

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32643

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650222

研究課題名(和文)パーキンソン病脳切片標本におけるドパミン神経細胞microRNAの網羅的発現解析

研究課題名(英文)MicroRNA microarray analysis of dopaminergic neurons from FFPE brain sections of patients with Parkinson's disease

研究代表者

内海 計(Kikuchi-Utsumi, Kazue)

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：90271759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、パーキンソン病患者由来ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織切片におけるドパミン神経細胞に特異的なmiRNAの網羅的発現解析法の確立にある。予備実験としてラットFFPE標本を用い免疫組織化学的に標識したドパミン細胞をレーザーマイクロダイセクション法で回収し本解析法の可能性について検討した。その結果、ホルマリン固定により剪断化されているRNA分子は免疫染色を施すことにより一層の品質低下を招き、網羅的発現解析が困難な状況にある。現在、FFPE切片由来RNA分子の品質向上に向けた免疫組織化学染色法の確立に向け研究を継続している。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to establish miRNA microarray analysis of the dopaminergic neurons that is laser-micro dissected specimens from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue sections of patients with Parkinson's disease. A preliminary experiment using the rat FFPE sections was revealed that the RNA integrity of formalin-fixed dopaminergic neurons is exacerbated by the adoption of the protocol for immunohistochemistry. This poor RNA integrity makes it more difficult to perform miRNA microarray analysis. To improve the RNA integrity, immunohistochemistry protocols may require further modifications.

研究分野：神経科学

 キーワード：レーザーマイクロダイセクション ホルマリン固定パラフィン包埋標本 microRNA ドパミン神経細胞  
パーキンソン病

## 1. 研究開始当初の背景

低分子 non-coding RNA の一種である microRNA (miRNA) は、遺伝子発現の新たな制御因子であり、miRNA の発現変化と疾患の関連性が注目されている (Kloosterman WP and Plasterk RH, Dev Cell, 2006)。パーキンソン病と miRNA の機能連関を特定する鍵は、この疾患の責任細胞である中脳黒質ドパミン神経細胞に特異的に作用する miRNA 機能分子の探索にある。この疾患と miRNA の関連を患者の脳標本で調べた研究がすでに海外において散見されるが、いずれの報告も上述の視点を欠きドパミン細胞に特異的な miRNA の機能分子は特定されていない。

病理組織学的検査の主役であるホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片標本は、形態保持および保存性に優れることから、後ろ向き研究における有効活用が望まれている。しかし、ホルマリンによる組織固定は核酸の化学修飾や核酸分子の切断化を惹起するという通念より FFPE 標本を活用しての核酸解析研究は進展しなかった。特にレーザーマイクロダイセクションで得られる FFPE 切片標本由来の少量検体の利用は核酸解析研究に不向きとされ、事実、脳切片への適用については否定的見解が述べられている (Su JM et al., Brain Pathol., 2004)。しかし申請者はこの課題の克服が可能と考えている。その根拠として、ホルマリン固定により完全長 RNA は最小で 100 塩基程の分子に切断化されるが、miRNA 自体は 20 塩基程の小分子ゆえホルマリンによる切断化の弊害は僅少であり、miRNA 検出の大きな障壁にはならないと推測される。申請者は現在、脳のホルマリン固定パラフィン包埋切片標本からレーザーマイクロダイセクション法で回収した単一標的

細胞を用いて神経変性抑制因子の発現を解析している。この手法の利点は、顕微鏡下で捉えた標的細胞のみをダイオードレーザーメスでシャープに切り出し、重力落下回収できる点にある。従ってこの技術の応用は、パーキンソン病の責任細胞に特異な miRNA の遺伝子発現の特徴を捉えることの出来る有用な解析法を提供するものと期待される。

## 2. 研究の目的

microRNA (miRNA) は、発生・分化・増殖など様々な生命現象に関わっており、その発現変化と疾患の関連性が注目されている。本研究はパーキンソン病関連 miRNA 分子の探索を目的とし、パーキンソン病の責任細胞であるドパミン神経細胞の miRNA 発現変動を網羅的に解析しこの疾患と miRNA の機能連関を解明する点にある。特筆すべきは、これまで蓄積されているパーキンソン病患者由来脳ホルマリン固定パラフィン包埋切片標本を研究材料とし、患者由来標本のドパミン神経細胞をレーザーマイクロダイセクション法で回収し、miRNA の網羅的発現解析を行う点にある。

## 3. 研究の方法

初年度はラットの FFPE 切片標本を用い本解析法の最適化に向けての条件検討を行う。ラット (8 週令、オス) を用い、脳 FFPE 切片標本作製する。ラットを 4% パラホルムアルデヒドで灌流固定したのち脳を摘出し、パラフィン包埋して 4  $\mu$ m の組織切片を作製する。

中脳黒質ドパミン神経細胞の同定は、チロシン水酸化酵素 (TH) およびドパミントランスポーター (DAT) の免疫組織化学染色にて

行う。

TH あるいは DAT 陽性細胞集団をレーザーマイクロダイセクション法により切り出し、引き続き microRNA の抽出を行う。

抽出された miRNA を基に、ドパミン神経細胞集団における miRNA の網羅的発現解析をマイクロアレイにて行う（委託解析）。

マイクロアレイの解析結果より、ドパミン神経細胞に特異的に発現する miRNA 分子の選定を行う。その後再度ラットの FFPE 切片標本を用い、選択候補となった miRNA 分子の局在部位を in-situ hybridization 法にて調べ、ドパミン神経細胞に特異的に発現する分子種を特定する。

初年度以降はパーキンソン病の脳 FFPE 切片標本を用い実用化に向けての条件検討を目指す。ラットの FFPE 切片標本で確立された方法をヒト由来のサンプルで試し、本方法論の適用拡大に向けて最適化を図る。また FFPE 切片標本の保存期間の違いがデータに与える影響を確認するため、その保存期間（1, 3, 5, 10 年間およびそれ以降）ごとに比較検討し本解析法の有効性について検証する。そして問題点を抽出し、実用化に向けて解析法を改変する。最終到達目標は患者の脳 FFPE 切片標本をパーキンソン病の進行度別に分類し、病態特異的な miRNA 分子の同定とその発現変動解析を実施することで本疾患の治療戦略候補としての miRNA 分子の探索を図ることにある。

#### 4 . 研究成果

本研究ではパーキンソン病の責任細胞であるドパミン神経細胞の miRNA の発現変動を

網羅的に解析し、パーキンソン病と miRNA の機能連関の解明を最終目標とし取り組んできた。ホルマリンは核酸を剪断化するので FFPE 標本由来の核酸は発現解析研究に不向きとされている。そこで患者脳病理切片の使用に先立ち、本解析法の妥当性についてラットの FFPE 切片標本で検討した。

チロシン水酸化酵素 (TH) の免疫組織化学染色にて同定された中脳黒質ドパミン神経細胞集団をレーザーマイクロダイセクション法により切り出し後に RNA 抽出を行い RT-PCR 法にて TH mRNA 増幅断片の検出を試みた。その結果、少なくとも 120 bp 以上の TH mRNA 増幅断片の検出に成功した。従って、FFPE 標本由来の RNA は剪断化されてはいるものの小分子である miRNA の網羅的発現解析に充分適用できると考えられた。そこで引き続きレーザーマイクロダイセクション法にて大量に回収したドパミン神経細胞集団由来の total RNA をもとに miRNA のマイクロアレイ解析に着手した。しかしその過程で RNA 回収量低下および RNA 品質不良等の問題に直面し、マイクロアレイ解析の進捗に大きな支障を来した。RNA 回収量の低下の原因は、マイクロダイセクション用スライドガラスの製品規格変更によるものと考えられる。この量的問題は RNA 抽出方法を改良することにより解消された。しかし一方で質的問題が生じ、改変した RNA 抽出方法が RNA の更なる剪断化を助長し著しい品質低下を惹起することが判明した。研究材料にホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 脳病理切片を利用することが本研究の目標であり、免疫組織化学的に同定したドパミン細胞に特異的な miRNA の発現解析を行うことが最大の特徴である。免疫組織化学染色を施すことは RNA 分子の脆弱

性を高める可能性が考えられるが、他の研究との差別化を図るためには免疫組織化学的に同定したドパミン細胞での miRNA の発現解析が本研究では必須である。従って、この RNA 脆弱化の問題回避に向けラット線条体 FFPE 切片標本における免疫組織染色過程と RNA 品質の関連性を検討し以下の結果を得た。

- (1) 未染色の切片由来 RNA は剪断化を生じているもののその品質は良好であった。
- (2) 組織切片の抗原賦活化処理は RNA 回収量を低下させるが品質には影響しなかった。
- (3) 組織切片上での抗原抗体反応のみ(染色過程無し)で RNA 品質が著しく低下した。
- (4) アルカリフォスファターゼ染色は RNA 品質に影響しなかったが、過酸化水素を用いる DAB 染色では RNA 品質低下が更に加速した。

以上の結果より、未染色の FFPE 切片由来の核酸分子は miRNA 解析に適合することが明らかになった。しかし、組織切片上の RNA 分子の安定性は免疫反応過程で消失してしまう。従って、FFPE 切片上における抗体特異的細胞由来の核酸抽出に関わる RNA 品質低下の問題点を解く鍵は免疫組織染色処理の改変にある。現時点までには残念ながらこの問題の解決には至らなかったが本来の研究目的達成のためには FFPE 切片上の免疫染色細胞からの安定的な RNA 回収方法の確立が必要であり、現在引き続き検討を重ねている。

## 5 . 主な発表論文等

〔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)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

内海 計(UTSUMI KAZUE)

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：90271759