

(特集：教育講演・第26回年次学術集会より)

マイクロRNA解析の臨床応用

梅村 創

MicroRNAs as the new disease biomarker

Tsukuru Umemura

Summary MicroRNAs (miRNAs) are short RNAs with a length of 20-25 nucleotides, which negatively regulate target genes at the post-transcriptional level by degrading the complementary mRNA or by inhibiting its translation. miRNAs play an important role in cell development, proliferation, differentiation, and apoptosis. Recent studies have shown that miRNAs circulate as stable forms in microparticles, exosomes, apoptotic bodies, and protein or lipid complexes. Although a large part of the circulating miRNAs in the plasma or serum is of blood cell origin, plasma, circulating miRNAs are expected to be useful non-invasive biomarkers for various diseases. This review focuses on the standardization of miRNA analysis and its usefulness as a disease biomarker.

Key words:

I. はじめに

生体の働きは、遺伝子が messenger RNA (mRNA) へ転写され、タンパク質へ翻訳されて機能することで維持されている (セントラルドグマ)。この過程は、遺伝子のメチル化、ヒストンタンパクの修飾やマイクロRNA (miRNA) により調節されていることが明らかになってきた (エピジェネティクス)。マイクロRNAは、20塩基前後の短鎖RNAであり、標的遺伝子のmRNAに結合し遺伝子発現を調節することで生命活動に関与している。細胞内のみならず多くの体液中に存在し、個体発生、細胞増殖・分化、アポトーシス、腫瘍化に関与しており、その解析・応用は新規バイオマーカーや治療法の開発につながると大いに期待されている。

血液中を循環する miRNA はいくつかの異なる分子型で存在している。その一つは、マイクロパーティクル (MP) に含まれるマイクロRNA である。2番目の分子型は、エクソソーム内マイクロRNA である。細胞外液に浮遊するエクソソーム (exosome) は細胞内 multivesicular body (MVB) で産生され exocytosis により放出される直径 50-100 nm の小胞体である。3番目の分子型として、アポトーシス小体内マイクロRNA があげられる。細胞内マイクロRNA プロフィールをより反映している。4番目の分子型は、HDL 結合マイクロRNA である。内因性の HDL はマイクロRNA を結合し他の細胞へ運搬することが報告されている。5番目の分子型は Argonaute2 (Ago2) 結合マイクロRNA である。結合している miRNA のプロフィールは、細胞内プロフィールと異なることが知られてい

国際医療福祉大学 福岡保健医療学部 医学検査学科
〒831-8501 福岡県大川市榎津137-1
Email : yasuda@agr.u-ryukyuu.ac.jp

Department of Medical Technology and Sciences,
International University of Health and Welfare
137-1 Enokizu, Ohkawa, Fukuoka 831-8501, Japan.

る。

血漿マイクロRNAが極めて有用なバイオマーカーとする報告が蓄積されてきた一方で、その測定方法が統一されておらず、同じマイクロRNAを測定しても定量的PCR法のサイクル数で4から5の相違がでることが示されている。これは相対比で2の4乗から5乗（16から32倍）の差であり、データとしての相互比較が期待できない。マイクロRNA測定法の標準化が達成されてこそ、バイオマーカーとしての評価が定まると考えられる。マイクロRNA解析に影響する解析前要素としては、1) 血漿か血清か、2) 採血法、3) 血漿（血清）分離法、4) 保存法、5) 抽出法、があげられる。我々のデータを交えて克服すべき課題を解説する。

II. マイクロRNA解析の現状

約2万数千種類といわれるヒトの遺伝子は、ゲノム上では約2%を占めるにすぎないといわれている。一方、マイクロRNAは約20塩基の短鎖RNAであり、ゲノム上で多くは非コード領域から転写され発現してくる。発現したマイクロRNAの前駆体は、核内および細胞内のRNA分解酵素（Drosha、DicerまたはArgonaute2: Ago2）で切り出され、成熟したマイクロRNAとなる。マイクロRNAは蛋白と複合体を形成し（RNA-induced silencing complex : RISC）、標

的messenger RNA (mRNA) と結合して、mRNAの分解や翻訳の阻害により、標的遺伝子の発現量を抑制的に調節する遺伝子発現のチューナーの役割を担っている¹⁾⁻³⁾。したがって、ヒストン蛋白のアセチル化や遺伝子のメチル化機構と共にエピジェネティックな遺伝子調節機構を構築している分子である (Fig. 1)。現在、ヒトマイクロRNAは約2,500種報告されている。その詳細はmiRBase (<http://www.mirbase.org>) で確認できる。

マイクロRNA解析の試料としては多くの検体が使われている (Table 1)。中でも血漿または血清は低侵襲的に得られる試料であり、最も解析の対象として使われている。測定プラットフォームとしては、網羅的に発現プロファイルを解析できるアレイ解析や次世代シーケン解析、定量的な測定ではリアルタイムPCR法、遺伝子増幅を使用しない方法として注目されるナノ粒子による解析法や質量分析装置による解析法、などがある。網羅的方法は、マイクロRNAの研究のアプローチでは必須であるが、臨床応用を考えると迅速性、費用対効果などの面から適していない。ナノ粒子を用いる方法は、迅速で安価であり、これからの発展が期待される (Table 2)^{4),5)}。

