、セボフルラン吸入にて安楽死させた後、一定時間後に実質臓器を摘出し試料とした。すなわち、安楽死から臓器摘出までの時間により、死亡直後(0h)・6時間後(6h)・12時間後(12h)・24時間後(24h)の2匹ずつ4群に分け、胸腺・心臓・肝臓・腎臓・脾臓・膵臓、各100mgをそれぞれ摘出した。ホモジナイズ後、mirVava™ miRNA Isolation Kit (Ambion)を用いて miRNA を抽出した。miRNA は塩基長が短いため、ループ構造を有するターゲット特異的な miRNA 専用プライマーを用いて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。その結果 miRNA は TaqMan 法に適応可能な塩基長を獲得することになる(図1)。その後、StepOnePlus™ (Applied Biosystems)を用いて、

ターゲット特異的なプローブによる miRNA 発現量の比較解析を行った。

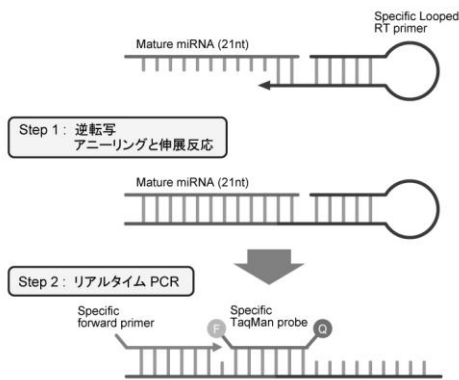


図 1. miRNA の逆転写と TaqMan 反応の模式図

蛍光強度の閾値を超えた PCR サイクル数 (Ct 値) を基準とする $\Delta\Delta Ct$ 法による解析であり 2), さらに解析ソフト DataAssist v2.0 (Applied Biosystems) による各ターゲット miRNA とそれぞれの試料における死後経過時間との相関解析を行った。

ターゲットとした miRNA は各臓器特異的に強発現していると報告されたものの中から選択した。すなわち, let-7a は各臓器全体的に一定レベル 3) で, miR-16 は腎臓 4) で, miR-26a は肺 5), miR-1 は心臓 6), let-7b 膵臓 7), そして miR-122 は肝臓 8) でそれぞれ強発現であるとされている 6 種である。また, 内部標準として snoRNA (ラット専用), および U6 snRNA (ヒト・マウス・ラット共通) を用いた。

(2) 死後変化に伴う miRNA の網羅的解析

ラットの死後も miRNA が残存していることが確認できたならば, 問題となるのは, どの種類の miRNA がどの程度残っているかである。死の直前の生体状況を反映している miRNA が見出されれば最高の結果となるが, そうでなくても死後経過時間等に法医実務応用へは可能である。基礎的な実験データがないため, 網羅的な miRNA を検索するために, 液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC/MS/MS) を用いることを考えた。ナノレベルの液体クロマトグラフ (SHIMADU) で分離した後, 四重極を有する質量分析装置 (3200 QTRAP® LC/MS/MS システム, ABSCIEX) を用いて一度に網羅的検索を行う予定であった。しかしながら, 全ての RNA を含む totalRNA での予備実験の段階で, 液体クロマトグラフによる分離は, ある程度は可能であったが,

miRNA は RNA の中では比較的分子量も小さく, その後の質量分析装置でもスペクトルが非常に複雑に入り乱れ, 網羅的な解析は不可能であった。そこで, 質量分析ではなく, マイクロアレイを用いて網羅的に検索を行う方向へと転換せざるを得なかった。

生後約 10W の SD ラット 6 匹を用いて, セボフルラン吸入にて安楽死させた後, 2 匹ずつ, 死後 24 時間後, 48 時間後, 72 時間後の 3 群に分け, それぞれから肝臓 100mg を採取し試料とした。ホモジナイズ後, mirVava™ miRNA Isolation Kit (Ambion) により totalRNA を抽出し, miRNA Complete Labeling and Hyb Kit (Agilent) にて Cy3 で標識した。その後, 350 種の miRNA プローブを持つ Agilent 社製マイクロアレイにハイブリさせ, DNA MicroArray Scanner (Agilent) にて蛍光データを収集, データ解析を行った (図 2)。

