

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月5日現在

機関番号：33101
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011年度～2012年度
課題番号：23650618
研究課題名（和文）tRNase ZLのsgRNAとなる新規RNAの探索とそのがん病態との関係の解析
研究課題名（英文）Search for novel RNAs that can be sgRNAs for tRNase ZL and analysis of their involvement in cancers
研究代表者 梨本 正之（新潟薬科大学・応用生命科学部・教授）
研究者番号：30228069

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、tRNase ZLのsgRNAとなる新たな細胞内および血漿中のRNAを探索し、そのRNAががん病態とどのような関係にあるかを解析することである。健常人および骨髄腫患者の末梢血単核細胞由来の5から35塩基のRNA種の存在頻度の解析から、骨髄腫患者のRNA試料に有意に高頻度、あるいは低頻度で存在するsgRNAとなりうるRNA種を多数発見した。これらのRNA種は形質細胞のがん化機構に何かしら関係しているのかもしれない。

研究成果の概要（英文）：The aim of this research is to search for novel cellular and plasma RNAs that can be sgRNAs for tRNase ZL and to analyze their involvement in cancers. I examined relative amounts of 5–35-nt RNA species extracted from peripheral blood mononuclear cells of three healthy persons and three multiple myeloma patients, and found that many RNA species that can be sgRNAs exist significantly more or less abundantly in the RNA samples from the myeloma patients. These RNA species may be involved in malignant transformation of plasma cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：腫瘍マーカー、血漿RNA、多発性骨髄腫、sgRNA、tRNase ZL、血液がん、機能性RNA

1. 研究開始当初の背景

1989年に、我々は、哺乳動物細胞のサイトゾル抽出物中に、RNase 65と名付けた4塩基認識RNA切断酵素を発見した。これは、tRNA前駆体切断酵素tRNase Zの長いタイプであるtRNase ZLと3'末端が欠失したtRNAとのRNP複合体であった。RNase 65の発見に刺激され、我々は、tRNase ZLの多機能性を研究し続け、この酵素がtRNA前駆体やmicro tRNA前駆体に類似したRNA複合体を認識し切断することを示した。さらに、この酵素の性質を利用して、7–30-ntのsmall guide RNA (sgRNA)を用いて*in vitro*であらゆるRNAを任意の部位で

特異的に切断する方法を開発した。この方法は細胞内での遺伝子発現抑制に使われ、TRUE gene silencing (tRNase ZL-utilizing efficacious gene silencing)法と呼ばれている。sgRNAは、5'-half-tRNA、~12–16-nt linear RNA、RNA heptamerおよびhook RNAの4種類に分類される。

最近、我々は、ヒトtRNase ZLが核内だけでなく細胞質も含めて細胞内に遍く存在していることを示し、tRNA前駆体成熟化とは異なるtRNase ZLの新たな生理学的機能を発見した。TRUE silencingのために人工的にデザインされたsgRNAである5'-half-tRNAが、実は細胞

内にも存在しており、サイトゾルtRNase ZLと共に、PPM1F mRNAなどの発現を抑制制御していたのである。ヒト細胞サイトゾル中には、5'-half-tRNAの他にも短いRNAが多数存在することも示され、そのひとつの28S rRNA断片もhook型sgRNAとして細胞内で機能することが示された。さらに、何割かのmiRNAもhook型構造をとりうる事が判明し、実際にmiR-103が細胞内においてhook型sgRNAとして機能することも示された。これらの結果は、まだ発見されていない短いnon-coding RNA(ncRNA)も含めてさまざまなタイプのncRNAをsgRNAとして、ヒトサイトゾルtRNase ZLが遺伝子発現制御を行っていることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、tRNase ZLのsgRNAとなる新たな細胞内および血漿中のRNAを探索し、そのRNAががん病態とどのような関係にあるかを解析することを目的とする。具体的には、さまざまなヒトがん細胞株および新たに得られたがん患者由来のさまざまながん細胞を用いて、細胞内のtRNase ZLのsgRNAとなりうる新たなRNAを探索する。この新たに見つかったRNAの種類や発現量を解析し、がんの種類との関係やがん患者の予後との関係を分析する。また、同様の解析を正常人とがん患者由来の血漿中のRNAに関して行う。

tRNase ZLは、apoptosisやp53シグナル経路に関係しているだけでなく、前立腺がん関連遺伝子産物でもある。細胞内sgRNAの解析により、がん化機構の新たな側面が見えてくることが期待される。

米国のニクソン大統領が「がん征圧戦争」を宣言してから40年以上経過しているが、残念ながら世界的にもがん患者の死亡率はあまり減少していない。がんの早期発見方法の革新は、この状況を打破するためのひとつの有効な手段であると考えられる。本研究の成果として発見されることが期待される新たな血漿RNAは、より感度の高い腫瘍マーカーとして、がんの早期発見に大きく貢献するかもしれない。