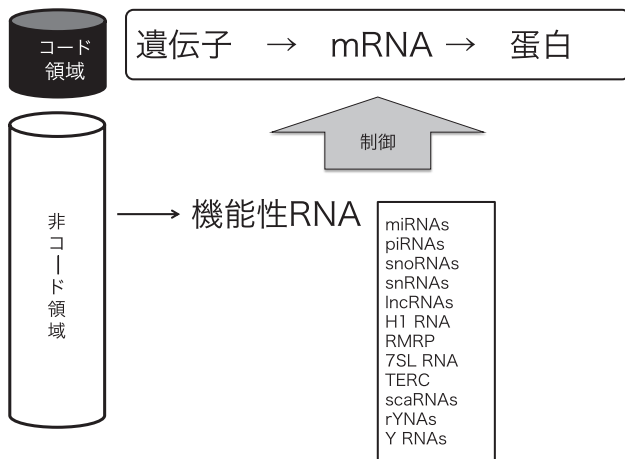


Figure 1. Functioning RNAs transcribed from non-coding region

Table 1. Numbers of miRNA researches using different body materials (by PubMed, 20160213)

生体試料	論文数
血清	2185
血漿	1693
尿	312
唾液	127
便	73

Table 2. Platforms for miRNA analysis

解析法	特徴
マイクロアレイ	全体の発現プロフィールをみることができる。合理的なコスト、処理能力。配列が既知のmiRNAに限られる。類似配列との区別が難しい。相当量のサンプルが必要。
定量的リアルタイムPCR	高い感度を持つ。高価で処理能力が低い。配列が既知のmiRNAに限られる。類似配列との区別が難しい。相当量の試料が必要。
次世代シーケンズ解析	少量のサンプルから解析可能。類似配列を区別する。miRNAの長さの変化にも対応する。高価であり、サンプリング過程でバイアスが生じる可能性がある。得られる大量データの解析・保存。
ナノ粒子を利用したmiRNA解析	ナノ粒子を利用した温度サイクルを用いない検出法。迅速で安価。肉眼による判定可能でPOCTに利用できる。
質量分析	1塩基の相違を検出可能(isomirの鑑別)。大型機器が必要。

Ⅲ. バイオマーカーとしての循環マイクロRNA

マイクロRNAは機能性RNAとして細胞内の標的遺伝子発現を制御することにより生体機能を調節しているだけでなく、細胞外にも多量のマイクロRNAが分泌されており、近傍や遠隔細胞の遺伝子調節にも関与している^{6)~8)}。血液中では前述のように五つの分子型で循環している^{7)~9)} (Table 3)。なかでもエクソソームは血球、免疫担当細胞や癌細胞から多量分泌され、しかも細胞内マイクロRNAプロファイルとは異なるプロファイルでマイクロRNAを運搬している。したがって、細胞死に伴い放出されるABマイクロRNAや細胞断片に含まれるマイクロRNAとは異なり、細胞が能動的メッセージとして放出し、ホメオスタシスや疾患の病態形成に関与すると考えられる¹⁰⁾。これら循環微小

胞にはマイクロRNAの他、DNA、mRNA、タンパクなどがそれぞれ細胞内とは異なるプロファイルで内包され血液中を運搬されている¹⁰⁾。循環マイクロRNAもその多くはエクソソームなどの小胞構造物に内包されて存在しており、生体機能や様々な病態に特異的に変動していることが知られてきた。循環マイクロRNAは病態を知る有用なバイオマーカーと考えられる^{11),12)}。

循環マイクロRNAの多くは血球由来と考えられており、赤血球由来のmiR-451、miR-16、白血球由来のmiR-223、血小板由来のmiR-126などは血漿や血清中でも濃度が高い^{12),13)}。感染症など炎症性疾患では、免疫担当細胞からのエクソソームが血中に放出される。そのエクソソーム内マイクロRNAも循環マイクロRNAとして測定される¹⁴⁾。腫瘍細胞は活発にエクソソームマイクロRNAを分泌し、miR-21、miR-17-92、などは腫瘍マーカーとしての報告が多い^{15),16)}。循環マイクロRNAの半減期や代謝経路についてはまだ不明の点が多く、尿中への排泄、他の細胞による取り込み、などの機序が考えられる。

Table 3. Sizes of circulating particles

サイズ	循環物質
8-12 μm	細胞 (赤血球など)
1-5 μm	血小板 アポトーシス小体
100 nm-1 μm	マイクロパーティクル 細菌 蛋白複合体
30-100 nm	エクソソーム ウイルス

Ⅲ. マイクロRNA解析法の標準化

1. 採血時の溶血の影響

血液は低侵襲で得られる生体試料ではあるが、採血時に生じる赤血球破壊 (採血時溶血) による影響が避けられない¹⁷⁾。赤血球は無核の細胞であるが多量のマイクロRNAを含有して

