

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670263

研究課題名(和文) 前房水短鎖RNAの網羅的解析による新規緑内障マーカー探索と機能評価

研究課題名(英文) Search for RNA Biomarker in Aqueous Humor from patients by Comprehensive Transcriptome Analysis

研究代表者

田中 佑治 (Tanaka, Yuji)

国立研究開発法人理化学研究所・情報基盤センター・センター研究員

研究者番号：40625513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： 僅か数100μLの眼疾患患者由来前房水から微量のRNAを抽出し、次世代シーケンサーなどを用いた網羅的なRNA解析を試みた。1つの臨床検体から約360種類のmicroRNAを検出することに成功し、そのうちの約3分の1が白内障8検体で共通して検出された。これらの中で発現量上位40位のうち75%が研究期間中に報告された他研究と一致していた。サンプルを混合せずに個別に網羅的解析を試みた研究としては、研究期間初期に報告した我々のマイクロアレイ解析が初めてであり、また、次世代シーケンサーによる解析規模は最も大きい。さらに、周辺研究として、微量RNA解析手法や病態モデル評価法を検証し、基礎的知見を得た。

研究成果の概要(英文)： We extracted a trace amount of RNA from anterior aqueous humor from patients with ophthalmopathy of just a few 100 μL and tried comprehensive RNA analysis using next generation sequencer etc. About 360 kinds of microRNAs were successfully detected from one clinical specimen, and about one third of them were commonly detected in eight cataract specimens. Of these, 75% of the top 40 in expression levels were consistent with other studies reported during the study period. As a study that tried comprehensive analysis individually without mixing samples, our microarray analysis reported at the beginning of the research period is the first time, and the analysis scale by the next generation sequencer is the largest. In addition, as a surrounding study, we have examined microRNA analysis method and pathology model evaluation method and obtained basic knowledge.

研究分野：トランスレショナルリサーチ

キーワード：circulating miRNA 前房水 網羅的解析 次世代シーケンサー

### 1. 研究開始当初の背景

MicroRNA (miRNA) は短鎖 RNA の主要な成分で、18~25 塩基長の一本鎖 noncoding RNA である。多種多様な生物で存在することが明らかにされており (Bartel DP et al. Cell 2004 など) 次世代シーケンサーの開発により解析研究が加速され、研究費申請時点までに 2019 種類のヒト miRNA が確認されていた。

MiRNA は、細胞内において主に RNA 干渉様の作用によって、塩基配列の相補性を示す mRNA の発現を抑制することが知られていたが、2008 年前後に体液中にも安定的に存在することが明らかになり、侵襲の少ない新規バイオマーカーや創薬標的探索の魅力的なソースとして着目され、癌分野を中心に近年盛んに研究が行われている (Cortez MA et al. Nat Rev Clin Oncol 2011, Weiland M et al. RNA Biology 2012)。2010 年以降、血清以外にも眼由来成分も含む様々な体液 (尿、母乳、前房水、硝子体など) に miRNA が存在することが定量的 PCR 法で確認されている (Weber JA et al. Clin Chem 2010 など)。

前房水は、角膜と水晶体の間に存在する体液で研究や検査目的で採取されている。他と比較して前房水は眼外から隔てられた成分であるため、眼疾患に特異性の高い分子を探索する目的において魅力的なバイオマーカーソースである。しかし、前房水研究においては、RNA より安定なタンパク質の解析研究が主流であり (Kunikata H, Tanaka Y et al. AJO 2013) また、一度のサンプリングで採取できる前房水の量が僅か数 100  $\mu$ L であることから網羅的な分子探索は困難であった。

前房水中 RNA の網羅的解析研究については、研究開始までに 1 例のみで (Jeffrey JD et al. Exp Eye Research 2012) RNA 量を確保するために 5 人の白内障患者サンプルを混合して定量的 PCR 法で 100 種類程度確認したに留まっていた。バイオマーカーや創薬標的として活用するには様々な疾患の患者サンプル 1 つ 1 つを解析して疾患特異的な miRNA を明らかにする必要があると共に、微量な RNA サンプルを解析するために、より適切な解析手法の開発が必要であった。