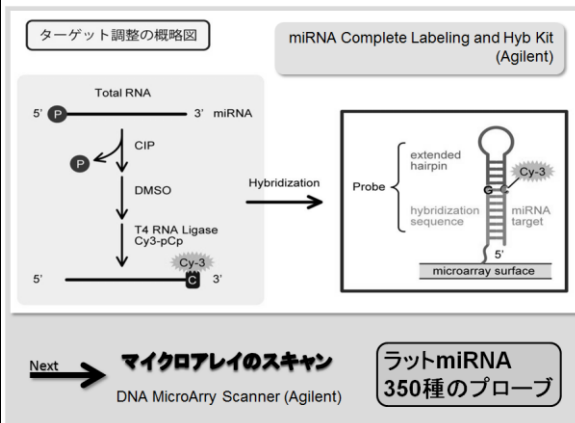


図 2. マイクロアレイによる miRNA の解析

(3) 液体クロマトグラフ質量分析装置による miRNA 解析

微量でしかも鎖長の短い miRNA の解析方法としては, リアルタイム PCR 法やマイクロアレイ法などが一般的ではあるが, いずれの手法にしても cDNA への変換や蛍光標識による増感などの間接的な測定手法に頼るものであり, リンカーライゲーションの効率や, PCR 増幅による cDNA へのバイアスなどにより定量性に欠ける恐れがあることが指摘されている。また, それら反応の手間と時間も考慮する必要がある。しかしながら, キャピラリー LC と MS を組み合わせた方法では, 血液, および組織等から調整した miRNA を直接解析することが可能となり, 解析時間や精度の問題を一気に解決することができるはずであった。しかし, 前述したとおり, あまりにもスペクトルが煩雑となり, RNA の同定が困難となった。全ての RNA を一度に帰属させ投与したことが原因である。そこで, 今後のた

めに、基礎的実験として人工的に合成した miRNA を個別に測定することで、どのようなデータが出るのかを確認した。

合成した miRNA は miR-1, miR-16, miR-122 の 3 種であり、使用した量分析装置は 3200 QTRAP® LC/MS/MS システム (ABSCIEX) である。試料は 50% の MeOH 水溶液で濃度 5pmol/μl に調整し、10 μl/min のインフュージョン測定を行った。分析モードは Q1 ネガティブモードで行い、質量範囲は 100~1200Da の範囲である。

4. 研究成果

(1) 死後変化に伴う microRNA(miRNA) の経時的挙動

2 種の内在性コントロールを測定したところ、全ての試料において安定した高い残存量を示したことから U6 snRNA を内在性コントロールとし、各試料の miRNA 残存量を比較した。まず、死亡直後(0h)の各臓器試料において、miR-1 の残存量を 1 とし各ターゲット miRNA の残存量を測定・比較したところ、胸腺、脾臓、腎臓、肺ではいずれも miR-16 の残存量が突出しており、他の miRNA マーカーの数十倍~千倍の高い値を示していた。一方、心臓では miR-1, 肝臓では miR-122 の残存量が際立っており、この 2 種では生前の試料を用いた報告と同じように臓器特異的な結果を示していた。さらにいずれの試料においても、死亡 6 時間後(6h), 死後 12 時間後(12h), そして死後 24 時間後(24h) でも同様な結果を示した。つまり、死亡直後から 24 時間後まで、各臓器における残存 miRNA は、miR-1 との比較で見たとおり、いずれの時間においても同じような残存比を示すことが確認された。しかし、見掛け上同じ残存量を示したとしても、これらは絶対量ではないため、一概には死後変化の影響を受けずによく保存されているとは言えない。それを確認するには絶対定量を行わなければならない。単に比較解析したところ、どの時間帯でも同じ様な比で存在しているという意味でしかないのである。