おり¹⁸⁾、採血時溶血では赤血球内マイクロRNA、特にmiR-451やmiR-16が血漿・血清中に混入する。これらのマイクロRNA解析の際は、検体の溶血をヘモグロビン濃度でチェックする必要がある (Fig. 2)¹⁷⁾。

2. 採血後放置による試験管内での血球からの放出

循環マイクロRNAのソースとしては血球が重要であり^{13), 19)}、したがって採血後の試験管内での血球からの放出もマイクロRNA解析結果

を修飾する因子となる。採血後の放置や血球破壊は、溶血と同様に白血球や血小板由来マイクロRNAの放出に繋がり、解析結果を修飾する (Fig.3)。

3. 血漿・血清の分離条件の違い

循環マイクロRNAのプロファイルや測定値が血漿の分離方法で異なることも、バイオマーカーとしてマイクロRNAを解析する際に注意が必要である。たとえば、miR-142-3p、miR-223、let-7aは血小板除去により測定値が著明に低下し、血小板から混入していると考えられる。

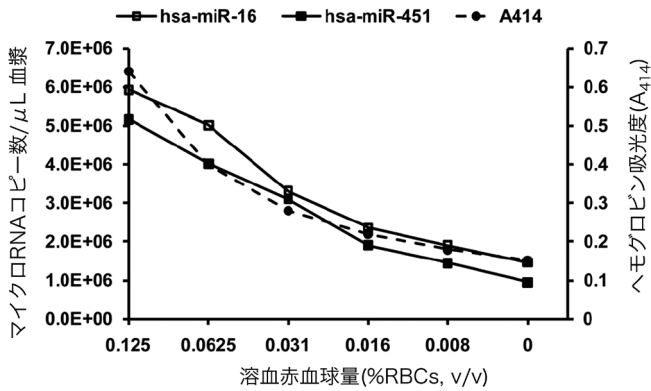


Figure 2. Effects of hemolysis on miRNA assays¹⁷⁾.

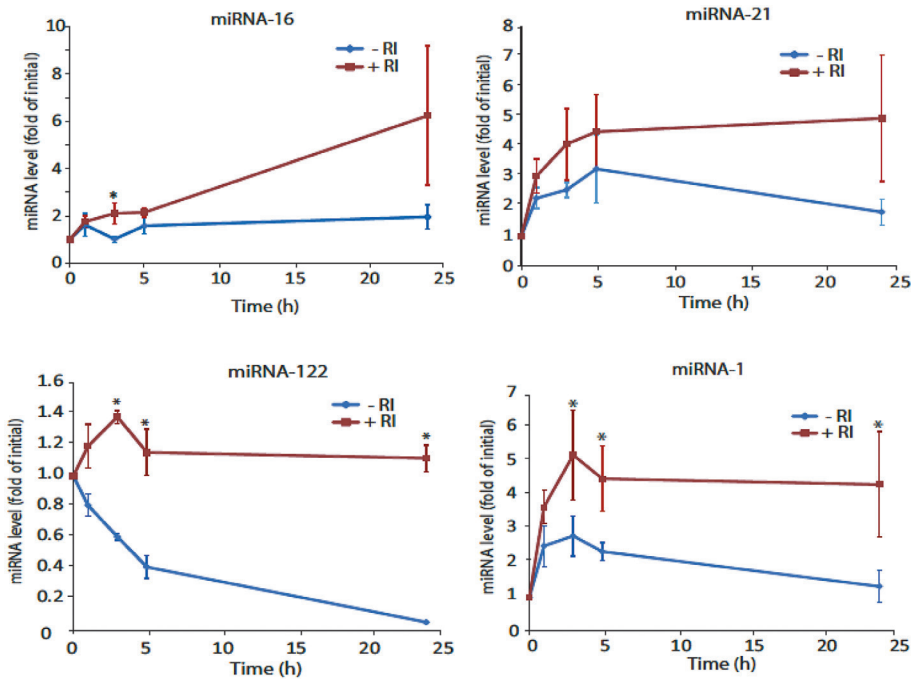


Figure 3. Stabilities of circulating²²⁾. RI: RNase inhibitor.

一方、赤血球 (miR-451) や肝細胞 (miR-122) が主なソースであるマイクロRNA濃度は、血小板の存在は測定結果に影響しない²⁰⁾。血漿そのもののマイクロRNAプロファイル解析を目的とする場合、採血後に高速遠心法またはフィルタ濾過により血小板欠乏血漿とすることが重要である。

現時点では、循環しているマイクロパーティクルやエクソソームに含まれるマイクロRNAプロファイルやそれぞれの意義について不明なところが多い。今後のさらなる解析が望まれる。