また、分泌型 miRNA に関しては癌を中心に疾患ごとに発現プロファイルが異なり、これらが細胞間の情報伝達に関与し、腫瘍の転移や潤滑などへの関与することが指摘されているが具体的な機能を詳細に解明した例はごく僅かである。このような機能解析には、病態モデル動物を用いた研究が不可欠である。特に中途失明原因第 1 位の緑内障研究においては、有効な治療法のない非眼圧依存性の病態モデルの開発と、評価方法の確立が欠かせない。

### 2. 研究の目的

本研究の主たる目的は、眼疾患患者由来の前房水に含まれる RNA を、次世代シーケンサー等の最新技術を用いて、患者毎に網羅的に解析できるか否かを検証することであった。また、副次的目的として、前房水中に含まれる微量な RNA を解析する方法の工夫や、機能を検証するため、非眼圧依存性緑内障モデルの検証、病態モデルにおける RNA 発現制御実験などの関連研究を推進することを掲げた。

### 3. 研究の方法

本研究では、項目 : 緑内障患者、白内障患者からの前房水採取及び RNA 抽出、項目 : マイクロアレイや次世代シーケンサー解析の条件検討、微量解析キットやプロトコルの検証、項目 : 緑内障、白内障の網羅的な解析、項目 : 非眼圧依存性緑内障モデルとして、マウス視神経挫滅モデル評価系の確立と、RNA 発現制御実験、以上を軸に実験を進めた。

- 倫理：臨床検体を扱う研究においては、東北大学医学部倫理委員会及び理化学研究所の倫理委員会の承認を得て実施された。また、動物実験においては、東北大学総長の承認を得て実施された。
- 対象症例：研究開始以前に採取した症例に加えて、研究期間内に、原発解放隅角緑内障 10 例、正常眼圧緑内障 10 例、白内障 10 例を採取することを目標とした。
- 前房水サンプル採取と RNA 抽出：図 1 の様に、前房水は治療のために緑内障手術もしくは白内障手術を施行される症例からのみ手術開始時に 100-150  $\mu$ l 採取し、直ちに氷冷し、遠心処理 (300 g) を行なって細胞成分を取り除いた液成分から total RNA 抽出キット (miRNeasy mini kit, Qiagen) の QIAzol と混合して -80 で保存した。凍結したサンプルを解凍して抽出キットで total RNA を抽出する。バイオアナライザを用いて RNA のサイズ分布と RNA 抽出量を評価した。

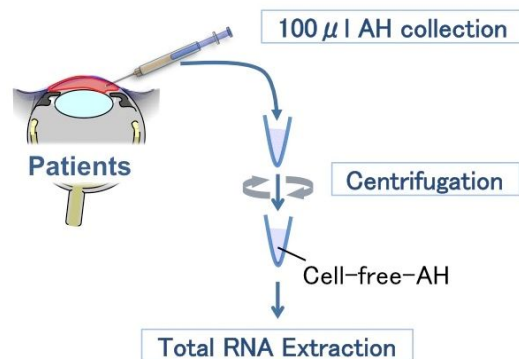


図 1. 前房水からの RNA 抽出方法について。

- Small RNA-seq: TruSeq Small RNA Library Prep Kit を用いてシーケンシング用のライブラリーを作製し、HiSeq 2000 を用いて解析した。
- HiSeq2000 で得られたデータを、CLC Genomics Workbench (CLC bio 社) を用いて miRBase に登録されている既知の miRNA 配列にマップした。
- 動物モデルに関しては、マウス視神経挫滅モデルの網膜内の転写産物解析や網膜神経節細胞死の評価方法について検証した。

#### 4. 研究成果

- ヒト前房水からの miRNA 抽出とマイクロアレイ解析。

図1の方法にてヒト前房水から抽出した RNA は、図2に示す様に 200 nt 以下で、検出限界以下の参考データであるが、平均約 5 ng 程度であった。本研究の準備として、先行して実施したマイクロアレイ解析では、図3に示す様に、1 検体につき、約 500 種類の miRNA が検出された。しかしながら、マイクロアレイ解析では偽陽性を否定することが困難である。より厳密なデータを得るために、次世代シーケンサーを活用した解析を推進することとした。

