

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450293

研究課題名(和文)イルカにおける臓器特異的バイオマーカーの同定と超早期疾病診断法への応用

研究課題名(英文) Identification and application for rapid diagnostic method of organ-specific biomarker in dolphin

研究代表者

伊藤 琢也 (ITOU, Takuya)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：20307820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：血中において安定で、かつ臓器障害時に特異的に発現するmicroRNA(miRNA)は、炎症のバイオマーカーとして注目されている。本研究では、水族館におけるイルカ健康や傷病状況を把握するバイオマーカーとしてmiRNAに着目した。ハンドウイルカの諸臓器からsmall RNAライブラリーを作製し、15組織でのmiRNAの発現を測定した。イルカでは新規の62種類のmiRNAを同定でき、脳、心臓、肺および肝臓においてそれぞれ特異的なmiRNAが高発現していた。以上、本研究で同定された臓器特異的に高発現するmiRNAは、イルカの組織傷害のバイオマーカー候補として診断への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Recently, microRNAs (miRNAs) are focused on the role of biomarker because they are stable in serum and plasma, and some of them express in the specific organs and increase with the organ injury. Thus miRNAs may be very useful as biomarkers for monitoring the health and condition of dolphins and for detecting disorders in aquariums. Here, a small RNA library was made from dolphin lung, liver and spleen, and miRNA expression patterns were then determined for 15 different tissues. We identified 62 conserved miRNA homologs in the dolphin small RNA library and found high expression miRNAs in specific tissues: miR-125b and miR-221 were highly expressed in brain, miR-23b in heart, miR-199a and miR-223 in lung, and miR-122-5p in liver. Some of these tissue-enriched miRNAs may be useful as specific and sensitive diagnostic blood biomarkers for organ injury in dolphins.

研究分野：獣医疾病予防学

キーワード：イルカ バイオマーカー micro RNA 診断

1. 研究開始当初の背景

飼育下のイルカにおいては、肺炎や腸炎などの炎症性疾患が多発し、その臨床的対応が大きな課題となっている。したがって、これらの炎症性疾患の徴候をできるだけ早期に把握して的確な診断することが予防的な健康管理や効果的な治療をする上で求められている。

2. 研究の目的

本研究の主題であるイルカの臓器特異的なバイオマーカーは、血液検査によって炎症が生じている臓器や組織を早期に特定できる有益な指標となりうると予想される。このような目的に合致する臓器特異的なバイオマーカーを探索するために、本研究では、健康な個体の血液中には存在せず、かつ傷病個体の臓器特異的な生体因子として microRNA(miRNA)に着目した。本研究はイルカの諸臓器から miRNA を含む small RNA ライブラリーの作製、次に miRNA バイオマーカー候補を同定するためにイルカの臓器/組織での miRNA の発現パターンを検討、さらに、特定の組織で高発現を示した miRNA の健康イルカ血漿における発現量を検討する。

3. 研究の方法

(1) イルカ small RNA ライブラリーの材料は、miRNeasy Mini Kit を用いてハンドウイルカの肺、肝臓、脾臓から抽出した。ポリアデニル化した small RNA は、二次構造を除去した後、逆転写反応を行い、設計した forward および reverse プライマーで PCR を行った。PCR 産物は電気泳動で分離した後、21~24bp の miRNA を含む 105~110bp の DNA バンドを切り出し精製して pGEM-T Easy Vector に組み込み、One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* に形質転換し、small RNA ライブラリーを作製した。形成されたコロニー由来 PCR 産物の配列は、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer を用いてダイレクトシーケンスで決定した。