4. 分離後の試験管内安定性

生体試料の中でマイクロRNAは安定であることは広く知られている。特に、循環マイクロRNAは冷凍保存で長期間安定である。採血後かなりのマイクロRNAは分解されているとの観察もあり²¹⁾、マイクロRNAの種類により試験管内安定性が大きく異なる可能性がある。血清中のmiR-1/miR-122は放置5時間で大きく低下するが、miR-16、miR-21、miR-142-3pは低下はわずかであり、解析の対象とするマイクロRNAにより安定性が異なることはバイオマーカーとしては留意すべき点である²²⁾。血清にRNA分解酵素阻害剤を添加することで試験管内不安定性は減少し、マイクロRNAの分解がマイクロRNAの存在形式、特にマイクロパーティクルやエクソソーム内に存在するか否かで大きく異なることが示唆される (Fig. 3)。

前述したように、最近のマイクロRNA研究は血漿又は血清を試料とするものが多く、解析結果の違いが課題である。血漿マイクロRNA値が血清マイクロRNA値よりも高いとする報告が多いが (Fig. 4)²¹⁾、差がないとするものもあり、さらなる検討が必要である。マイクロRNA解析の実用化を考えると、多くの生化学検査項目が血清を使用していることから、今後は血清を用いた解析がより普及すると予想される。

5. 生理的変動

マイクロRNA値の性差に関する報告はあまりないのが、我々の未発表データも含めて性差は無いと考えられる²³⁾。また対象を経時的に観察した研究では、日内変動は無く少なくとも1ヶ月間の経時観察では変動がないとされている²³⁾。

6. 内部コントロール

遺伝子発現解析では、試料の保存状態、RNA抽出効率や測定のパラツキを補正する目的で標準となる内部コントロール遺伝子を設定する。mRNA解析ではhouse keeping遺伝子を内部コントロールとする。細胞内マイクロRNA解析の場合は組織特異性がなく定常的に発現しているマイクロRNAであるlet-7や、短鎖RNAであるBUN6などを内部コントロールとすることが多い。一方、循環マイクロRNA解析では、個体差や生理的変動のなく適切な内部コントロール

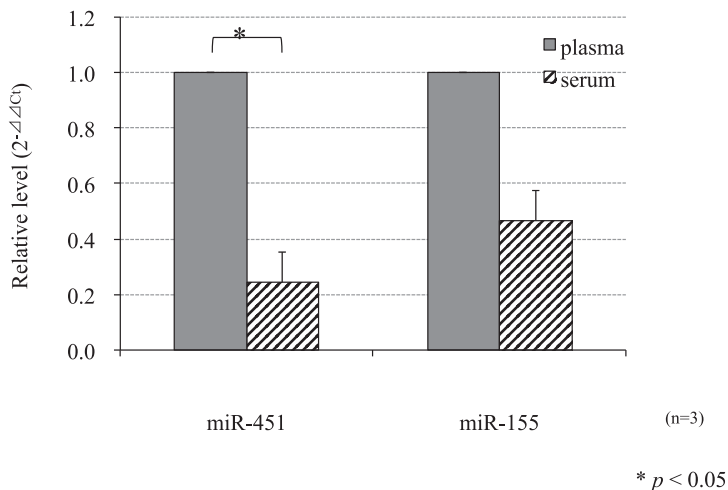


Figure 4. Reduction of miRNA levels in serum samples²¹⁾.

となるマイクロRNAがまだ確定していないのが現状である。比較的血中レベルが高く安定して存在するmiR-16などが使用されている。また、線虫のcel-miR-39など、ヒト以外の生物種のマイクロRNAを既知濃度添加し、spiked-in コントロールとする場合も多い (Table 4)^{24)–26)}。MacLellanらは、miR-99a-5pやmiR-139-5pが血清マイクロRNAの内部コントロールとして優れているとしている²⁶⁾。いずれの場合も、対象マイクロRNAと内部コントロールの測定値の差を算出し (ΔCt 値)、その後正常群との差や治療前後の測定値の差を ΔCt 値の差として表現し ($\Delta \Delta Ct$ 値) 解析することが一般的である²⁷⁾。

Ⅳ. バイオマーカーとして進む臨床応用

1. がんとマイクロRNA

マイクロRNAは標的遺伝子の発現を低下させることで遺伝子機能を調整している。したがってがん遺伝子を標的とするマイクロRNAはanti-oncomir、がん抑制遺伝子を標的とするものはoncomirとして機能する。がん組織におけるマイクロRNA発現異常を見ると、一種類のマイクロRNAの発現異常が複数のがんで認められることがわかる (Table 5)¹⁵⁾。代表的なoncomirとして、6種類のmiRNAからなるmiR-17-92クラスター (miR-17, miR-18a, miR-19a,