次に肝臓における各ターゲット miRNA の死後時間経過による残存量の変化に注目したところ、6 種類の全てにおいて死後経過時間が進むにつれて残存量が増加している結果となった。死後新たに miRNA が産生されるはずはないため、データを精査し直したところ、内部標準として用いた U6 snRNA マーカーが他のマーカーに比べて早く分解していることが判明した。U6 snRNA は 24 時間で約 1/8 程度に残存量が減少するが、各ターゲット miRNA の残存量はそれほど減少しないため、見掛け上残存量が増加しているように見えたのである。U6 snRNA は成体試料ではよく用

いられる内部標準であるが、miRNA に比べて塩基長が長いために早く分解するのではないかと推察され、死後の解析には内部標準として適当でないことが明らかとなった。そこで、新たに内部標準を設定し直し、比較解析した結果の一部、心臓と肝臓の結果を図 3, 4 に示す。心臓では miR-1 が、肝臓では miR-122 が目立った残存量を示し、これらマーカーの臓器特異性は死後 24 時間においても保たれていることが明らかとなった。ピアソンの積率相関関係およびユークリッド距離による相関関係を見ると、色が濃い部分がより強い相関を示しており、上の部分の棒グラフと同様な結果を示した。他の臓器は全て同じような結果となり、いかなる miRNA を内部標準としようとも、miR-16 が他のマーカーに比べて際立った残存量を示した。

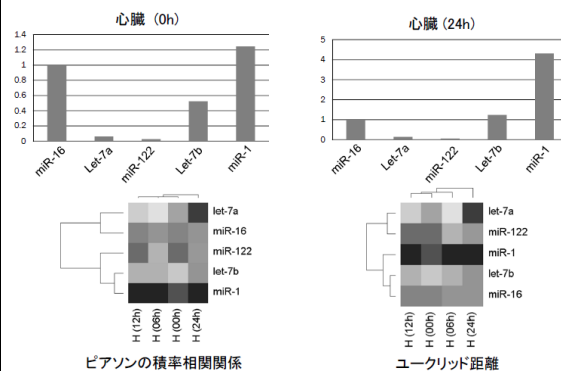


図 3. 心臓における各マーカーと miR-16 との比較量、および相関関係 (内部標準: miR-26a)

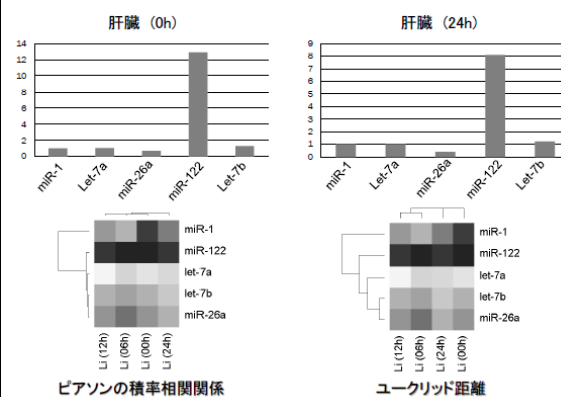


図 4. 肝臓における各マーカーと miR-1 との比較量および相関関係 (内部標準: miR-16)

今回の研究はラットの死後、生体試料において臓器特異的に強発現している miRNA マーカーがどの程度残存しているかを観察したものである。結果として死後 24 時間を経過してもそれらは確実に検出されることから、法医学実務においても有用な新しいバイオ

マーカーと成り得る可能性があると考えられる。例えば、分解する速度が適当な miRNA を用いれば、死後経過時間の推定に使えるであろう。しかしそのためには絶対定量が必要になる。まず、適当なマーカーを決定し、検量線による絶対定量を試み、検証する必要がある。また、別なマーカーによれば解剖時に肉眼では評価が難しい外的ストレスの定量化が可能となるかもしれない。

(2) 死後変化に伴う miRNA の網羅的解析

ラットの死後 24, 48, 72 時間後にそれぞれ臓器を摘出して totalRNA を抽出したが、特に 24 時肝臓、および 72 時間後試料の電気泳動結果は RNA の分解を示唆していた(図 5)。通常の検査ではこの段階で不適合となるが、死後の miRNA についての基礎データが皆無であるため、そのまま実験を進めたところ、最終的にはマイクロアレイによる miRNA 解析は可能であった。

