

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

委託業務成果報告（業務項目1）

tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の開発

担当責任者 富澤 一仁 熊本大学大学院生命科学研究部・教授

魏 范研 熊本大学大学院生命科学研究部・助教

井上 謙吾 静岡県産業振興財団ファルマバレーセンター・

名誉所長

研究要旨

【目的】本研究では、アジア型2型糖尿病に特有の危険因子 Cdkal1 に着目し、同酵素による tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断薬を創出する。このコンパニオン診断薬を開発するためには、これまでに我々が開発した tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾測定法を標準化して、キット化する必要がある。そこで本研究では、末梢血から tRNA^{Lys}(UUU)のチオメチル化修飾を測定する技術の標準化を行うことを目的とする。

【必要性】現在上市しているコンパニオン診断薬は、すべてがんを標的としたものであり、診断の多くは遺伝子変異を標的としている。本研究では、tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾という従来に無い新しいコンパニオン診断薬開発を目指す。そのために、tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾を定量する技術の標準化を行う必要がある。

【成果】 tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の開発：ヒト末梢血から分離した血球成分から tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾を定量する技術の標準化を行い、末梢血サンプルの保存方法、RNA 精製法の最適化、定量 PCR 機器の設定が完了した。末梢血サンプルは、24 時間、常温で保存していても、tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾のデータに影響を及ぼさないことが明らかになった。RNA 精製法は、トリゾールを用いたフェノールとグアニジンイソチオシアネートの単相溶液精製法と miRNeasy Mini kit を用いたシリカスピンカラム法のいずれの方法で精製したトータル RNA を献体試料としても、tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾のデータに影響を及ぼさないことが明らかになった。定量 PCR 機器のバリデーションについても終了した。

また、2型糖尿病に対する tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の臨床研究計画について PMDA と事前相談を行った。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

委託業務成果報告（業務項目 1）

A. 研究目的

本研究は、2 型糖尿病に対する個別化医療の実現化を目指し、タンパク質翻訳精度を向上させる効果を有する 2 型糖尿病に対する新規治療薬の開発と tRNA^{Lys}(UUU)のチオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の開発のための臨床研究を実施することを目的とする。

このうち本業務項目は、tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾のコンパニオン診断技術の確立とキット化を目的とする。今年度は、tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾測定方法の標準化および最適化を行った。

B. 研究方法

tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の開発：

・ Good Laboratory Practice (GLP)に準拠したコンパニオン診断技術の確立

ヒト末梢血から分離した血球成分からトータル RNA を精製し、ヒト tRNA^{Lys}(UUU)を直接逆転写し、その逆転写産物を定量 PCR することにより tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾を定量する技術の標準化を行った。まず、採血後の血液保存状態が tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾に及ぼす影響を調査するために、健康人ボランティアから採血した血液を以下の条件で保存した。

- ・ 氷上で 30 分、1 時間、2 時間、24 時間
- ・ 室温で 30 分、1 時間、2 時間、24 時間

その後、3,000rpm/分で遠心し、血球成分をトリゾールで可溶化した。そしてトータル RNA を精製し、精製した RNA を従来我々が開発した定量

PCR 法を応用した tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾解析技術を用いて、tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾について比較検討した。

次に RNA 精製法についてトリゾールを用いたフェノールとグアニジンイソシアネートの単相溶液精製法と miRNeasy Mini kit を用いたシリカスピンカラム法で、tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾の検出に差が認められるか検討した。健康人ボランティアから採血した血液を直ちに遠心し、血球成分と血清成分に分画した。分画した血球成分から、トータル RNA をトリゾールならびに miRNeasy Mini kit で精製した。その後、tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾解析技術を用いて、tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾について両方で比較検討した。

tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾解析に用いる定量 PCR 機器について、使用する機器によって tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾の測定結果に差があるのか検討した。野生型 (WT) マウスと Cdkal1 欠損 (KO) マウスの肝臓からトリゾールを用いてトータル RNA を精製した。比較検討した機器は、以下の 3 種類である。

- ・ Veriti 96 皿サーマルサイクラー (アプライド・バイオシステムズ社)
- ・ サーマルサイクラー ダイスレッドシステム TP800 (タカラバイオ社)
- ・ サーマルサイクラー ダイスレッドシステム TP870 (タカラバイオ社)

・ tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾を標的とし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

委託業務成果報告（業務項目 1）

たコンパニオン診断技術に関する臨床研究について PMDA との事前相談

2 型糖尿病に対する tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の臨床研究計画について PMDA と事前相談を行い、コンパニオン診断薬開発のための臨床研究プロトコール作成に資した。

（倫理面への配慮）

tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の開発において、健常人ボランティアから末梢血を採血し、tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾について検討したが、本研究は熊本大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会で承認された方法（承認番号：ゲノム 159）に則り実施した。またインフォームドコンセントに関しても、同委員会で承認された方法に準じて行った。

C . 研究結果

tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の開発：

・ Good Laboratory Practice (GLP)に準拠したコンパニオン診断技術の確立

a . 血液保存状態が tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾に及ぼす影響について検討するために、以下の保存条件について比較検討した。

- ・ 氷上で 30 分、1 時間、2 時間、24 時間
- ・ 室温で 30 分、1 時間、2 時間、24 時間の 8 条件で保存した血液から RNA を精製し、チオメチル化修飾について比較検討した。いずれの条件でも tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾に有意な差は認められなかった。

b . RNA 精製法の標準化

トリゾールを用いたフェノールとグアニジンイソチオシアネートの単相溶液精製法と miRNeasy Mini kit を用いたシリカスピニングラム法で、tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾において、有意な差は認められなかった。いずれの方法を用いても、十分な Ct 値が得られた。

c . tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾解析に用いる定量 PCR 機器の選定

・ Veriti 96 皿サーマルサイクラー（アップライド・バイオシステムズ社）

・ サーマルサイクラー ダイスレッドシステム TP800（タカラバイオ社）

・ サーマルサイクラー ダイスレッドシステム TP870（タカラバイオ社）

上記 3 機種 of tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾検出感度について比較検討した。その結果、3 機種間の検出感度に有意な差は認めなかった。

以上の a~c の条件設定の結果を踏まえて tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾解析の手順書を作成した。（資料 2 参照）

D . 考察

tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の開発

採血した血液は、24 時間常温で保存しても、tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾の結果に影響しないことが明らかになった。このことが

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

委託業務成果報告（業務項目1）

ら、病院で採血後、検査ラボに輸送し、 $tRNA^{Lys}(UUU)$ チオメチル化修飾について解析することが可能であることが示唆された。 $tRNA^{Lys}(UUU)$ チオメチル化修飾の解析を各病院検査部で実施することは、機器の設置などから困難であることが予想されるため、検査ラボで実施するようになると思われる。その場合、血液サンプルの保管方法と輸送時間に制限があると、検査が困難である。本結果から、本技術は、検査ラボで実施するコンパニオン診断技術として問題無いことが示された。

RNA 精製方法で、トリゾールを用いたフェノールとグアニジンイソチオシアネートの単相溶液精製法と miRNeasy Mini kit を用いたシリカスピнкаラム法では、 $tRNA^{Lys}(UUU)$ チオメチル化修飾の解析結果に差は認められなかった。単相溶液精製法のほうが、コストがかからないが、シリカスピнкаラム法を用いたほうが、自動化できるメリットがある。多数検体を一度に効率的に測定できることから、キットでは、シリカスピнкаラム法を用いることとした。

3 機種を用いて定量 PCR を行ったが、機器間で解析結果に差はなかった。このことから、 $tRNA^{Lys}(UUU)$ チオメチル化修飾解析技術は、定量 PCR 解析機器の性状に影響を受けないことが明らかになった。

D. 考察

$tRNA^{Lys}(UUU)$ チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の開発

採血した血液は、24 時間常温で保存しても、

$tRNA^{Lys}(UUU)$ チオメチル化修飾の結果に影響しないことが明らかになった。このことから、病院で採血後、検査ラボに輸送し、 $tRNA^{Lys}(UUU)$ チオメチル化修飾について解析することが可能であることが示唆された。 $tRNA^{Lys}(UUU)$ チオメチル化修飾の解析を各病院検査部で実施することは、機器の設置などから困難であることが予想されるため、検査ラボで実施するようになると思われる。その場合、血液サンプルの保管方法と輸送時間に制限があると、検査が困難である。本結果から、本技術は、検査ラボで実施するコンパニオン診断技術として問題無いことが示された。