Table 4. Internal controls for miRNA assay

miRNA	検体	疾患	文献
miR-638	血漿	急性白血病	Tanaka et al., 2009
let-7a	血清	肺がん	Chen et al., 2008
miR-142-3p & 16	血漿	卵巣がん	Resnick et al., 2009
miR-16	血清	びまん性大細胞性Bリンパ腫	Lawrie et al., 2008
miR-16	血漿	胃がん	Tsujiura et al., 2010
miR-16	血漿	膵がん	Wang et al., 2009 & Ho et al., 2010
miR-16	血清	肝がん	Yamamoto et al., 2009
miR-16	血清	横紋筋肉腫	Miyachi et al., 2010
miR-16	血清	舌扁平上皮がん	Park et al., 2009 & Liu et al., 2010
U6 & miR-16	唾液、血漿	口腔扁平上皮がん	Wong et al., 2008
U6	血漿	大腸がん	Ng et al., 2009
U6	尿	膀胱がん	Hanke et al., 2010
U6 & 18s RNA	血清	乳がん	Zhu et al., 2008 & Heneghan et al., 2010
U6, RNU6B & miR-16	血清	B型肝炎	Zhu et al., 2012

Zhang et al., 2012

Table 5. Dysregulation of miRNAs in cancer

miRNA	染色体部位	機能	低下	上昇
let-7a-2	11q24	antioncomir	乳・肺・大腸・卵巣・胃がん	
miR-15/16	13q31	antioncomir	慢性リンパ性白血病、前立腺がん、脳下垂体腺腫	
miR-29 family	7q32, 1q30	antioncomir	急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、肺・乳・肝がん、リンパ腫、横紋筋肉腫	
miR-34 family	1p36, 11q23	antioncomir	大腸・肺・乳・腎・膀胱がん	
miR-26a	3p22	antioncomir	肝がん	
miR-200 family	1p36, 12p13	antioncomir	乳がん	
miR-155	21q21	oncomir		ハイリスク慢性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、乳・肺・大腸がん、リンパ腫
miR-21	17q23	oncomir		肺・乳・膵・胃・前立腺がん、慢性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、膠様細胞芽腫、骨髄腫
miR-221/222	Xp11	oncomir		乳腺・肺・肝・甲状腺がん
miR-17/92 cluster	13q22	oncomir		肺・乳・大腸がん

Di Leva & Croce, 2013

miR-20a, miR-196-1, miR-92a-1) をあげることができる。多くの白血病や固形癌（乳がん、大腸癌など）で発現が亢進している。大腸癌、胃癌、膀胱癌、前立腺癌、肺癌などでは、miR-21の高発現が報告されている。

日本でも毎年約5万人が死亡している大腸がんでは、早期発見のための検査法が求められている。世界的にもがん死亡の第4位を占め、マイクロRNAをバイオマーカーとする試みが多数報告されている²¹⁾。2015年の筆者らによる調査では、血清を解析したものの13編、血漿を解析したものの10編、便を試料としたものの8編であった。大腸がん患者で血中レベルが上昇するものの中ではmiR-21、miR-29a、の報告が多く、低下するものではmiR-31、miR-92a、miR-203、などである (Table 6)。便中マイクロRNAの解析結果ではmiR-21、miR-106aの上昇、miR-145の低下などの異常が認められた。今後、簡易化したマイクロRNAのチップ解析でさらに感度、特異性の改善が進むと期待される。大腸がんのマイクロRNA解析の結果を見ても、共通して発現異常が見られるマイクロRNAと比較的特異的に異常が認められるものが混在している。最近の報告では、同じがん種に限って見ても複数のマイクロRNAをセットで測定することにより、感度と特異性を得る方向にある²⁸⁾。

単一のマイクロRNAに着目して解析するこ

とも成果を上げつつある。アスベスト暴露を引き金に発症する悪性中皮腫では、第9番染色体短腕の部分欠失によりがん抑制遺伝子機能を持つp16遺伝子の欠損が高頻度で生じている。p16遺伝子のごく近傍にマイクロRNA、miR-31が位置している。25例の悪性中皮腫症例の腫瘍組織でのmiR-31を解析したところ、高発現を示す症例の組織型は肉腫型が多く、予後解析でも発現が低下している症例に比べて有意に生存率の低下を認めた (Fig. 5)²⁹⁾。

白血病でもマイクロRNAの発現異常が報告されている^{30),31)}。miR-15aとmiR-16-1はクラスターを形成して第13番染色体長腕 (13q14) に位置しているが、慢性リンパ性白血病患者の68

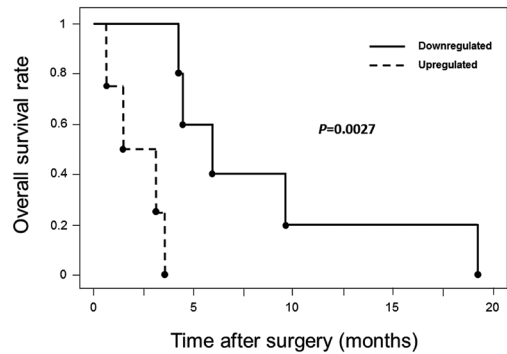


Figure 5. Upregulation of miR-31 predicts poor prognosis of malignant mesothelioma²⁹⁾.

Table 6. Results of serum miRNA analysis for screening colorectal cancer

著者	発表年	検索数	解析方法	結果		内部コントロール	感度	特異性	AUC
				up-regulated	down-regulated				
Ahmed et al.	2009	30	RT-qPCR semi quantitative PCR	miR-21, miR-106a, miR-96, miR-203, miR-20a, miR-326, miR-92	miR-320, miR-126, miR-484-5p, miR-143, miR-145, miR-16, miR-125b	18S rRNA	n.a.	n.a.	n.a.
Link et al.	2010	37	Illumina RT-qPCR	miR-21, miR-106a		miR-16, miR-26b	n.a.	n.a.	n.a.
Kalimutho et al.	2011	28	methylation-specific PCR	hypermethylation of miR-34b/c in 75% of cancer, while only in 16% of high-grade dysplasia.		RNU19, RNU6B	n.a.	n.a.	n.a.
Kalimutho et al.	2011	35	RT-pre-amplification-microarray RT-qPCR	miR-144*		Ct value	74	87	0.829
Wu et al.	2012	246	RT-qPCR	miR-21, miR-92a		Ct value	81.8	68.4	miR-21 0.64 miR-92a 0.78
Li et al.	2012	51	RT-qPCR		miR-143, miR-145	miR-16	n.a.	n.a.	n.a.
Koga et al.	2013	224	RT-qPCR	miR-106a		miR-24	70.9	96.3	n.a.
Wu et al.	2014	424	array RT-qPCR	miR-135b		spiked-in synthetic miRNA	68	80	0.79

%でこのクラスターが欠損、または発現低下している。二つのマイクロRNAの標的遺伝子は、細胞の不滅化遺伝子であるBcl-2遺伝子であり、miR-15aとmiR-16-1によりBcl-2遺伝子発現が亢進し、結果としてリンパ球を腫瘍化させている³¹⁾。

慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia, CML) では、白血病化の最も重要な分子機構として染色体転座、t(9;22)(q34;q11.2)による融合遺伝子、BCR-ABLの形成があげられる。我々はBCR-ABL陽性白血病株化細胞でABL癌遺伝子を標的とするmiR-203遺伝子の発現が低下しており、その機序としてmiR-203のプロモーター領域のメチル化を示した。一方、CMLの分子標的治療薬イマチニブは、miR-203の発現を脱メチル化により誘導し、BCR-ABL発現を抑制し細胞の増殖を抑制した。このイマチニブによる効果は、miR-203のインヒビターであるanti-miR-203を投与することで打ち消された。この解析から、分子標的薬、イマチニブの効果の1つに、anticonomirの脱メチル化によるBCR-ABL癌遺伝子抑制機序があることを示した (Fig. 6)³²⁾。

がんバイオマーカーとしての有用性や治療の応用が多く報告で示されており、今後、早期

診断や治療への応用が期待される。

2. 感染症とマイクロRNA

感染症で循環マイクロRNAが変化することからバイオマーカーとして有用である。ヒト後天性免疫不全症でのmiR-150やmiR-146b-5p³³⁾、肝炎でのmiR-122、miR-21、miR-34a³⁴⁾、結核症ではmiR-361-5p/miR-29c³⁵⁾、デング熱におけるmiR-147³⁶⁾などが報告されている。筆者らは三日熱マラリアの血漿マイクロRNAを解析し、

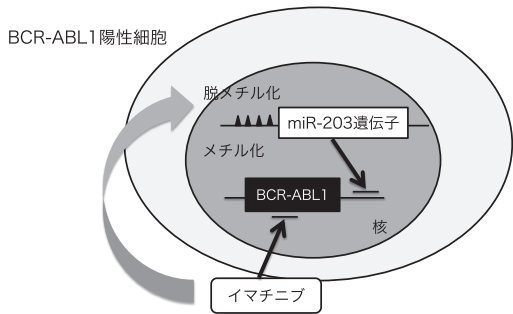


Figure 6. Imatinib induces demethylation of miR-203 resulting in inhibition of BCR-ABL1-positive leukemic cells³²⁾.