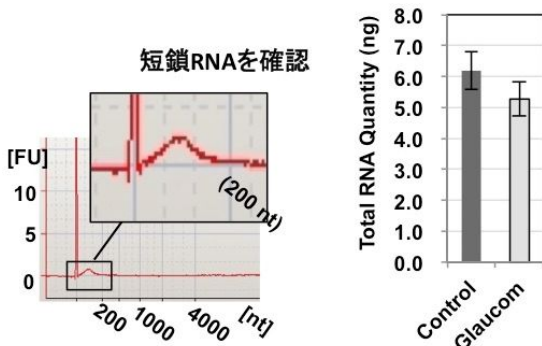


図2. バイオアナライザによる前房水から抽出した RNA の評価。

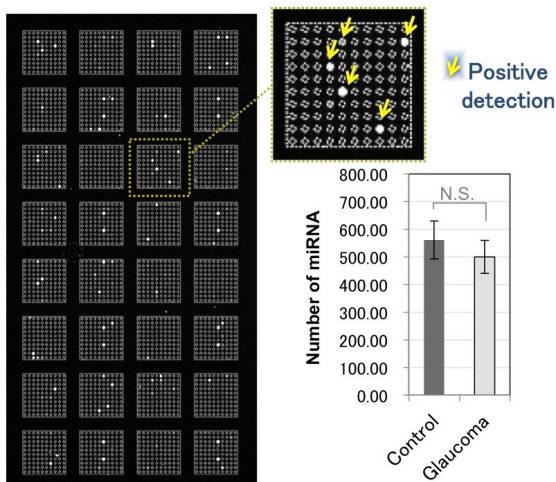


図3. 前房水のマイクロアレイ解析。

- ヒト前房水由来 miRNA の次世代シーケンサーによる解析。

次世代シーケンサーによる解析を行ったのは、表1の14サンプルである。1サンプルにつき平均約1350万リードが検出され、その中の平均約10万リードが miRBase にマップされた。検出された miRNA の種類は、約360種類と、マイクロアレイ解析よりも30%程度少なかった。

研究開始時点では次世代シーケンサーによる miRNA の解析例はなく、患者毎の解析も世界初であった。しかしながら、研究実施中に混合サンプル中の exosomal RNA の解析 (W.M. Dismuke, *et al. Experimental Eye Research* 2015, 132, 73-77) や、4例の患者毎の解析例 (T. Wecker, *et al. IOVS* 2016, 57, 1706-1713) が報告された。個別に解析している後者の報告において、miRBase にマップされた miRNA 数が2万リード程度であったのに対して、我々のデータでは前述の通り、10万リードと5倍程度多く、本研究の方が感度良い実験データが得られた。

表1. 次世代シーケンサーで解析した症例と、miRBase へのマッピング。

疾患名	性別	抽出RNA量 [pg/ul]	総リード数	miRBaseにマップされたリード数	検出された miRNA の種類
白内障	男性	53	18,956,840	56,404	369
白内障	男性	44	18,725,337	57,512	378
白内障	男性	67	9,950,922	40,301	304
白内障	男性	65	9,129,116	154,531	406
白内障	女性	111	17,210,234	133,507	451
白内障	女性	56	14,898,234	113,918	389
白内障	女性	56	13,714,130	88,163	310
白内障	女性	31	8,390,134	61,351	321
正常眼圧緑内障	男性	33	19,371,405	109,509	398
正常眼圧緑内障	男性	68	8,529,942	113,750	341
正常眼圧緑内障	女性	75	13,453,668	269,663	420
正常眼圧緑内障	女性	77	12,705,748	55,841	340
正常眼圧緑内障	女性	68	9,556,600	108,967	345
解放隅角緑内障	女性	50	13,953,895	55,226	335