3. 研究の方法

(1) ヒト細胞内新規sgRNAの探索

ヒト正常細胞およびヒトがん細胞株または新たに得られたがん患者由来のがん細胞を用いて、細胞内のtRNase ZLのsgRNAとなりうる新たなRNAを探索する。この新たに見つかったRNAの種類や発現量を解析し、がんの種類との関係を分析する。具体的には、以下のように実験を行った。

① 2種類ヒト正常細胞株 (HEK293、

- IMR90) および 8 種類のヒトがん細胞株 (HL60, RPMI-8226, KMM-1, Jurkat, Huh7, A549, HepG2, HeLa) より ISOGEN 法を用いて全 RNA を抽出した。また、米国 ALLCELLS 社から購入した 3 人の健常人と 3 人の多発性骨髄腫患者の末梢血単核細胞由来の全 RNA も以下の実験に用いた。
- ② 5'アダプターと 3'アダプターを結合後 RT-PCR 法により RNA を増幅し cDNA を得た。アダプターには 6 種類のバーコード配列が付加されているものを用いた。
 - ③ 5-35-nt の RNA に相当する cDNA 画分をアガロースゲル電気泳動法により精製した。
 - ④ この cDNA 試料を Illumina 社の HiSeq 2000 (5 レーン使用) を用いて大量配列決定を行った。
 - ⑤ これらの情報を使って RNA の種類や発現量を解析した。

(2) ヒト血漿中新規sgRNAの探索

上と同様の解析を、米国 ALLCELLS 社から購入した 3 人の健常人と 3 人の多発性骨髄腫患者由来の血漿中の RNA に関して行った。これらの塩基配列情報を基に、骨髄腫特異的な血漿中 RNA 腫瘍マーカーとしての sgRNA の探索を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト細胞株における RNA の種類および発現量の解析

tRNase ZL の sgRNA となりうる 5-35-nt の RNA 種の相対的存在量の分布図から、ヒト正常細胞株 (HEK293, IMR90) およびヒトがん細胞株 (HL60, RPMI-8226, KMM-1, Jurkat, Huh7, A549, HepG2, HeLa) において、それぞれの細胞株に特有の 5-35-nt RNA 種の存在パターンがあることが見出された (図 1)。

これらの RNA 種は、22, 23-nt の成熟 miRNA の他に、mRNA、tRNA、rRNA、snoRNA などの分解物からなる RNA degradome により構成されていた。これらの RNA の部分集合は、5'-half-tRNA 型、linear 型、hook 型、あるいは heptamer 型の tRNase ZL ガイド用 sgRNA として機能しうるものだった。

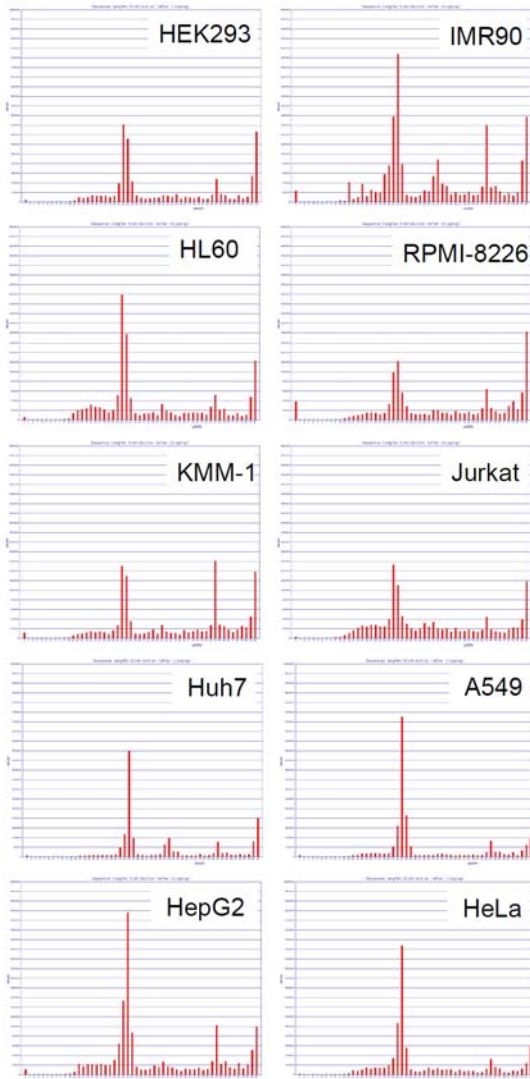


図1 ヒト細胞株由来RNAの分布

(2) ヒト末梢血単核細胞における RNA の種類および発現量の解析

3人の健常人と3人の多発性骨髄腫患者の末梢血単核細胞に由来するRNAについても、(1)と同様にsgRNAとなりうる5-35-ntのRNA種の相対的存在量の分布図を作成した(図2)。それぞれのヒト培養細胞株において特徴的な分布パターンがあったのと同じように、個人個人に特有の5-35-nt RNA種の存在パターンがあることが見出された。