RNA 精製方法で、トリゾールを用いたフェノールとグアニジンイソチオシアネートの単相溶液精製法と miRNeasy Mini kit を用いたシリカスピнкаラム法では、 $tRNA^{Lys}(UUU)$ チオメチル化修飾の解析結果に差は認められなかった。単相溶液精製法のほうが、コストがかからないが、シリカスピнкаラム法を用いたほうが、自動化できるメリットがある。多数検体を一度に効率的に測定できることから、キットでは、シリカスピнкаラム法を用いることとした。

3 機種を用いて定量 PCR を行ったが、機器間で解析結果に差はなかった。このことから、 $tRNA^{Lys}(UUU)$ チオメチル化修飾解析技術は、定量 PCR 解析機器の性状に影響を受けないことが明らかになった。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

委託業務成果報告（業務項目 1）

E．結論

tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の開発：ヒト末梢血から分離した血球成分から tRNA^{Lys}(UUU)チオメチル化修飾を定量する技術の標準化を行い、末梢血サンプルの保存方法、逆転写酵素の最適化、定量 PCR 機器の設定が終了した。また、PMDAとの事前相談を行った。

F．健康危機情報

業務主任者ならびに業務担当者の健康に危機を及ぼすようなことは無かった。

G．研究発表

1．論文発表

・ Zhou, B, Wei, F.-Y., Kanai, N., Fujimura, A., Kaitsuka, T., and Tomizawa, K. Identification of a splicing variant that regulates type 2 diabetes risk factor CDKAL1 level by a coding-independent mechanism in human. **Hum. Mol. Genet.** 23, 4639-4650, 2014.

2．学会発表

該当無し

H．知的財産権の出願・登録状況

該当無し。

資料 2

tRNA^{Lys(UUU)}チオメチル化修飾解析手順書

tRNA^{Lys(UUU)}チオメチル化修飾解析手順書

1. ヒト静脈血を抗凝固剤 (EDTA) 入り採血管 (TERUMO®, ベノジェクト II 真空採血管、EDTA-2K、採血管容量 : 5 ml) 内に、1.5 ml 以上採血し、次のステップまで氷上で保存する。
注 : 採血後 24 時間までの氷上保管は、結果に影響しない。
2. 1.5ml の全血に Buffer EL 7.5 ml (QIAGEN GmbH、D-40724 Hilden、Erythrocyte lysis buffer) を加え、滅菌した 15ml 容量のコニカルチューブ中で混和して、氷上で 15 分間、放置する。放置中、4~6 分毎にボルテックスミキサーで 5~10 秒震盪して混合する。
注 :
 1. 最適な結果を得るためには、十分にミックスできるように、血液と Buffer EL の全容量がチューブ容量の 3 / 4 を超えないように、15ml のチューブを使用。
 2. 健康な成人の血液の 1.5ml までが本キットで調整可能。白血球数が 7000 個/ μ l、より多い血液を使用する場合には、血液量を 1.0 ml に減らす。
 3. 氷上で 15 分間放置して、赤血球の溶解によりインキュベーション中に混濁した懸濁液が透明になったのを確認したら、次のステップに移る。
3. 4. 、400 x g で 10 分間遠心分離後、白血球を含む細胞沈殿物を残して上清を完全に除去する。
注 : 遠心分離後、白血球がペレットを形成しているのを確認し、上清を除去。赤血球の痕跡によりペレットふぁ赤味を帯びレイル場合も、次に行うステップにより、赤血球は通常除去される。
4. 細胞ペレットに Buffer EL 3 ml (QIAGEN GmbH、D-40724 Hilden、Erythrocyte lysis buffer) を添加し、軽くボルテックスし、細胞を懸濁する。
5. 4. 、400 x g で 10 分間遠心分離後、上清を完全に除去する。
6. 細胞の沈殿物に Trizol 1 ml (Invitrogen、フェノール 50 %) を加え、10 回ピペティングで完全に溶解させてから 1.5ml のエッペンチューブ (WALSON, Human DNA-Free、RNase-Free、DNase-Free) に移す。
7. Chloroform 0.2 ml (Wako、Ethanol 0.3-1.0 %、純度 99.0 %) を添加し 15 秒で激しく混合し、室温で 3 分間放置する。
8. 4. 、12000 x g で 15 分間遠心分離後、上清 0.5 ml を新しいチューブに回収する。
9. 回収した上清に 2-propanol (Wako、純度 99.7 %) 0.5 ml を添加し、完全に混和してから室温