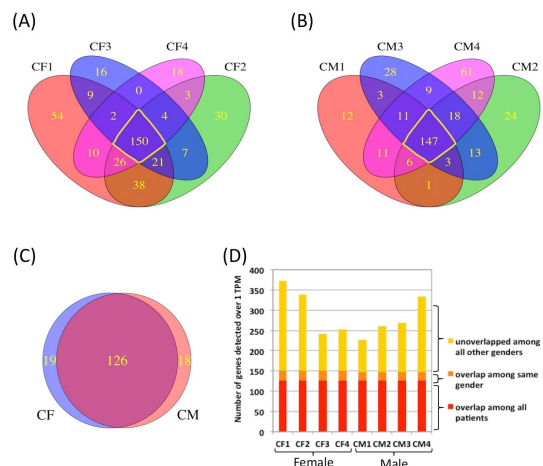


図4. 白内障患者に共通して検出された miRNA の数. (A) 女性4例のベン図、(B) 男性4例のベン図、(C) 女性共通発現 miRNA と男性共通発現 miRNA のベン図、(D) ヒストグラムによる表記。

表 2 . 白内障 8 症例で共通検出された miRNA 群のうち発現上位 40 位 .

配列	miRNA ID	平均発現量	STDEV	報告例1 (IOVS 2016)	報告例2 (Exp.Eye.Res 2015)
TGGACGGAGAAC TGATAAGGGT	mir-184	269454.3	113630.08	*	*
TGAGATGAAGCA CTGTAGCTC	mir-143	96591	98410.74	*	*
AAGTGCCAGTT GAAGAAGCTG	mir-22	81104.725	15462.29	*	*
TTACACAGTGGCT AAGTTCTGC	mir-27b	60142.35	15286.98	*	*
TTCCCTTTGTCT CCTATGCTC	mir-204	43243.2	29814.65	*	*
TTCAAGTAATCCA GGATAGGCT	mir-26a- 1//mir-26a-2	38372.325	12877.83	*	*
TGAGGTAGTAGA TTGTATAGTT	let-7f-1//let- 7f-2	37622.95	16302.05	*	*
AAcATTCAACGC TGTGGTGAGT	mir-181a- 2//mir-181a-1	26138.525	9259.64	*	*
TGTAACATCCTC GACTGGAAG	mir-30a	22549.325	7615.38	*	*
TGTAACATCCTC CGACTGGAAG	mir-30d	17954.7625	5229.4	*	*
TGAGGTAGTAGG TTGTATAGTT	let-7a-1//let- 7a-2//let-7a-3	17953.05	9543.37	*	*
TCAGTGCACCTAC AGAACTTGTG	mir-148a	17678.3125	4813.23	*	*
TGAGGGGAGAG AGCGAGACTTT	mir-423	16968.7375	2983.58		
TAGCTTATCAGAC TGATGTTGA	mir-21	14742	13546.86	*	*
CAACGGAAATCC AAAGCAGCTG	mir-191	10895.85	2829.96	*	*
TATTGCACCTGTC CGGCCCTGT	mir-92a- 1//mir-92a-2	10722.5375	3312.96	*	*
TCCTTGAGACCC TTTAACCTGTGA	mir-125a	9913.8875	2389.21	*	*
TCCTTGAGACCC TAACTTGTGA	mir-125b- 1//mir-125b-2	9466.6375	2642.14		
TAACACTGTCTG GTAAAGATGG	mir-141	8834.2375	16184.38		
TGTAACATCCTT GACTGGAAG	mir-30e	8330.775	1835.31	*	*
ACTGGAAGGAG GTCAGAAAGC	mir-378a	8054.4375	4104.07		
TACCTGTAGAT CGAAATTTGTG	mir-10a	7545.65	2187.51		
TCCTTCATTCCAC CGGAGTCTG	mir-205	7338.2625	7765.41	*	*
TGAGGTAGTAGTT TGTGCTGTT	let-7i	7175.3	2108.03	*	*
TCCTGTACTGAG CTGCCCGAG	mir-486- 1//mir-486-2	6491.4625	4450.73	*	*
CAAAAGATTCTC CTTTGGGCT	mir-186	5682.225	1214.93		
TACAGTACTGTG ATAACTGAA	mir-101- 1//mir-101-2	5444.825	1683.61	*	*
TACCTGTAGAA CGAAATTTGTG	mir-10b	5412.9875	11341.21		
AAcCCGTAGATC CGAACTTGTG	mir-100	5375.075	2011.75	*	*
TGAGGTAGTAGG TTGTATGGTT	let-7c	4997.2	1842.82		
TTCCCTTTGTCT CCTTGGCTC	mir-211	4953.8875	3426.19		
TAGTGGTCTTAA ACATTTGACA	mir-203b	4188.4375	6642.21		
TTCAAGTAATTCA CGATAGGT	mir-26b	4104.725	1442.99	*	*
CAGTGCAATGTT AAAGGCAT	mir-130a	3841.55	1306.63		
CACTAGATTGTG AGCTCCTGGA	mir-28	3741.35	801.32		
CTAGACTGAAGC TCCTTGAGG	mir-151a	3590.3125	1559.32		
TGAGGTAGTAGG TTGTGCTGTT	let-7b	3460.375	1035.55	*	*
CACCCGTAGAAC CGAGCTTGGC	mir-99b	3397.175	842.59		
TATTGCACCTGTC CGGCCCTCC	mir-92b	3386.2375	923.88	*	*
TGAGAACTGAATT CCATGGGTT	mir-146a	3245.2625	1528.05	*	*

文献1: Investigative Ophthalmology & Visual Science 2016, 57, 1706-1713.

文献2: Experimental Eye Research, 2015, 132, 73-77.

症例数の多い白内障サンプルにおいて、共通して検出された miRNA の種類を調べた (図 4)。すると、女性 4 例、男性 4 例で共通して検出された miRNA は、それぞれ 150 種類 (図 4A) と 147 種類 (図 4B) であった。男女合計 8 例で共通して検出されたのは 126 種類 (図 4C) で、各サンプルで検出された miRNA のうち 30% - 60% を占めた。

白内障 8 症例で共通して検出された miRNA (図 4C) のうち、発現量が大いものから 40 位までを表 2 に示す。上位 12 位までは、前述した W.M. Dismuke ら、または T. Wecker らの解析において、主要な成分として検出された miRNA 群と一致しており、再現性が確認

された。表 2 中で、グレーでハイライトした 13 種類の miRNA に関しては、今回我々の研究で新たに検出された主要な共通発現分子である。

一方で、緑内障群と白内障群を比較したところ、発現量の平均が 2 倍以上であり、なおかつ p 値が 0.01 未満の miRNA は、本研究では検出されなかった。感度や定量性の高い検出方法の導入、症例数の追加等の工夫が今後必要である。

・新しい微量短鎖 RNA の検出に関する検討  
微量の短鎖 RNA を解析するため、図 5 のようなテンプレートスイッチ法を応用した新しいシーケンスライブラリー作成方法を検討した。しかしながら、研究期間中に同様のコンセプトのキット (SMARTer smRNA-Seq) の販売が始まったため、中止して、このキットの性能評価を行なった。

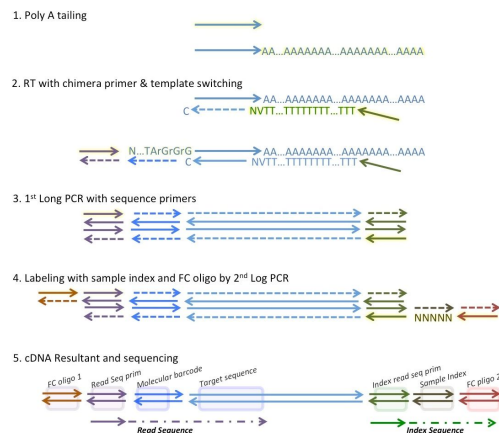


図 5 . 検討した新しい微量短鎖 RNA 解析用ライブラリー調整スキーム .

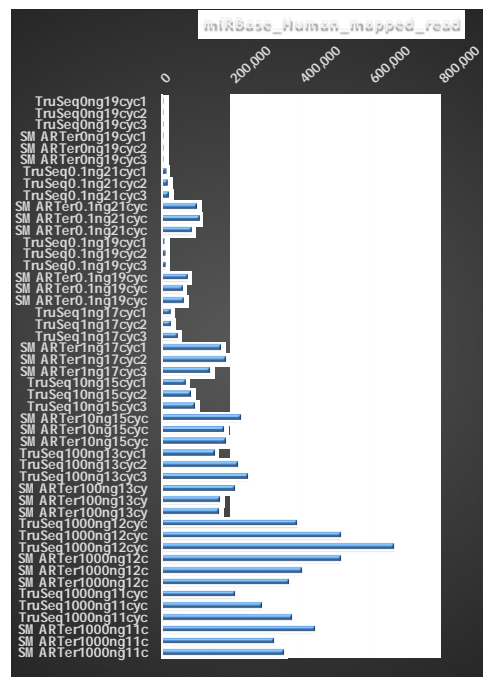


図 6 . TruSeq と SMARTer との比較 . ヒト脳由来 total RNA の Small RNA-seq 解析 . MiRBase にマップされた miRNA の比較 .

本研究で、前房水中の RNA 解析に使用した TruSeq と、SMARTer キットを使用して、ヒト脳由来 total RNA からシーケンスライブラリーを作成して miRBase にマップした。すると、図 6 の様に、初期の total RNA 量が 10 ng 以下の条件において、SMARTer キットの方が、miRBase マップ数が 2 倍以上も多かった。特に、total RNA 量が少なくなるほどその差は大きくなり、0.1 ng においてその差が 6 倍に達した。SMARTer キットは、微量の miRNA を解析するのにより適している。

#### ・動物モデルの検証

研究代表者の異動に伴い動物モデルでの検証は中止したが、異動前まで視神経挫滅モデルに関する評価方法の検証を実施した。In vivo イメージングによる簡易的な網膜神経節細胞死の定量方法や、網羅的な RNA 解析による網膜神経節細胞障害マーカーの探索などを行いそれぞれ論文として報告した。

#### 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 5 件)

Satoru Tsuda, Yuji Tanaka, Hiroshi Kunikata, Yu Yokoyama, Masayuki Yasuda, Azusa Itoh, Toru Nakawawa, Real-time imaging of RGC death with a cell-impermeable nucleic acid dyeing compound after optic nerve crush in a murine model, *Experimental Eye Research*, 査読あり、146、2016、179-188、DOI:10.1016/j.exer.2016.03.017.

Yuji Tanaka, Satoru Tsuda, Hiroshi Kunikata, Junko Sato, Taiki Kokubun, Masayuki Yasuda, Koji M Nishiguchi, Toshiuki Inada, Toru Nakazawa, Profiles of Extracellular miRNAs in the Aqueous Humor of Glaucoma Patients Assessed with a Microarray System, *Scientific Reports*, 査読あり、4、2014、5089、DOI:10.1038/srep05089.

Kazuko Omodaka, Koji M Nishiguchi, Masayuki Yasuda, Yuji Tanaka, Kota Sato, Ori Nakamura, Kazuichi Maruyama, Toru Nakazawa, Neuroprotective effect against axonal damage-induced retinal ganglion cell death in apolipoprotein E-deficient mice through the suppression of kainite receptor signaling, *Brain Research*, 査読あり、1586、2014、203-212、DOI:10.1016/j.brainres.2014.08.053.

Masayuki Yasuda, Yuji Tanaka, Koji M

Nishiguchi, Morin Ryu, Satoru Tsuda, Kazuichi Maruyama, Toru Nakazawa, Retinal Transcriptome profiling at transcription start sites: a cap analysis of gene expression early after axonal injury, *BMC Genomics*, 査読あり、15、2014、982、DOI:10.1186/1471-2164-15-982.

Kazuko Omodaka, Takuji Kurimoto, Ori Nakamura, Kota Sato, Masayuki Yasuda, Yuji Tanaka, Noriko Himori, Yu Yokoyama, Toru Nakazawa, Artemin augments survival and axon regeneration in axotomized retinal ganglion cells, *Journal of Neuroscience Research*, 査読あり、92、2014、DOI:10.1002/jnr.23449.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権](計 0 件)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

田中 佑治 (Tanaka Yuji) 国立研究開発法人理化学研究所・情報基盤センター・予防医療・ゲノミクス研究開発ユニット・センター研究員

研究者番号：40625513

##### (2) 研究分担者

河合 純 (Kawai Jun) 国立研究開発法人理化学研究所・予防医療・診断技術開発プログラム・副プログラムディレクター

研究者番号：30391923

國方 彦志 (Kunikata Hiroshi) 東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40361092

藤田 幸輔 (Fujita Kosuke) 東北大学・医学系研究科・助手

研究者番号：80708115

(平成 26 年度のみ)