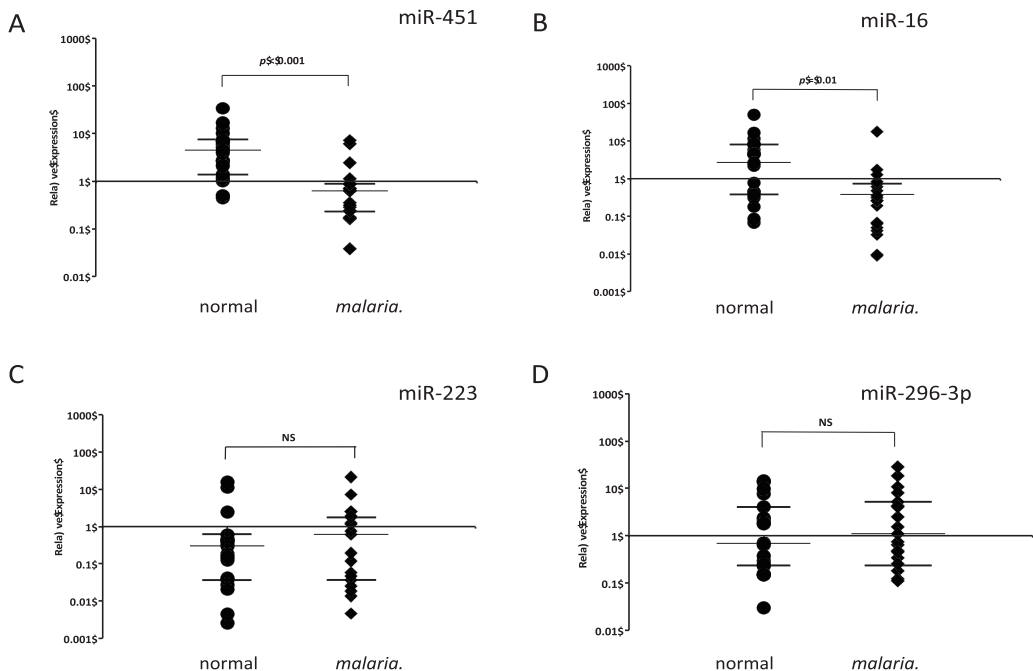


Figure 7. Downregulation of plasma miR-451 and miR-16 in patients with malaria infection³⁷⁾.

miR-451およびmiR-16が低下する知見を得た (Fig. 7)。この低下はマラリア原虫感染赤血球の比率と逆相関しており重症度判定にも有用であった³⁷⁾。マラリア感染は、現在でも世界中で毎年約100万人の人々が命を落とし、克服すべき熱帯感染症の一つである。なかでも熱帯熱マラリアの死亡率は高く、感染初期に的確な診断を得ることが重要である。診断の遅れは脳マラリアや出血熱の合併のリスクを高める。現在のマラリア診断は形態学的検査、遺伝子診断法によっている。多くの症例が熱帯地域の山岳地域で発症することもあり、現在でも血液塗抹標本の観察による形態学的検査に基づいてなされ偽陰性も多い。感染症診断においても、マイクロRNAが低侵襲性のバイオマーカーとして注目されている。

3. サラセミア

サラセミアは地中海地方、中東、アジア、アフリカに多く見られる遺伝性溶血性貧血であり、遺伝性疾患では最も多い疾患である。貧血、発育障害、肝障害、鉄過剰症、易感染性などを抱え、生涯にわたる輸血、除鉄療法や骨髄移植による治療が必要であり、その予防とコントロールが大きな課題となっている³⁸⁾。遺伝子診断による病型と重症度の決定が最も有効な予防・コントロールとなるが、その罹患者の多さからより簡便・迅速で正確なバイオマーカーが求められる。筆者らは無効造血を病態の主体とし、骨髄内での赤芽球崩壊を称しているβ-サラセミアに着目し血漿マイクロRNA解析を行った。赤血球系細胞の成熟過程で特異的に発現してくるmiR-451、および未熟な血液細胞に発現しているmiR-155を解析した (in press)。この2種類のマイクロRNAは、サラセミアの病態による無効造血で崩壊する赤芽球から多量に循環血液中に放出されると考えられ、βサラセミア患者の血漿中に増加していた。診断のみならず重症度の判定にも有用であった。循環している成熟赤血球にはmiR-155は微量しか含まれず、赤血球寿命の短縮による溶血性貧血との鑑別にmiR-155解析は有用であると期待される。

V. 今後の課題と展望

マイクロRNAは比較的安定なバイオマーカーではあるが、微小胞、エクソソーム、タンパク、HDL、アポトーシス小体のそれぞれの分子型により、生体における役割、病態のバイオマーカーとしての有用性も異なると考えられる。産生メカニズム、代謝経路、寿命など、分子型ごとの動態がさらに解明されることにより、さらに価値のあるバイオマーカーが創出されると期待される。

文献

- 1) Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116: 281-297, 2004
- 2) Siomi H, Siomi MC. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol Cell* 38, 323-32, 2010.
- 3) Ambros V et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9, 277-279, 2003.
- 4) Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, Bora A, et al.. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of Extracellular Vesicles* 2: 20360, 2013
- 5) Kirschner MB, van Zandwijk N, Reid G. Cell-free microRNAs: potential biomarkers in need of standardized reporting. *Frontiers in Genetics*, 4, Article 56, 2013 .
- 6) Valadi H et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology* 9, 654-659, 2007.
- 7) Hunter MP et al. Detection of microRNA Expression in Human Peripheral Blood Microvesicles. *Plos ONE* 3, e3694, 2008.
- 8) György B, Szabó TG, Pászto M et al.. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles *Cell. Mol. Life Sci.* 68: 2667-2688, 2011.
- 9) Zampetaki A. et al. Profiling of circulating microRNAs: from single biomarkers to re-wired networks. *Cardiovascular Research* 93, 555-562, 2012.
- 10) Inal JM et al., Blood/plasma secretome and microvesicles. *BBA* 1834: 2317-2325, 2013.
- 11) Mitchell PS et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 10513-8, 2008.
- 12) Reid G et al. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Critical*