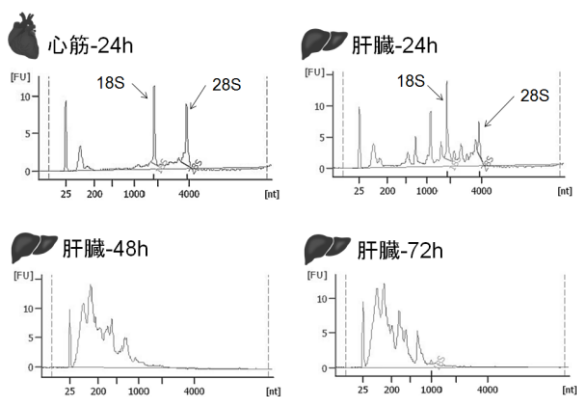


図 5.電気泳動による totalRNA の確認

非階層的クラスタリングである K-Means 法を用いて、肝臓の 350 種の miRNA を経時的にかつ網羅的に検索したところ、6 つのクラスターに分類することができ(図 6)、さらにそれらは大きく 4 つのグループに分けることができた。

グループ 1 : クラスタ 3, 4 および 5

検査した 350 種の miRNA のうち、約 8 割を占める 278 種は、死後 24 時間以降、検出限界以下のものであった。

グループ 2 : クラスタ 4

他の miRNA のうち 45 種は 24~72 時間まで良好に保存されており、死因と病態の関連を判断するにはこれらの中からマーカーを選択することになる。

グループ 3 : クラスタ 2

さらに、8 種の miRNA は死後徐々にその

量が減少し、24 時間までは保存されているが、48 時間以降は検出できなくなるものであり、これらは死後経過時間の推定には利用可能であると思われた。

グループ 4 : クラスタ 1

残りの 19 種は 24~48 時間でその量を増やし、そのまま 72 時間まで量を維持しているマーカー群である。これらに関してはリアルタイム PCR での精査が必要であると思われた。

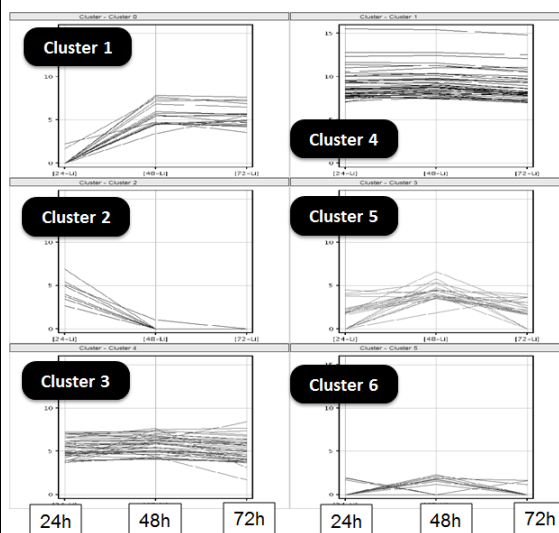


図 6. K-Means 法による死後残存 miRNA 350 種の分類(横軸が死後経過時間、縦軸が蛍光強度を示す)

グループ 4 (クラスタ 1) の 19 種の miRNA に対し、Target Scan による制御対象メッセンジャー RNA (mRNA) の予測を行ったところ、2,432 の mRNA がリストアップされた。これは単に配列通しのマッチアップであり、外的ストレスをかけた後の試料による追加実験、およびリアルタイムによる精査が望まれる。

(3) 液体クロマトグラフ質量分析装置による miRNA 解析

人工的に合成した miRNA のクロマトグラムを図 7 に示す。精製された miRNA, 1 種類ずつの解析であるが、それぞれの配列等を帰属することができた。生体試料から目的となる miRNA を正確に分離する工程、技術を確定できれば、質量分析装置を用いての解析が可能となる。その場合逆転写、PCR 等の反応を経ない正確な miRNA の測定ができるであろう。