で 10 分間放置する。

- 10 . 4 、 12000 × g で 10 分間遠心分離後、上清を完全に除去する。
- 11 . ペレットに 75%エタノール 1 ml を添加し、4 、 7500 × g で 5 分間遠心分離し、上清を完全に除去して、室温で 10 分間乾燥する。
- 12 . 滅菌蒸留水 20ml で溶解して、分光光度計 (Nano Drop, ND-100) を使って RNA 濃度を測る。
- 13 . 混入しているゲノム DNA を完全に除去するため、DNaseI と RNA を以下の量で PCR 用 0.2 ml チューブ (BIO-BIK) 内で混合する。

DNaseI recombinant, RNase-Free Kit (Roche、製品番号 : 04 716 728 001) を使用する。

精製した RNA (100ng/ μ l)	2 μ l
DNaseI recombinant	0.5 μ l
Incubation buffer (10x)	2 μ l
滅菌蒸留水	15.5 μ l

PCR 機器 : Veriti™ Thermal Cycler, AB Applied Biosystem (Towa)。

PCR プログラムは以下のように設定する。

37 20 min
75 10min
4 for ever

- 14 . DNase I で処理した後、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, 製品番号 : 04 987 030 001) を用いて逆転写を行う。以下の溶液を PCR 用 0.2 ml チューブ内で混合する。

Lys primer r1: 配列 CCTGGACCCTCAGATTA AAA、逆相カラム精製、 T11H250129, Tm 45.9, 製品会社 : FASMAC。

Lys primer r2 : 配列 GAACAGGGACTTGAACCCTG、逆相カラム精製、 T11H250133, Tm 50、製品会社 : FASMAC。

Dnase I 処理済み RNA (13)	2.5 μ l
Lys primer r1 又は r2 (10 μ M)	1 μ l
滅菌蒸留水	3 μ l

65、10min 処理した後、氷上で急冷する。

同一チューブに以下の溶液を加えて逆転写を行う。

5xbuffer	2 μ l
RNASE inhibitor	0.25 μ l
dNTPmix	1 μ l
RT enzyme	0.25 μ l

PCR 機械: Veriti™ Thermal Cycler, AB Applied Biosystem (Towa)。

PCR プログラムは以下のように設定する。

55	30min
85	5min
4	for ever

15. 修飾の程度を検出するために定量 PCR を行う。ここでは SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time), TAKARA を使用し、以下の溶液を混合する。

Lys primer f1: 配列 AGCATCAGACTTTTAATCTG、逆相カラム精製、T11H250132, Tm 41.8、製品会社: FASMAC。

SYBR Premix Ex Taq (2x)	10 μ l
Lys primer f1 (10 μ M)	0.4 μ l
Lys primer r1 (10 μ M)	0.4 μ l
ROX Reference Dye (50x)	0.4 μ l
RT PCR の産物 (14)	2 μ l
滅菌蒸留水	6.8 μ l

16. 混和したサンプルを定量 PCR 機器 (7300 Real-Time PCR System, Applied Biosystems) に写し、下記の条件で PCR 反応を行う。

Stage 1: Holding Stage

Reps: 1

95 30 秒

Stage 2: Cycling Stage

Number of Cycles: 40

95 5 秒

60 31 秒

Stage 3: Dissociation Stage

17. 反応終了後、プレートドキュメントの設定で解析を行う。解析は Auto Baseline 及び Auto Ct で行う。
 1. [Analysis]メニューより[Analysis Settings]を選ぶ。
 2. [Detector]ドロップダウンリストで[All]を選び、[Auto Ct]を選ぶ。SDS ソフトウェアが各ウェルのベースラインとスレッシュホールドを自動的に決定する。
 3. [OK & Reanalyze]をクリックして解析する。
 4. [Report]をクリックし、[Ct]欄で各 Detector の数値が表示される。
 5. 各サンプルの primer r2 の[Ct]数値から primer r1 の[Ct]数値の差を計算し、[dCt] の数値を求める。得られた[dCt]数値を negative control の[dCt]数値と比較し、tRNA^{Lys(UUU)}チオメチル化修飾の差を検討する。