- Reviews in Oncology/Hematology 80, 193-208, 2010.
- 13) Pritchard CC, Kroh E, Wood B, et al.. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res (Phila)*, 5: 492-497, 2012.
 - 14) Verma P, Pandey RK, Prajapati P, et al.. Circulating MicroRNAs: Potential and Emerging Biomarkers for Diagnosis of Human Infectious Diseases. *Frontiers in Microbiology*, 7, Article 1274, 2016
 - 15) Di Leva G, Briskin D, Croce CM. MicroRNA in cancer: New hopes for antineoplastic chemotherapy. *Upsala Journal of Medical Sciences*. Early Online, 1-15, 2012.
 - 16) Frixa T, Donzelli S, Blandino G. Oncogenic MicroRNAs: Key Players in Malignant Transformation. *Cancers* 7, 2466-2485, 2015.
 - 17) Kirschner MB et al. Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *Plos One* 6 e24145, 2011.
 - 18) Masaki S et al. Expression patterns of microRNAs 155 and 451 during normal human erythropoiesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 364: 509-514, 2007.
 - 19) Duttagupta R, Jiang R, Gollub J, Getts RC, Jones KW: Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. *PLoS One*, 6: e20769, 2011.
 - 20) Cheng HH, Yi HS, Kim Y, et al.. Plasma Processing Conditions Substantially Influence Circulating microRNA Biomarker Levels. *PLOS ONE*, 8, e64795, 2013.
 - 21) 梅村 創、黒木 千恵理. 多戦略の大腸癌バイオマーカー開発「血液検体のmicroRNA解析」. *Rinsho Byori*, 63: 336-346, 2015
 - 22) Koberle V, Kakoschky B, Ibrahim AA, Schmithals C, Peveling-Oberhag J, Zeuzem S, Kronenberger B, Waidmann O, Pleli T, Piiper A. Vesicle-associated microRNAs are released from blood cells on incubation of blood samples. *Transl Res*. 169: 40-6, 2016.
 - 23) Mooney C, Raoof R, El-Naggar H, et al.. High Throughput qPCR Expression Profiling of Circulating MicroRNAs Reveals Minimal Sex and Sample Timing-Related Variation in Plasma of Healthy Volunteers. *PLOS ONE*, 0145316, 2015
 - 24) JZhang J, Zhao H, Yuan Gao, Zhang W. Secretory miRNAs as novel cancer biomarkers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1826, 32-43, 2012
 - 25) Niu Y, Wu Y, Huang J, et al.. Identification of reference genes for circulating microRNA analysis in colorectal cancer. *Scientific Reports*, 6: 35611, 2016.
 - 26) MacLellan SA, MacAulay C, Lam S, Garnis C. Pre-profiling factors influencing serum microRNA levels. *BMC Clinical Pathology*, 14: 27, 2014
 - 27) Schmittgen TD, Lee EJ, Jiang J, et al.. Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods* 44, 31-38, 2008.
 - 28) Huang Z, Zhu D, Wu L, He M, et al.. Six Serum-Based miRNAs as Potential Diagnostic Biomarkers for Gastric Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2016, [Epub ahead of print]
 - 29) Matsumoto S, Nabeshima K, Hamasaki M, Shibuta T, Umemura T. Upregulation of microRNA-31 associates with a poor prognosis of malignant pleural mesothelioma with sarcomatoid component. *Med Oncol* 31: 303, 2014.
 - 30) Yeh C-H, Moles R, Nicot C. Clinical significance of microRNAs in chronic and acute human leukemia. *Molecular Cancer* 15: 37, 2016.
 - 31) Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature Reviews* 10, 704-714, 2009.
 - 32) Shibuta T et al. Imatinib induces demethylation of miR-203 gene: An epigenetic mechanism of anti-tumor effect of imatinib. *Leukemia Research* 37, 1278-1286, 2013
 - 33) Houzet L, Yeung ML, DeLame V, et al.. MicroRNA profile changes in human immunodeficiency virus type1 (HIV-1) seropositive individuals. *Retrovirology*, 118, 2008.
 - 34) Cermelli S, Ruggieri A, Marrero JA, Ioannou GN, Beretta L. Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis and non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS ONE*, 6: e23937, 2011.
 - 35) Qi Y, Cui L, Ge Y, et al.. Altered serum microRNAs as biomarkers for the early diagnosis of pulmonary tuberculosis infection. *BMC Infect. Dis.* 12: 384, 2012.
 - 36) Tolfvenstam T, Lindblom A, Schreiber MJ et al.. Characterization of early host responses in adults with dengue disease. *BMC Infectious Diseases* 11: 209, 2011.
 - 37) Chamnanchanunt S, Kuroki C, Desakorn V, et al.. Downregulation of plasma miR-451 and miR-16 in *Plasmodium vivax* infection. *Experimental Parasitology* 155: 19-25, 2015.
 - 38) Fucharoen S, Weatherall DJ. Progress Toward the Control and Management of the Thalassemias. *Hematol Oncol Clin N Am* 30: 359-371, 2016