

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659269

研究課題名(和文) 検査診断の新規バイオマーカーの開発を目指した血液中の低分子RNAの探索

研究課題名(英文) Search for small RNA molecules in blood as novel diagnostic biomarkers

研究代表者

高橋 由明 (Takahashi, Yoshiaki)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：60115045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、我々は検査診断の新規バイオマーカーを開発する目的で、血液中の低分子RNAの探索を行った。健常者に比較して多発性骨髄腫患者に有意に高頻度あるいは低頻度で存在するRNA種が血漿中に多数見出されたが、これらの中に骨髄腫の診断マーカーとなりうるものが存在する可能性がある。また、このRNA種の中には、ヒト培養細胞の増殖を促進したり抑制したりするものがあり、細胞間の情報伝達に使われている可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)： In this study, we searched for small RNA molecules in blood as novel diagnostic biomarkers. We found many RNA species that exist statistically more or less abundantly in plasma from multiple myeloma patients than in that from healthy persons. Some of them could become diagnostic markers for myeloma. We also showed that some of the RNA species increase or decrease growth of human cultured cells. This suggests that these RNAs may be used as signaling molecules between cells.

研究分野：医歯薬学x

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：バイオマーカー 低分子RNA 検査診断

## 1. 研究開始当初の背景

臨床検査は生体内の代謝産物、血液細胞、ミネラルやタンパク質の量的変化を調べることで疾患の種類や病態を知る手段となっている。最近ではヒトゲノムの情報を基に、遺伝子診断法や DNA マイクロアレイ法等の遺伝学や分子生物学を基盤とした新たな検査方法が開発されてきた。ヒトの遺伝子総数は約 22,000-25,000 種類、転写されるゲノムの領域は約 70% を占め、その内の 50% はタンパク質の情報をもつコード領域、残りの 50% は ncRNA (タンパク質非コード性 RNA または機能性 RNA) と呼ばれる非コード領域からなることが明らかとなった。これらの RNA 遺伝子の DNA 配列情報は、ゲノム中に 300-500 万程度存在する SNPs (1 塩基多型) と同様にプロファイルされ、DNA マイクロアレイ法として多くの病気の治療法や検査診断法として活用され始めている。

Fire らは、RNAi (RNA 干渉) に関する報告の中で以下の ncRNA のもつ 2 つの特性について述べている。1) ncRNA の発現調節の効果が経代的に持続し、しかも分子自体が安定である。2) ncRNA が形質膜を透過する。1 番目は、遺伝的疾患のバイオマーカーとして体液および血液中で安定な検査対象分子となる可能性があること。2 番目は、病気の組織や臓器から体液や血中に漏出することが想定できる。

## 2. 研究の目的

本研究の主な目的は、血液中の低分子 RNA の探索を行い、検査診断の新規バイオマーカーを開発することである。また、研究分担者の梨本 (新潟薬科大学) が開発し世界的に高い評価を得ている TRUE gene silencing 法による遺伝子治療へ応用できる血液中の RNA の単離も合わせて遂行する。

多発性骨髄腫をモデルケースとして血漿中の低分子 RNA の単離と解析を行い、患者の血漿に特異的な RNA を見出し、更にこの RNA の機能解析を行う。具体的には、健常者と骨髄腫患者それぞれ 3 名の血漿から全 RNA を単離し、5 から 40 ヌクレオチドの RNA に対応する cDNA の次世代シーケンサーによる網羅的な配列解析を行う。この中から骨髄腫患者の血漿に特異的に存在する低分子 RNA を見出す。更に、この RNA の中に TRUE gene silencing 法のための sgRNA となるものがあるかどうかを調べ、その生理学的役割についても解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) 血漿低分子 RNA の解析

3 人の多発性骨髄腫患者と 3 人の健常者の血漿 (米国 ALLCELLS 社から購入) から、市販のカラム法による RNA 抽出キットを用いて全 RNA を抽出・精製した。この RNA に

5'アダプターおよび 3'アダプターを結合し、RT-PCR により cDNA を合成・増幅させた。

5 から 40 ヌクレオチドの RNA に対応する cDNA 画分をアガロースゲル電気泳動法により精製した。この cDNA 試料を Illumin 社の次世代シーケンサー-HiSeq2000 につけ、網羅的配列決定を行った。

### (2) *in vitro* RNA 切断実験

5'-half-tRNA 型 sgRNA の構造をとりうる 31 ヌクレオチドの RNAfr31 を DNA/RNA 合成機により化学合成した。RNAfr31 と複合体を形成することで tRNA 前駆体様構造をとるモデル基質は、合成 DNA を鋳型として T7 RNA polymerase による *in vitro* 転写により合成した。ゲル精製をした後、この基質の 5'末端をフルオロセインで標識した。

化学合成 RNAfr31 の存在下で、精製された組換えヒト tRNase ZL によるモデル基質の *in vitro* 切断試験を標準条件で行った。切断生成物は、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離し、蛍光イメージャーで解析した。

### (3) ノーザンプロット解析

ヒト細胞 HEK293、HeLa、HL60、RPMI-8226 の全 RNA を ISOGEN 法により抽出した。この RNA を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動につけ、その後ニトロセルロース膜に転写した。RNAfr31 と相補的な 3'末端を DIG 標識した DNA をプローブとして化学合成した。DIG 標識プローブの検出は市販の標準的キットを用いて行った。

### (4) 生細胞数測定

MTT 法により生細胞数を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 多発性骨髄腫患者の血漿中に存在する低分子 RNA の解析

健常者と多発性骨髄腫患者のそれぞれ 3 名の血漿から低分子 RNA を精製し、cDNA 作製、PCR による増幅の後、5 から 40 ヌクレオチド RNA の次世代シーケンサーによる網羅的配列決定を行った。その結果、個人毎に特有の RNA 分布パターンが見られ、また、健常者サンプルと比較して骨髄腫患者サンプルに有意に高頻度あるいは低頻度で存在する RNA 種が多数見出された。これらの中に、多発性骨髄腫の診断マーカーとなりうるものが存在する可能性がある。

骨髄腫患者の血漿中に有意に高頻度で存在する RNA の中の 1 つに、31 ヌクレオチドの RNA 断片 (RNAfr31) があった。この RNA は、機能のよく知られていない 90 ヌクレオチド程の細胞内 RNA が切断されたものであると考えられる (図 1)。

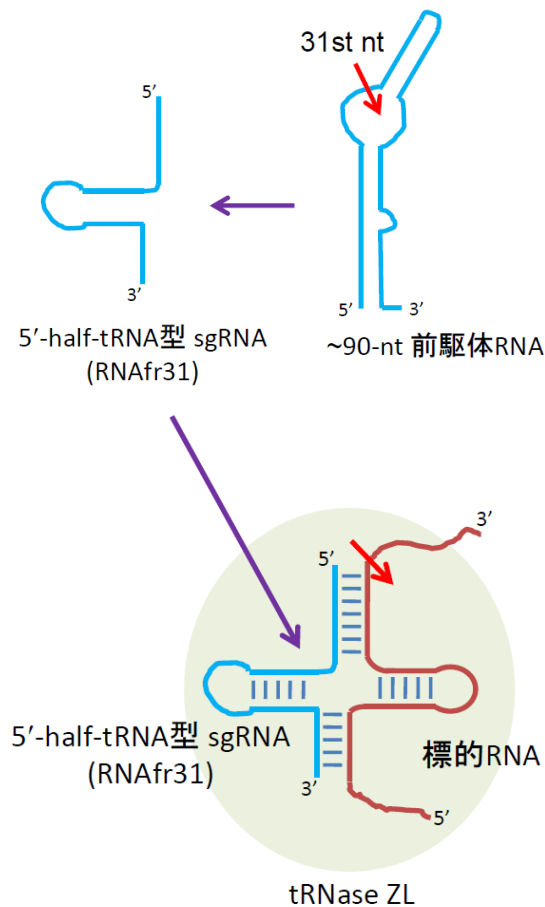


図1 RNAfr31の生成とsgRNAとしての機能

(2) 血漿中に見出された RNAfr31 は tRNase ZL の sgRNA として機能する

血漿中に見出された RNA 断片 RNAfr31 の 2 次構造を予測したところ、tRNase ZL の 5'-half-tRNA 型 sgRNA の構造をとりうる事が示された(図1)。実際に、RNAfr31 が sgRNA として機能するかどうかを調べるために、RNAfr31 とアクセプターステムに対応する 7 塩基対およびアンチコドンステムに対応する 5 塩基対により複合体を形成しうるモデル RNA 基質を T7 RNA polymerase による *in vitro* 転写により合成した。この基質の 5'末端をフルオロセイン標識した後、化学合成 RNAfr31 の存在下で、精製された組換えヒト tRNase ZL による *in vitro* 切断試験を行った。その結果、このモデル基質は予想される部位で切断されることが観察され、これにより RNAfr31 が tRNase ZL の sgRNA として機能することが示された。

(3) 血漿 RNAfr31 はヒト培養細胞の増殖を促進する

我々は、血漿中に見出された RNAfr31 が細胞内にも存在しているかどうかを調べるために、ノーザンブロット解析を行った。HEK293 細胞、子宮頸がん HeLa 細胞、白血

病 HL60 細胞および骨髄腫 RPMI-8226 細胞の全 RNA を ISOGEN 法により抽出した。プローブは、RNAfr31 と相補的な 3'末端を DIG 標識した DNA を用いた。その結果、前駆体と思われる 90 ヌクレオチド程の RNA と共に、31 ヌクレオチドの RNA 断片 RNAfr31 が、何れの細胞からの RNA サンプル中にも見出された。

また、RNAfr31 の生理学的役割を調べるために、化学合成した RNAfr31 を lipofectamine 2000 を用いてヒト培養細胞 HEK293 および A549 に導入し、3 日後に MTT 試験により生細胞数の測定を行った。その結果、どちらの細胞でも RNAfr31 による増殖促進効果が観察された(図2)。

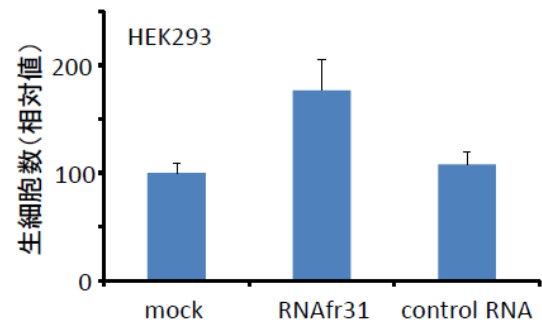


図2 RNAfr31による細胞増殖促進効果

(4) 血漿中に見出された 17 ヌクレオチドの RNA 断片 (RNAfr17) の機能解析

我々は、以前、多発性骨髄腫患者の末梢血単核細胞由来の低分子 RNA の中に、健康者単核細胞由来のものに比べて、有意に高頻度で存在する 14 ヌクレオチドの 28S rRNA 断片および 5.8S rRNA 断片を見出している。これらは、tRNase ZL の sgRNA として機能しうると考えられている。

本研究において、我々は、この 28S rRNA 断片より 3 ヌクレオチド長い 17 ヌクレオチドの 28S rRNA 断片 (RNAfr17) を骨髄腫患者の血漿中に見出した。RNAfr17 の生理学的役割を調べるために、化学合成した RNAfr17 を lipofectamine 2000 を用いてヒト培養細胞 HEK293 および A549 に導入し、3 日後に MTT 試験により生細胞数の測定を行った。その結果、何れの場合にも RNAfr17 による細胞の増殖抑制効果が観察された(図3)。

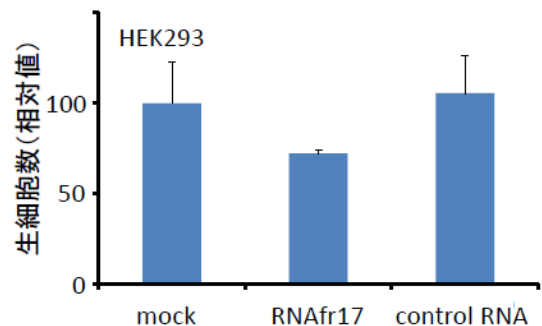


図3 RNAfr17による細胞増殖抑制効果

## (5) 研究のインパクト

多発性骨髄腫診断のための検査法は、尿検査や血液検査などで既に確立している。しかしながら、予後を正確に予想したり治療法の選択指針となるようなバイオマーカーは未だ知られていない。本研究で見出された、骨髄腫患者サンプルに有意に高頻度あるいは低頻度で存在する多数の5から40ヌクレオチドRNAの中に、そのようなバイオマーカーとして利用されうるものが含まれているかもしれない。

様々な病態の新規RNAマーカーとして、血漿中の22ヌクレオチド程のmiRNAを対象にしてなされている研究は多数ある。しかし、本研究においてなされたような、より低分子のRNA種を含む、5から40ヌクレオチドのRNAを対象にした研究はほとんど知られていない。

本研究では、tRNase ZLとsgRNAから成る遺伝子発現制御網が、細胞内だけでなく細胞間にも存在し、sgRNAが細胞間の情報伝達を担っている可能性も視野に入れ、血漿低分子RNAがtRNase ZLのsgRNAとして機能するかどうかも試験した。そして、実際に、RNAfr31がsgRNAとして機能することを示した。

更に、RNAfr31およびRNAfr17に関して、その生理学的役割を調べるために、化学合成したそれぞれのRNAを培養細胞に導入する実験により、これらのRNA断片が細胞の増殖に影響を与えることが示された。この結果は、sgRNAが細胞間の情報伝達物質である可能性を示唆している。

現在、本研究の成果の一部は論文投稿の準備中である。

## (6) 今後の展望

本研究において見出された多数の血漿中の新たな低分子RNAの中に、本当に多発性骨髄腫の予後を正確に予想したり治療法の選択指針となるようなものがあるかを、今後、十分量の検体数を集めて解析していく予定である。

骨髄腫は、前がん状態のmonoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS)から、年間およそ1%の確率で移行すると考えられている。今後は、早期治療の判断材料となるようなMGUS特異的な血漿低分子RNAも探索していく予定である。

また、骨髄腫以外の様々ながんについても、本研究と同様に、バイオマーカーとなるような5から40ヌクレオチドの血漿RNAを探索していく予定である。

更に、細胞増殖に影響を与える血漿RNA、RNAfr31とRNAfr17の細胞内標的RNAをDNAマイクロアレイ解析などにより探索し、tRNase ZLとsgRNAから成る遺伝子発現制御

網との関係を解析していく予定である。

## 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

高橋 由明 (TAKAHASHI YOSHIAKI)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号：60115045

### (2) 研究分担者

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

### (3) 連携研究者

なし