(2) 配列解析は以前の論文を参考にして行った。イルカ miRNA の同定は miRBase を用い、E-value が 0.005 以下で miRBase 上の miRNA と query が一致したものを既存 miRNA のホモログとした。この基準に該当しなかった miRNA は、NCBI Blastn で解析した。イルカの pre-miRNA 配列が miRNA の典型的な特徴であるヘアピン構造を形成するかを推測するために、イルカの推定 pre-miRNA 配列を ensemble/blast/blat database を用いてハンドウイルカのゲノムから検索した。その後 MFold software を用いて推定イルカ pre-miRNA の二次構造を推測した。1~4 塩基異なる高い相同性を持つ miRNA はリアルタイム PCR で非特異的増幅を起こす可能性があるため、正確に miRNA の特異的発現を定量するための確認を行った。

(3) イルカ組織における miRNA 発現レベルはリアルタイム PCR で解析した。イルカの 15 組織 (脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、骨格筋、前胃、主胃、幽門胃、膵臓、小腸、副腎、精巣、卵巣) から切り出した約 25mg のサンプルから miRNeasy Mini Kit を用いて small RNA の抽出を行った。small RNA はポリアデニル化し、RNeasy Mini Kit を用いて精製した。上述のように逆転写反応を行った後、Fast SYBR® Green Master Mix、ターゲット miRNA センスプライマー、アンチセンスプライマー (ユニバーサルプライマー) を調整してリアルタイム PCR を行った。各組織における miRNA 発現レベルは、内部標準遺伝子として 5S ribosomal RNA を用いて評価した。

(4) イルカの血漿中 miRNA 濃度は、組織特異的発現を示した miR-23b、miR-103、miR-122-5p、miR-125b、miR-199a、miR-204、miR-221 および miR-223 を対象にしてリアルタイム PCR を用いて調べた。健康なイルカ 6 個体の血漿からの small RNA の抽出・精製は、ISOGEN-LS および miRNeasy Mini Kit を併用して行った。溶出した small RNA をポリアデニル化した small RNA は、RNeasy Mini Kit を用いて精製し、逆転写反応を行った。血漿中 miRNA 濃度 (copies/ μ l) は、合成オリゴ DNA を用いて作製した検量線を基にリアルタイム PCR により算出した。

4. 研究成果

(1) イルカの miRNA ホモログ同定

イルカの肺、肝臓、脾臓から抽出した RNA サンプルから作製した small RNA ライブラリーから 217 クローンの small RNA を分離した。small RNA ライブラリーは、miRNA 71.4% (155/217)、mRNA 23.5% (51/217)、rRNA 1.8% (4/217)、tRNA 0.9% (2/217)、mtRNA 1.8% (4/217)、snRNA 0.5% (1/217) で構成されていた。分離された 155 クローンの miRNA を解析した結果、既知の miRNA ホモログとして 62 種の miRNA が同定された。

このうち、56 種の miRNA において pre-miRNA の配列が公表されているイルカのゲノムデータから検出され、その全てが pre-miRNA の典型的な特徴であるヘアピン構造を形成していた。62 種の miRNA のうち 7 種は 3' 末端に 1~4 塩基異なる異形 miRNA が存在した。また、miR-23a および miR-23b のように 1~4 塩基違いの高い相同性を持つ miRNA が存在した。最も多く分離された miRNA は、155 クローン中それぞれ 12 クローン分離された miR-143 および miR-145a-5p であった。

(2) イルカ組織における miRNA 発現解析

肺、肝臓、脾臓由来の cDNA プールで各 miRNA の融解曲線および増幅効率を調べ、各 miRNA が特異的に増幅するか確認した。miR-574 を除く全 miRNA で、融解曲線は一峰性を示し、

Tm 値は 68 ~ 70 °C、増幅効率 は 90 ~ 110% であつた。内部標準遺伝子として用いた 5SrRNA の組織間における Ct 値の変動係数は、7.4% (平均 Ct ± SD ; 20.4 ± 1.5) であり、5SrRNA の最も高い発現は膵臓で、最も低い発現は骨格筋で確認された。多くの miRNA は 2 個体の組織間で発現レベルが異なつた。2 個体両者において、6 種の miRNA が他の組織と比較して特定の 1 組織で 10 倍以上高発現していた。すなわち、miR-125b ならびに miR-221 が脳で、miR-23b が心臓で、miR-199a ならびに miR-223 が肺で、miR-122-5p が肝臓で高く発現していた (図 1)。多くの組織で低発現もしくは検出限界以下であつた miR-103a および miR-204 は、一部の組織 (miR-103a ; 脳および肺、miR-204 ; 脳および腎臓) で中程度の発現が確認された (図 1)。miR-26a および miR-1260 は、多種の組織で高発現していた。

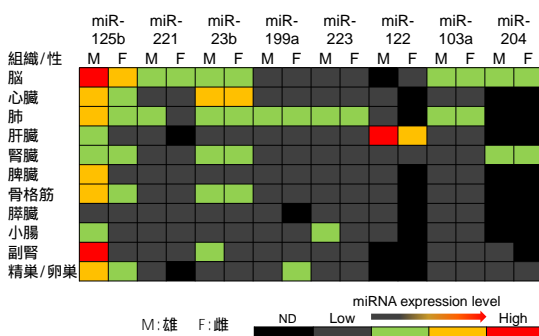


図 1 同定したイルカ miRNA の臓器発現解析

各々の miRNA の発現レベルは、内部標準遺伝子として用いた 5SrRNA に対する相対値から評価した。log102- Ct (Ct = miRNA の Ct 値 - 5SrRNA の Ct 値) は相対的 miRNA の発現レベルを評価するために用いた。使用した全ての組織中の全 miRNA から算出された log102- Ct の平均値を基準 (-2.1 ± 0.6) に、発現レベルを検出限界以下 (ND) を黒、低発現 (Low ; < -2) を灰色、中程度 (Moderate ; -2 ~ -1) を黄緑色、高発現 (High ; -1 ~ 0) を黄色、極度の高発現 (extreme ; > 0) を赤と定義した。

(3) 健常イルカ血漿における miRNA 発現

健常イルカにおいて、miR-23b、miR-103、miR-122-5p、miR-125b、miR-199a、miR-204 および miR-221 の血漿中濃度は本法では検出限界付近の濃度であつた。一方で miR-223 は血漿中において高濃度で検出された (図 2)。

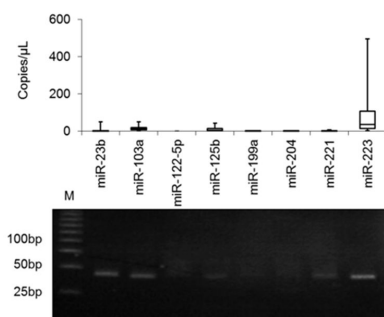


図 2 臓器特異的発現した miRNA の血漿発現解析

(4) 成果のまとめ

組織発現解析の結果、他の組織と比較し脳、心臓、肺、肝臓および腎臓でそれぞれ特異的な miRNA が高発現していた (図 3)。これらのうち、7 種の miRNA の血漿での発現量は極めて低かつたのに対し、miR-223 は高い発現量を示した。以上、本研究より、イルカの組織で特異的に高発現する miRNA を同定し、その多くは血中濃度が極めて低値であることが明らかとなった。本研究で同定された組織特異的に高発現する miRNA はイルカの臓器特異的なバイオマーカーになることが期待される。

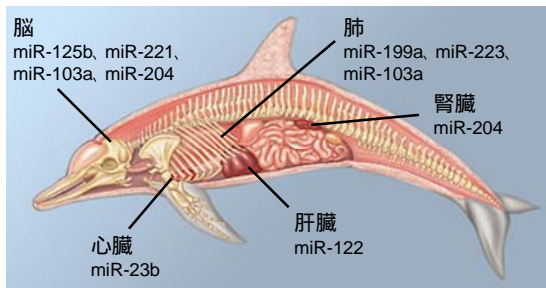


図 3 イルカの臓器特異的バイオマーカーの候補

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 7 件)

- Kobayashi Y, Horie M, Nakano A, Murata K, Itou T, Suzuki Y. Exaptation of Bornavirus-Like Nucleoprotein Elements in Afrotherians. *PLoS Pathog.* 2016, 12(8):e1005785. doi: 10.1371/journal.ppat.1005785. 査読有
- Suzuki M, Wakui H, Itou T, Segawa T, Inoshima Y, Maeda K, Kikuchi K. Two isoforms of aquaporin 2 responsive to hypertonic stress in the bottlenose dolphin. *J Exp Biol.* 2016, 219(Pt 8):1249-1258. doi: 10.1242/jeb.132811. 査読有
- Segawa T, Kobayashi Y, Inamoto S, Suzuki M, Endoh T, Itou T. Identification and Expression Profiles of microRNA in Dolphin. *Zoolog Sci.* 2016, 33(1):92-97. doi: 10.2108/zs150090. 査読有
- Itou T, Fukayama T, Mochizuki N, Kobayashi Y, Deberaldini ER, Carvalho AA, Ito FH, Sakai T. Molecular epidemiological tracing of a cattle rabies outbreak lasting less than a month in Rio Grande do Sul in southern Brazil. *BMC Res Notes.* 2016, 9:87. doi: 10.1186/s13104-016-1898-5. 査読有
- Sakai T, Ishii A, Segawa T, Takagi Y, Kobayashi Y, Itou T. Establishing

conditions for the storage and elution of rabies virus RNA using FTA® cards. J Vet Med Sci. 2015, 77(4):461-465. doi: 10.1292/jvms.14-0227. 査読有
Segawa T, Kobayashi Y, Sase Y, Itou T, Suzuki M, Endoh T, Nakanishi T, Sakai T. Easy-to-use rapid gene amplification method for direct detection of RNA and DNA viruses in sera and feces from various animals. J Virol Methods. 2014, 201:31-37. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.01.019. 査読有

〔学会発表〕(計15件)

伊藤琢也、ハンドウイルカの肺由来培養細胞株の樹立と性状解析、第22回日本野生動物医学会大会、2016年9月16日、宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市)

伊藤琢也、ハンドウイルカにおけるMRPの発現解析、第159回日本獣医学会学術集会、2016年9月6日、日本大学生物資源科学部(神奈川県・藤沢市)

伊藤琢也、イルカにおける組織特異的損傷マーカーの探索 - マイクロRNAを指標に -、第9回日本大学先端フォーラム、2016年1月27日、日本大学会館(東京都・市ヶ谷)

Itou T et al., Searching of organ-specific micro RNA in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*), 21st Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals, 2015. 12.14-18, Hilton San Francisco Union Square, San Francisco, CA USA.

伊藤琢也、短期間の急激な摂食制限がイルカに与える生理学的影響、平成27年度日本水産学会秋季大会、2015年9月24日、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)

伊藤琢也、小型鯨類における新規組織特異的損傷マーカーの探索 - マイクロRNAを指標に -、平成27年度日本水産学会秋季大会、2015年9月24日、東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)

伊藤琢也、イルカにおける臓器特異的microRNAバイオマーカーの探索、第20回日本野生動物医学会大会、2014年9月17日、つくば国際会議場(茨城県・つくば市)

伊藤琢也、ハンドウイルカmicroRNAの同定と発現解析、第157回日本獣医学会学術集会、2014年9月10日、北海道大学高等教育推進機構(北海道・札幌市)

〔図書〕(計1件)

伊藤琢也 他、文永堂出版、動物衛生学、

印刷中

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 琢也 (ITOU, Takuya)
日本大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号: 20307820

(2) 連携研究者

鈴木 美和 (SUZUKI, Miwa)
日本大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号: 70409069

鈴木 由紀 (SUZUKI, Yuki)

日本大学・生物資源科学部・助教

研究者番号: 30712492

(発表論文等は旧姓 Kobayashi Y. で記載)

(3) 研究協力者

瀬川 太雄 (SEGAWA, Takao)