これらのRNA種も、成熟miRNAの他に、mRNA、tRNA、rRNA、snoRNAなどの分解物からなるRNA degradomeにより構成されていた。同様に、これらのRNAの部分集合も、tRNase ZLのsgRNAとして機能しうるものだった。

また、(4)に詳述されているように、骨髄腫患者のRNAに有意に高頻度、あるいは低頻度で存在するsgRNAとなりうるRNA種

を多数見出された。



図2 末梢血単核細胞RNAの分布

(3) ヒト血漿中の RNA の種類および存在量の解析

3人の健常人の血漿に由来するRNAに関して、(1)と同様に5-35-ntのRNA種の相対的存在量の分布図を作成した(図3)。ここでも、(1)、(2)の結果と同様に、個人個人に特有の5-35-nt RNA種の分布パターンがあることが示された。

これらのRNA種も、成熟miRNAの他に、mRNA、tRNA、rRNA、snoRNAなどの分解物からなるRNA degradomeにより構成されていた。同様に、これらのRNAの部分集合も、tRNase ZLのsgRNAとして機能しうるものだった。

3人の多発性骨髄腫患者の血漿に由来するRNAに関して同様の解析を試みたが、入手可能な血漿量が不十分であったために、5-35-ntのRNA種のリード数が少なく、信頼できる解析はできなかった。しかしながら、血漿RNA種のあるものは骨髄腫マーカーとして使える可能性があることが示唆された。

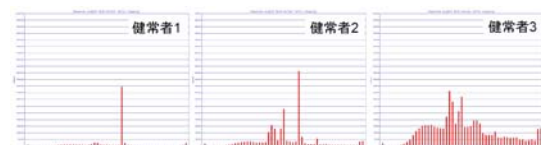
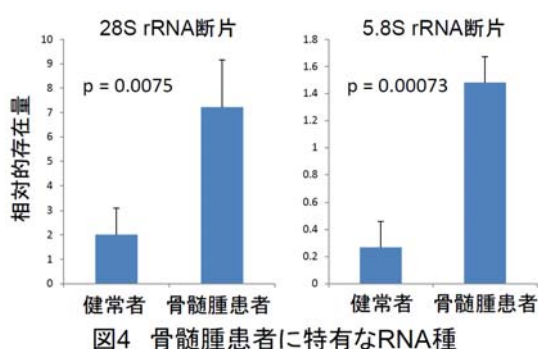


図3 血漿RNAの分布

(4) 骨髄腫患者の末梢血単核細胞に特有な RNA 種

3 人の健常人および 3 人の骨髄腫患者の末梢血単核細胞由来の 5-35-nt RNA 種の存在頻度の詳細な解析から、骨髄腫患者の RNA に統計的に有意に高頻度、あるいは低頻度で存在する tRNase ZL の sgRNA となりうる RNA 種を多数発見した。具体例として、14-nt linear 型 sgRNA となりうる 5.8S rRNA および 28S rRNA 由来の RNA 断片についての結果を図 4 に示す。これらの RNA 種は形質細胞のがん化機構に何かしら関係しているのかもしれない。



(5) 研究のインパクト

血漿中に多数の tRNase ZL の sgRNA として機能しうる RNA が存在しているという観察事実、tRNase ZL と sgRNA からなる遺伝子発現制御網が細胞内だけでなく、細胞間にも張り巡らされており、細胞間の情報伝達を行っているという新たな現象の存在を示唆している。

また、本研究で発見された、骨髄腫患者の末梢血単核細胞 RNA に統計的に有意に高頻度、あるいは低頻度で存在する sgRNA となりうる RNA 種は、骨髄腫の新たな診断マーカーとして使えるかもしれない。

本研究の成果は、現在、論文投稿の準備中である。

(6) 今後の展望

形質細胞のがんである多発性骨髄腫は monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) と呼ばれる前がん状態から年間 1% 程の確率でがん状態に移行するが、今後の研究において、早期治療の判断材料の 1 つになるような MGUS 特異的な血漿 sgRNA マーカーを見出す計画である。

骨髄腫以外のがんについても、新たな血漿 sgRNA 診断マーカーの探索を行っていく予定である。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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

梨本 正之 (NASHIMOTO MASAYUKI)

新潟薬科大学・応用生命科学部・教授

研究者番号：30228069

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし