

—特集 [形態学の逆襲：形態学教室の扉をたたいてみてください (5)]—



ノンコーディング RNA： 生体内発現解析のための形態学的アプローチ

瀧澤 俊広 野口 隼矢 瀧澤 敬美

日本医科大学大学院分子解剖学

1. ジャンクと考えられていたノンコーディング RNA (ncRNA) は今やお宝である

2000年代前半にヒトゲノムプロジェクトが完了し、ヒトにおける蛋白質コード遺伝子数は約2万個であり、線虫のような下等動物の蛋白質コーディング遺伝子数とかわらないことがわかり、研究者に驚きと衝撃を与えた¹。さらに、ヒトゲノムプロジェクトで得られたもう一つの成果は、ゲノムの75%に相当する領域がRNAに転写されていることが示され、蛋白質をコードしている領域は全体のわずか3%にすぎずであり、残りは蛋白質をコードしていないノンコーディング領域からということとなる^{2,3}。転写されるRNAのほとんどはノンコーディングRNA (non-coding RNA, ncRNA) である。

ncRNAには古典的なncRNAとして、アミノ酸をリボソームへ運搬する転移RNA (tRNA)、リボソームを構成するリボソームRNA (rRNA)などが知られているが、1990年代以降に発見された非古典的なncRNAが近年注目を集めている。ncRNAは、鎖長が20塩基前後の短鎖ncRNA (small ncRNA, sncRNA)と、200塩基以上の長鎖ncRNA (long ncRNA, lncRNA)とに大きく分類される(図1)。ひと昔前ジャンクと考えられていたncRNAは、今やお宝であり、発生・分化、細胞の生理機能、癌化・浸潤・転移、様々な疾患の分子病態への関与が示唆されている^{4,5}。さらに、ncRNAは、癌をはじめとする様々な疾患におけるバイオマーカーや創薬ターゲットとなっている⁶。

2. 短鎖 ncRNA (sncRNA)

低分子RNAには、相補的な配列を持つメッセンジャーRNA (mRNA)の転写後調節するmicroRNA (miRNA)、RNA干渉(短鎖二本鎖RNAによってmRNAの相同部分を切断することにより、遺伝子発現の抑制を起こす現象)を引き起こすsiRNA (small interfering RNA)、生殖細胞特異的に発現しているPIWI-interacting RNAs (piRNAs)などがある⁷。

miRNAは、線虫の発生に関与するmiRNAとして*cel-lin-4*が初めて報告されて以来^{8,9}、miRNAデータベースであるmiRBase (Release 22.1: <http://www.mirbase.org/index.shtml>)に、ヒトmiRNAは前駆体miRNA (pre-miRNA) 1,917種、成熟miRNA (mature miRNA) 2,654種が登録されている。

2006年にスタンフォード大学Andrew Fire教授、マサチューセッツ大学Craig C. Mello教授がRNA干渉の発見でノーベル生理学・医学賞を受賞した。それ以降、sncRNA研究やその技術応用が注目を集め、2010年代に入ると研究が急速に進んで、右肩上がりに論文数が増えた。われわれはブーム到来前の2003年、2人の日本医科大学大学院生(三嶋拓也博士、水口義昭博士)からRNA干渉研究の提案を受け、流行前に研究を開始し、生殖領域や消化器領域でsncRNAの先駆け研究を展開することができた^{10,11}。また、2008年(平成20年)に私立大学戦略的研究基盤形成支援事業として日本医科大学の研究プロジェクト「診断・治療に新たな展開をもたらす低分子RNA：分子病態における役割解明と新治療戦略への展開」(研究代表者：瀧澤俊広)が採択され、5年間事業を展開し、学内の低分子RNA研究が活性化され、この事業により低分子RNAが臓器疾患における分子病態でどのような役割を果たしているのか、その機序解明の突破口を開き、低分子RNAを新規ツールとした診断・治療のための基盤技術開発に繋がる基盤を形成することができた。

3. 長鎖 ncRNA (lncRNA)

1991年にヒトX染色体を不活性化させるlncRNA XISTが発見されて以来¹²、近年、約2万8,000個のlncRNAが報告されている¹³。前述したように蛋白質コード遺伝子数が約2万個あることから、それ以上のlncRNAが機能している可能性があることになる。

19-25塩基からなる一本鎖sncRNAであるmiRNAの作用メカニズムは、mRNAの3'-UTRの相補的な配列と結合し、mRNAから蛋白質への翻訳抑制または

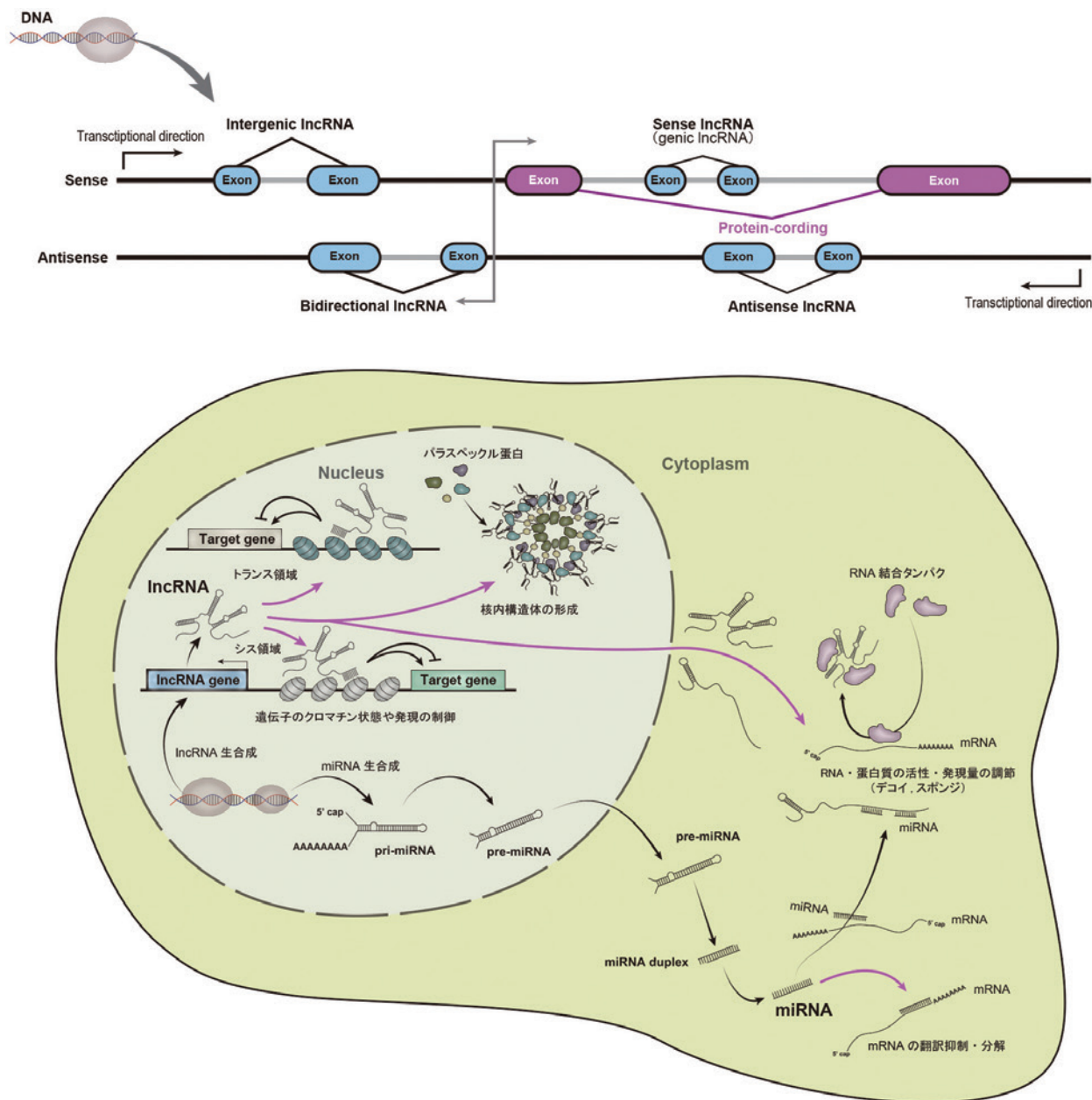


図1 ncRNAの種類と機能

microRNA (miRNA) は核内で前駆体 (pri-miRNA) として転写され、さらに修飾を受け pre-miRNA となり細胞質に移行し、さらに修飾を受け mature miRNA となる。Long ncRNA (lncRNA) 遺伝子は、蛋白質コード遺伝子との位置関係から、遺伝子間から転写される long intergenic ncRNA (lincRNA)、遺伝子と重複する sense lncRNA (genic lncRNA)、蛋白質コード遺伝子と双方向性に転写される bidirectional lncRNA、蛋白質コード遺伝子のアンチ鎖から転写される antisense lncRNA などの種類がある。miRNA は標的遺伝子 mRNA の 3'-UTR に結合し遺伝子発現を負に制御する。一方、lncRNA の作用メカニズムは、図に示したように多種多様である。

mRNA の分解であり、基本的に標的遺伝子の発現を負に制御するが¹⁴、lncRNA の作用メカニズムは多種多様である (図 1)^{5,15,16}。転写制御領域が同一である遺伝子のクロマチン状態や発現の制御機序 (シス作用性 lncRNA) として、①生成された lncRNA (例: *Xist* による X 染色体不活化^{17,18})、② lncRNA の転写・スプライシング、または③ lncRNA 遺伝子内の DNA エレ

メントによる制御などがある。lncRNA が転写された部位から遠隔で作用するメカニズム (トランス作用性 lncRNA) として、①転写制御領域が他の場所にある遺伝子のクロマチン状態や発現の制御 (例: lncRNA *HOTAIR*¹⁹)、②核内構造体の形成への寄与 (例: 核内構造体パラスペックルの lncRNA *NEAT1*²⁰) ③デコイ (おとり) として RNA (miRNA など) や RNA 結合蛋

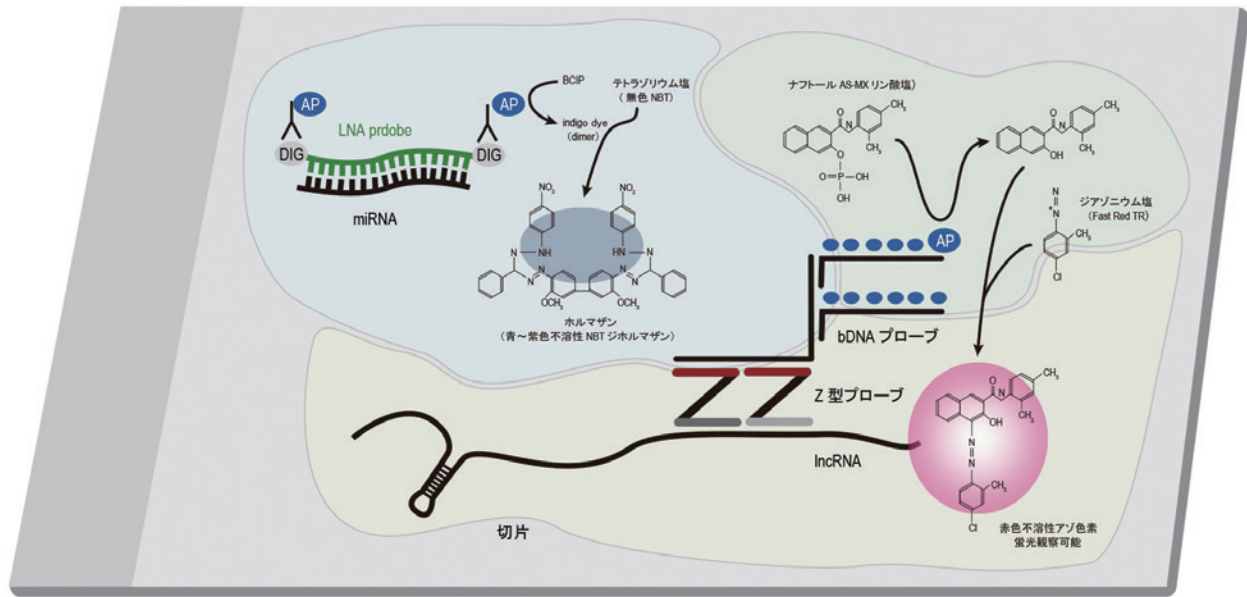


図2 ncRNA 解析のための in situ hybridization (ISH) 法

miRNA 局在解析のための locked nucleic acid (LNA) プローブを用いた LNA-ISH 法。LncRNA 局在解析のための Z 型オリゴヌクレオチドプローブと branched DNA (bDNA) シグナル増幅プローブを組み合わせた高感度 ISH 法 (bDNA-ISH 法)。bDNA-ISH 法は、Z 型短鎖プローブをハイブリさせ、引き続きシグナル増幅・可視化系の bDNA プローブをハイブリさせることにより局在を可視化する。ncRNA の可視化には、AP 基質である Fast Red, BCIP/NBT などが使用される。基質として Fast Red が優れている点は、蛍光顕微鏡でもその反応産物が観察可能であり、褪色しづらい。ジギキシゲニン (DIG), alkaline phosphatase (AP)。

白質に直接結合し、その活性や発現量の調節 (例: lncRNA *Cyrano* による *miR-7* スポンジ²¹) などがある。多くの lncRNA は、スプライシングされ、5' 端に Cap 構造 (7-メチルグアノシンが 5'-5' の向きに結合した構造) と 3' 端に Poly (A) 配列を有する mRNA と類似の構造を持っているが、持たない lncRNA (*MALAT1*, *NEAT1* など) もある⁵。

4. ncRNA 生体内発現解析のための組織化学

ncRNA 研究にはいろいろな進め方がある。われわれは、興味あるサンプル (正常/異常な細胞・組織・臓器) における ncRNA の発現プロファイル解析→標的遺伝子, 相互作用する RNA・RNA 結合蛋白質の検証→機能解析→臨床応用 (病態解明, バイオマーカー・創薬開発など) の流れに沿い、疾患における ncRNA 研究を進めている。その研究過程において、ncRNA 発現プロファイル解析の生化学的アプローチとして、アレー解析, RNA シーケンス解析を行い、発現プロファイルを把握することができる。組織・臓器を構成している細胞をバラバラにすることができれば、最近の 1 細胞 RNA シーケンス解析技術を用いて、組織・臓器に含まれるすべての細胞種の同定, 1 細胞の網羅的遺伝子発現解析が可能である²²。

(1) LNA プローブを用いた ISH (LNA-ISH) 法

形態学的アプローチは、対象とするサンプルが複数の種類の細胞より構成され、複雑な立体構造をとっている組織・臓器であっても、対象とする ncRNA, RNA 結合蛋白質, ncRNA に関連するシグナル伝達分子などが、どの細胞に発現しているのか、細胞内のどこに局在しているのか、さらには正常と異常の比較 (発現変動解析) が可能であり、発現プロファイルを明らかにすることができる。ncRNA の形態学的アプローチには in situ hybridization (ISH) 法が有用である (図 2)^{23,24}。miRNA 局在解析に用いるプローブは、オリゴヌクレオチドプローブである locked nucleic acid (LNA) プローブ [RNA との高い結合親和性と、配列特異性を持ち合わせた特殊な修飾塩基 (リボ核酸の 2' 位の酸素原子と 4' 位の炭素原子が架橋した 2 つの環状構造をもつ核酸) を導入したプローブ] が優れている (例: QIAGEN 社, <https://www.qiagen.com/ja-us/products/discovery-and-translational-research/detection/ish-and-northern-blotting/mirna-detection/mircury-lna-mirna-detection-probes>)²⁴。この LNA プローブを用いることにより、形成された二本鎖の熱安定性が飛躍的に上昇し、目的 miRNA をより高感度かつ特異的に検出することが可能となる。プローブの両

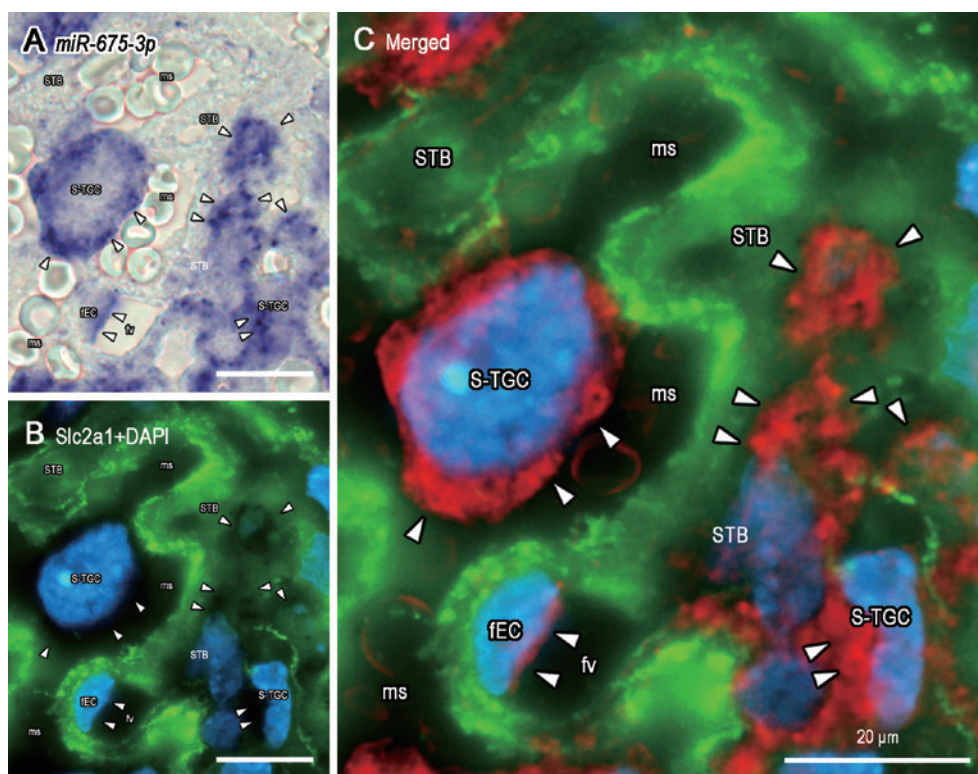


図3 LNA-ISH法

LNA-ISH法を用いたマウス胎盤 (E18.5) における *miR-675-3p* の発現解析. *miR-675-3p* は胎盤迷路層の類洞栄養膜巨細胞 (S-TGC), 合体栄養膜細胞 (STB), 胎児血管内皮細胞 (fEC) に発現している. 母体類洞 (母体洞様血管, ms), 胎児血管腔 (fv). (A) 明視野観察での *miR-675-3p*. 青紫色の反応産物 (矢尻) として観察される. (B) 同一切片での *Slc2a1* (STB の特異的のマーカー; 緑色蛍光) の免疫染色. DAPI で核染色 (青色蛍光). (C) 同一切片の *miR-675-3p* と *Slc2a1* (+DAPI) の合成画像. *miR-675-3p* は赤色の擬似カラーで表示.

端にジゴキシゲニン標識したプローブを用いることにより, さらに検出感度を上げることも可能である (図 2, 3)²⁵.

(2) Branched DNA (bDNA) を用いた ISH (bDNA-ISH) 法

LncRNA の ISH 法には様々なプローブが利用可能であるが, われわれはジゴキシゲニン標識した RNA プローブを用いている²⁵. DNA プローブと比較して T_m 値 (融解温度: 形成された 2 本鎖が熱変性して 1 本鎖になる時の温度) が高く安定であり, 高い stringency でのハイブリダイゼーション後の洗浄が可能である (より相補性が高い RNA-RNA 雑種しか存在できないような条件, つまり, 高温, 低塩濃度, 高濃度のホルムアミド存在下での洗浄が可能であるということ)²³.

さらに, 従来法とは異なる, Z 型オリゴヌクレオチドプローブと bDNA シグナル増幅プローブを組み合わせた新しい高感度 ISH 法が開発され (例:

ViewRNA; <https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/cell-analysis/cellular-imaging/in-situ-hybridization-ish/rna-fish/viewrna-cell-assays.html>)²⁶, lncRNA の ISH には有用である (図 2, 4)²⁷. 目的の lncRNA に特異的な 10 種類以上の Z 型の高密度配列短鎖オリゴヌクレオチドプローブ (multiple tiling antisense probes) を設計. 2 つの Z 型プローブがセットで隣合って切片上のターゲット lncRNA にハイブリし, 引き続き, 2 つの Z 型プローブの上に検出のための bDNA プローブがハイブリする [1 つの Z 型プローブ, または異なる Z 型プローブ (多重染色時) では bDNA がその上に組み上がらない]. LncRNA は bDNA 中の酵素 (horseradish peroxidase, HRP や alkaline phosphatase, AP) や蛍光色素 (Alexa Fluor など) で標識された Label Probe を用いて可視化される. 短鎖プローブ (数十塩基) を用いてハイブリ効率を高めていること, さらに, 1 つの Z 型プローブではシグナル増幅・可視化系の bDNA がその上に組み上がらず特異的な lncRNA のシグナルが検出できない原理

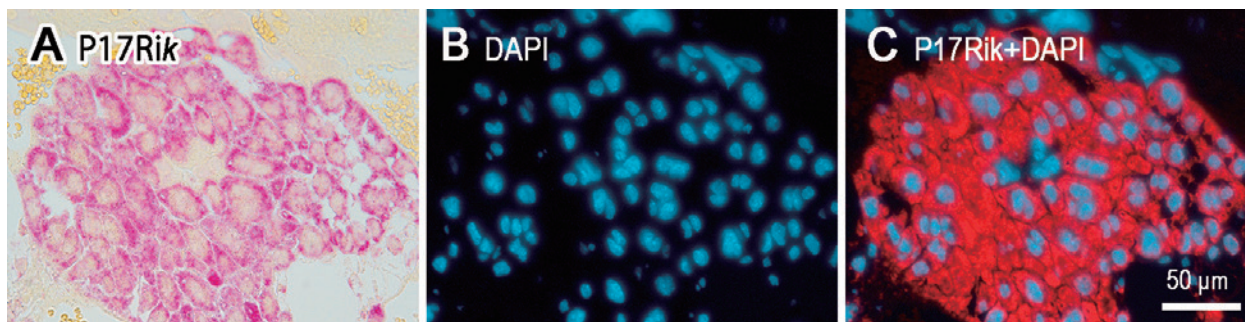


図4 bDNA-ISH法

bDNA-ISH法を用いたマウス胎盤 (E16.5) における lncRNA *1600012P17Rik* (P17Rik) の発現解析. P17Rik は胎盤接合部の海綿状栄養膜細胞に発現している. (A) 明視野観察での P17Rik. 赤色の反応産物として観察される. (B) 同一切片での DAPI による核染色 (青色蛍光). (C) 同一切片の蛍光観察. P17Rik (赤色蛍光) と DAPI の合成画像.

(2つのプローブが配列することが必要) となっており, mRNA と比較して発現量が低いことが多い lncRNA の検出に優れている.

(3) ncRNA 発現可視化のための Fast Red 基質の有用性

ホルマリン固定・パラフィン包埋サンプルの ncRNA の可視化には, AP 基質の Fast Red, BCIP/NBT や, HRP 基質の 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) などが使用されることが多い (蛍光色素も可能). AP 基質の Fast Red による可視化 (アゾ色素法) は, プローブ中の AP により無色の基質 (ナフトール AS-MX リン酸塩) が加水分解され, 生じたリン酸と同時に放出されるナフトールをジアゾニウム塩 (Fast Red TR など) で補足し, 不溶性のアゾ色素として沈殿・赤色発色させる (反応産物の沈着・発色). 基質として Fast Red が優れている点は, 蛍光顕微鏡でもその反応産物が観察可能であり (赤色蛍光), 褪色しづらい (図 2, 4)²⁷. 赤色の反応産物を hematoxylin (青色) や methyl green (緑色) による核染色とともに明視野で細胞同定, 細胞内局在解析は可能であるが, DAPI (青色蛍光) などを組み合わせ蛍光顕微鏡観察することにより, より詳細な核構造観察からの細胞の同定, 蛍光強度を用いた ncRNA の半定量的解析が可能となる.

ncRNA の ISH は, 免疫組織学などを同時に組み合わせることが可能であり, ncRNA に付随する RNA 結合蛋白質, 関連するシグナル伝達分子, 細胞特異的マーカー分子などの同時観察 (ISH と免疫染色との多重染色) も可能である (図 3)²⁵.

おわりに

蛋白質をコードしていない RNA によってわれわれ

は操られているのかもしれない. 2003年より日本医科大学の大学院生に導かれ ncRNA 研究を開始してから, プロテオーム解析, RNA シーケンス解析など生化学・分子生物学的研究も展開してきたが, 他の研究者にない自分の強み “顕微鏡, 組織化学” があったことは, ncRNA 研究を進める上で大変ありがたいことであった. 形態学的アプローチとして ISH 法の他に, laser microdissection 法による解析も有用であるが紙面の都合上割愛した²⁸.

謝辞: ncRNA の分子解剖学的研究の展開ができたのは, 我が師である John M. Robinson 教授 (米国オハイオ州立大学; 2020年3月逝去) のサポートのおかげであり, 紙面を借りてご冥福をお祈りいたします. 本稿に関連した研究の一部は日本学術振興会研究費, 私学助成の補助を受けた.

Conflict of Interest: 開示すべき利益相反はなし.

文 献

1. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004; 431: 931-945.
2. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 2012; 489: 57-74.
3. Djebali S, Davis C A, Merkel A, et al.: Landscape of transcription in human cells. *Nature* 2012; 489: 101-108.
4. Slack F J, Chinnaiyan A M: The Role of Non-coding RNAs in Oncology. *Cell* 2019; 179: 1033-1055.
5. Statello L, Guo C J, Chen L L, Huarte M: Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2021; 22: 96-118.
6. Todén S, Goel A: Non-coding RNAs as liquid biopsy biomarkers in cancer. *Br J Cancer* 2022; 126: 351-360.
7. Shi J, Zhou T, Chen Q: Exploring the expanding universe of small RNAs. *Nat Cell Biol* 2022; 24:

- 415-423.
8. Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843-854.
 9. Wightman B, Ha I, Ruvkun G: Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993; 75: 855-862.
 10. Mishima T, Takizawa T, Luo S. S, et al: MicroRNA (miRNA) cloning analysis reveals sex differences in miRNA expression profiles between adult mouse testis and ovary. *Reproduction* 2008; 136: 811-822.
 11. Mizuguchi Y, Yokomuro S, Mishima T, et al: Short hairpin RNA modulates transforming growth factor beta signaling in life-threatening liver failure in mice. *Gastroenterology* 2005; 129: 1654-1662.
 12. Brown C J, Ballabio A, Rupert J. L, et al: A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* 1991; 349: 38-44.
 13. Hon C C, Ramilowski J A, Harshbarger J, et al: An atlas of human long non-coding RNAs with accurate 5' ends. *Nature* 2017; 543: 199-204.
 14. Filipowicz W, Bhattacharyya S N, Sonenberg N: Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. *Nat Rev Genet* 2008; 9: 102-114.
 15. Kopp F, Mendell J T: Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. *Cell* 2018; 172: 393-407.
 16. Ransohoff J D, Wei Y, Khavari P. A: The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; 19: 143-157.
 17. Cerase A, Pintacuda G, Tattermusch A, Avner P: Xist localization and function: new insights from multiple levels. *Genome Biol* 2015; 16: 166.
 18. da Rocha S T, Heard E: Novel players in X inactivation: insights into Xist-mediated gene silencing and chromosome conformation. *Nat Struct Mol Biol* 2017; 24: 197-204.
 19. Rinn J L, Kertesz M, Wang J K, et al: Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* 2007; 129: 1311-1323.
 20. Clemson C M, Hutchinson J. N, Sara S. A, et al: An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles. *Mol Cell* 2009; 33: 717-726.
 21. Kleaveland B, Shi C. Y, Stefano J, Bartel D. P: A Network of Noncoding Regulatory RNAs Acts in the Mammalian Brain. *Cell* 2018; 174: 350-362. e317.
 22. Mereu E, Lafzi A, Moutinho C, et al: Benchmarking single-cell RNA-sequencing protocols for cell atlas projects. *Nat Biotechnol* 2020; 38: 747-755.
 23. 小路武彦: 光顕 in situ ハイブリダイゼーションによる特異的 RNA 分子の細胞質内不均一分布証明. *電子顕微鏡* 2002; 37: 77-80.
 24. Obernosterer G, Martinez J, Alenius M: Locked nucleic acid-based in situ detection of microRNAs in mouse tissue sections. *Nat Protoc* 2007; 2: 1508-1514.
 25. Naing B T, Takizawa T, Sakurai T, Kyi-Tha-Thu C, Takizawa T: Possible transfer of lncRNA H19-derived miRNA miR-675-3p to adjacent H19-non-expressing trophoblast cells in near-term mouse placenta. *Histochem Cell Biol* 2023; 159: 363-375.
 26. Zhang Q, Xu L, Zhang Y, et al: A novel ViewRNA in situ hybridization method for the detection of the dynamic distribution of Classical Swine Fever Virus RNA in PK15 cells. *Virology* 2017; 14: 81.
 27. Wang J, Noguchi S, Takizawa T, et al: Placenta-specific lncRNA 1600012P17Rik is expressed in spongiotrophoblast and glycogen trophoblast cells of mouse placenta. *Histochem Cell Biol* 2022; 158: 65-78.
 28. Jikuzono T, Kawamoto M, Yoshitake H, et al: The miR-221/222 cluster, miR-10b and miR-92a are highly upregulated in metastatic minimally invasive follicular thyroid carcinoma. *Int J Oncol* 2013; 42: 1858-1868.

(受付：2023年2月8日)

(受理：2023年2月8日)

日本医科大学医学会雑誌は、本論文に対して、クリエイティブ・コモンズ表示 4.0 国際 (CC BY NC ND) ライセンス (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>) を採用した。ライセンス採用後も、すべての論文の著作権については、日本医科大学医学会が保持するものとする。ライセンスが付与された論文については、非営利目的で、元の論文のクレジットを表示することを条件に、すべての者が、ダウンロード、二次使用、複製、再印刷、頒布を行うことができる。