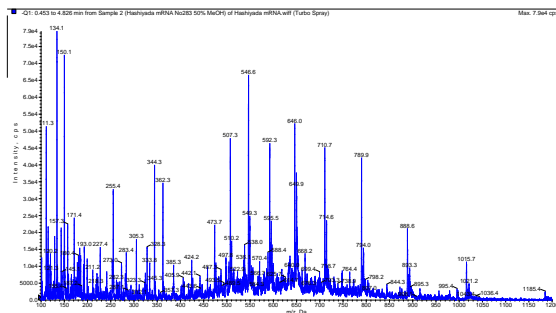
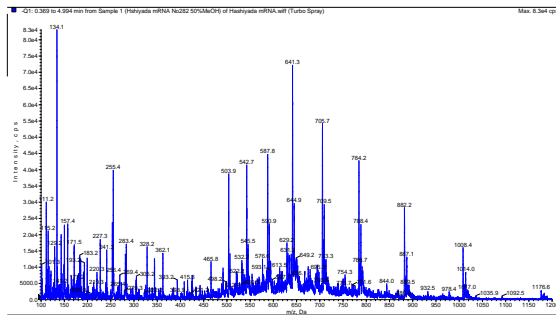
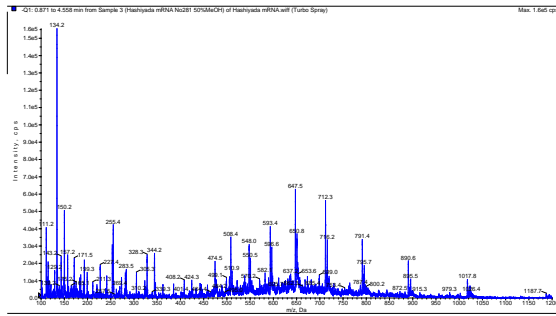


図 7. 質量分析による miRNA のスペクトル(上から miR-1, miR-16, miR-122)

これまでの研究で、死後 72 時間を経過しても miRNA が検出可能なレベルで残存していることが確認された。次は生前の、すなわち死後直前の生体状況を反映する miRNA の検索である。ストレスをかけた動物実験などを経て、最終的には法医解剖において、死因の決定に苦慮する際の一助となるための生体マーカーを発見したい。

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 2 件)

- ① Hashiyada M, Usui K, Hayashizaki Y, Sakai J, Funayama M. Postmortem behavior of rat microRNA (miRNA) as determined by comprehensive microarray analysis. Forensic Sci Int: Genetics Suppl 査読有 2011; 3: e210-211.

doi:10.1016/j.fsigs.2011.08.105

- ② 橋谷田真樹, 白井聖尊, 大久保倫一, 林崎義映, 境 純, 舟山真人. 死後変化に伴う microRNA (miRNA) の経時的挙動. DNA 多型 ISBN:978-4-86459-119-5 査読有 2011: vol.19; p259-262.

<http://www.toyoshoten.co.jp/book/b107121.html>

[学会発表] (計 3 件)

- ① 橋谷田真樹, 白井聖尊, 大久保倫一, 林崎義映, 境 純, 舟山真人. 死後変化に伴う microRNA (miRNA) の経時的挙動. 日本 DNA 多型学会第 19 次全国学術集会. 2011 年 11 月 18 日~19 日. 三島.
- ② Masaki Hashiyada, Kiyotaka Usui, Yoshie Hayashizaki, Jun Sakai, Masato Funayama. Postmortem behaviour of rat microRNA (miRNA) as determined by comprehensive microarray analysis. 24th World Congress of the International Society for Forensic Genetics. 2011 Aug.29-Sep.3. Vienna, Austria.
- ③ 橋谷田真樹, 白井聖尊, 大久保倫一, 林崎義映, 境 純, 舟山真人. 死後変化に伴う microRNA (miRNA) の網羅的解析. 第 95 次日本法医学会学術全国集会. 2011 年 6 月 15 日~17 日. 福島.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋谷田 真樹 (HASHIYADA MASAKI)

東北大学・大学院医学系研究科・技術専門員

研究者番号: 40374938

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし