

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670282

研究課題名(和文) 遺伝子発現プロファイル手法による血液RNA診断に向けた基礎的研究

研究課題名(英文) Essential trial to achieve blood RNA diagnosis based on gene expression profiles

研究代表者

高橋 淳子 (Takahashi, Junko)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：80415702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：血液中には臓器や組織と同様にmRNAやnon-coding RNAの膨大な発現情報があり、血液中のRNA診断の有用性が見いだされた。次世代の臨床検査は、第4世代シーケンサー等の遺伝子解析手法の飛躍的な進歩により、蛋白等による診断では行えない、疾病の初期の兆候を捉える高感度な血液RNA診断が可能となる。しかし血液RNA研究はバイオマーカー探索でもみられる様に局所・離散的であり、RNA採取や抽出法の正確性や品質には課題がある。

そこで、RNAの品質評価、抽出効率の評価、ポリメラーゼ等酵素反応阻害の評価を通じたRNAの妥当性評価法の検討を行った。また、臓器由来RNA評価モデルの構築を検討した。

研究成果の概要(英文)：Now, the RNA diagnosis requires standardization of procedure for making reproducible samples. In blood, we may find huge information concern to physiological conditions of organ and tissue, in addition to function of RNAs. These technologies can be achieved owing to next-generation DNA sequencer. To support those technologies, we studied the evaluation procedures for quality of prepared RNA and for identification of original organ in blood RNA.

研究分野：生体工学

キーワード：血液診断 RNA診断

1. 研究開始当初の背景

㈱DNA チップ研の血液 RNA を用いた関節リウマチ抗体医薬の薬効診断サービス、大塚製薬㈱の末梢白血球 RNA を用いた腫瘍再発の早期診断と治療効果確認サービス等、組織や血液 RNA による疾病診断の実用化が進展している。近年では、non-coding RNA が注目され、膵臓癌の腫瘍組織由来の血中 microRNA (miRNA) による早期診断法の提案もなされている。一方、次世代シーケンサーの進展はめざましく、最近の装置メーカーの発表では、酵素を使用しない小型で試料調整が簡易な機種が開発され、1 台で 1 年間に 1000 人の全ゲノム解読が可能としている。この様に RNA 診断の有用性が見いだされ、ハード面の解析技術は進展している。しかし血液 RNA 研究はバイオマーカー探索でもみられる様に局所・離散的であり、RNA 採取や抽出法の正確性や品質には課題がある。

2. 研究の目的

血液中には臓器や組織と同様に mRNA や non-coding RNA の膨大な発現情報がある。次世代の臨床検査は、第 4 世代シーケンサー等の遺伝子解析手法の飛躍的な進歩により、蛋白等による診断では行えない、疾病の初期の兆候を捉える高感度な血液 RNA 診断が可能となる。我々が別課題で実施したマイクロアレイを用いた疾病モデル動物の全血 RNA 遺伝子発現解析を行う過程で、疾病の進展に伴い白血球と全血の遺伝子発現プロファイルの相関が低くなり、データ解析により血液 RNA に対する臓器由来 RNA の影響が確認された。そこで本研究では、臓器由来 RNA を指標とする血液 RNA 診断の可能性を探索することとした。先ず RNA の品質評価法の検討、抽出効率の評価法の検討、ポリメラーゼ等酵素反応阻害の評価を行い、RNA の妥当性評価法の検討を行った。また、臓器由来 RNA 評価モデルの構築を検討した。

3. 研究の方法

(1) RNA の妥当性評価法の検討

RNA 診断を行うためには、RNA 採取や抽出法の正確性や品質評価が必要である。RNA のクオリティコントロール法として、伝統的に ribosomal RNA 比 (28S/18S または 16S/23S) が用いられてきたが、昨今 RIN 値 (RNA Integrity Number) を用いる方法が提案され、用いられるようになってきている [1]。これはトータル RNA のエレクトロフェログラムを、リボソームを構成する 2 種類の rRNA の比率のみでなく総体的に評価し、理想形と比べて数値化する方法である。しかし、これらの方法は、細胞の持つ RNA の大半を占めている

rRNA の影響が大きく、本来の測定目的である、ごく少量の mRNA の状態を反映しているとは限らない。そこで、rRNA ではなく、mRNA の状態を評価可能とするクオリティコントロール法を確立することを目的として、「標準 RNA」を用いる評価方法を検討した。「標準 RNA」は、産業総合研究所が核酸標準物質として開発した「定量解析用リボ核酸 (RNA) 水溶液」であり、配列と濃度が既知であり、自然界に存在するゲノムと相同性が低い配列に設計されている [2]。そのため、細胞由来の遺伝子に影響を受けにくく、標準物質としての信頼性は安定していると言える。RNA に着目した実験手法を行う際、RNA の純度や回収率、分解など様々なファクターによって、解析結果に影響を与える可能性がある。

そこで本課題では以下の 3 項目について検討を行った。

- ① 標準 RNA と RIN による RNA 品質の評価法
- ② 標準 RNA による RNA の抽出効率の評価法
- ③ 標準 RNA による RNA 分解の評価法

(2) 臓器由来 RNA 評価モデルの構築

近年、20 から 25 塩基長の微小 RNA な機能的核酸である miRNA について、細胞内の機能に加えて、細胞外での機能が着目されている。特に、細胞内小胞であるエクソソームへと内包されて細胞から分泌される miRNAs は体液中に安定に存在することから、疾患の診断のためのバイオマーカーとして応用が期待されている。本課題採択後、大腸がん患者由来血清エクソソームの miRNA プロファイルは健康人と比較するとパターンが異なる等、血中の miRNA のエクソソームレベルは疾患状態を反映しているという報告が次々となされた [3]。この様に、血液中の臓器由来の RNA をバイオマーカーとする血液 RNA 診断の研究の進展は目覚ましい。

臓器由来の RNA を指標とする血液 RNA 診断を行うためには、個々の疾患で臓器において高発現する RNA が、血球由来 RNA より十分に多いことが条件となる。この場合、マーカーとなる RNA は疾患により異なることから、疾患のターゲットを定めて、疾患の動物モデルを作成する、もしくは罹患しているヒト血液を評価することとなる。本課題においては、疾患モデルとして、放射線ストレスについて検討を行った。放射線照射は顕著な白血球数の減少を引き起こすモデルであり、バックグラウンドとなる血球由来の RNA を低減することが可能である。そこで、放射線ストレスの RNA の評価と同時に、白血球数等を測定し、放射線ストレスの血液 RNA に対する影響を、RNA の質、量、発現の観点から評価することとした。

また、血漿中の RNA はエクソソームの様な状態の場合には安定であるとされている。一方、臓器の損傷により漏れ出る膜に内包されない RNA の分解等について、併せて検討を行った。

4. 研究成果

(1) RNA の妥当性評価法の検討

① 標準 RNA と RIN による RNA の品質評価
【方法】 B16-BL6 メラノーマ細胞をトリプシン処理して 0.1mL 水溶液 (5.0×10^5 cell/tube) に標準 RNA 20pg/tube を添加し、室温で異なる時間培養し RNA の変性を促進させたのち、トータル RNA を抽出した。使用した標準 RNA の配列は GenBank AB61945 であった。RNA の濃度は NanoDrop® ND-1000 で測定し、RIN の評価は RNA6000 Nano LabChip kit を Agilent 2100 Bioanalyzer により測定した。標準 RNA、および RNA 試料の定量は real-time RT-PCR により行った。使用したプライマーは、標準 RNA primer forward: 5'-TGGACCTCTGCGGCTATTG-3', reverse 5'-CGTTGTATGGTGGCGGTTA-3', *Actb* primer forward: 5'-TCCACACCCGCCACAGTTC-3', reverse 5'-CATTCCCACCATCACACCTGG-3', *Rps18* primer forward 5'-GATGGGCGCGGAAAATAGCCT-3', reverse 5'-CGATGTCTGCTTTCCTCAACACCAC-3'である。

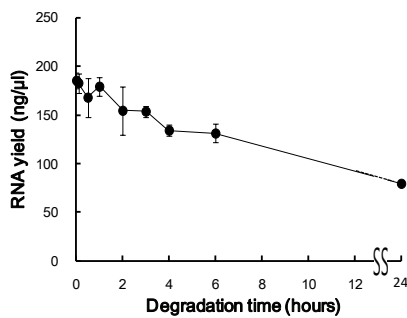


図 1 変性時間と RNA 収量

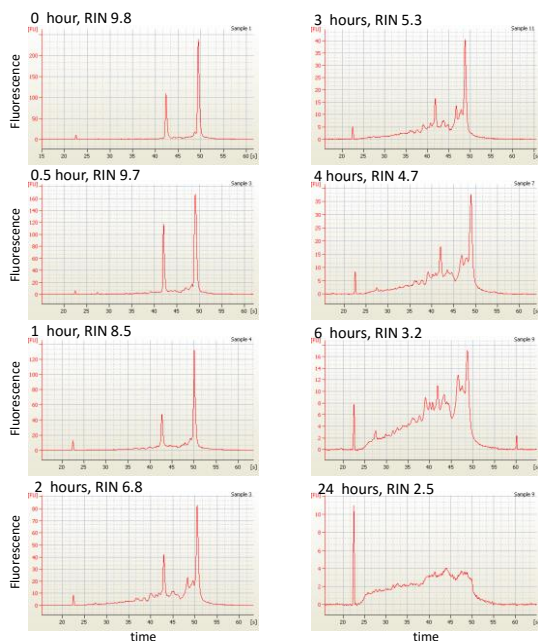


図 2 変性時間とトータル RNA の電気泳動図

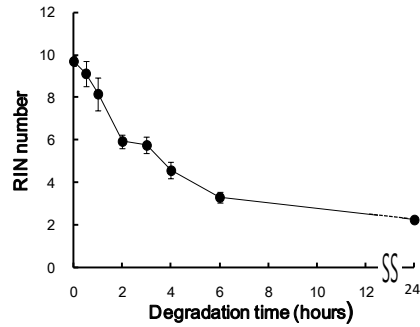


図 3 変性時間と RIN 値

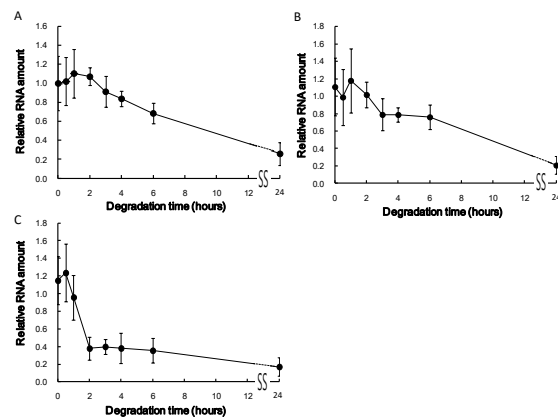


図 4 変性時間と標準 RNA, *Actb*, *PRs18* の相対量

変性処理の時間により RNA の収量は減少し (図 1)、それとともに電気泳動波形が変化した (図 2)。RIN 値についても、変性処理を行わない場合には、ほぼ完ぺきな RNA 状態を示す 10 に近く、変性時間が長くなると、その数値は減少した (図 3)。Real time RT-PCR で標準 RNA, *Actb*, *RPS18* を定量すると、変性時間と共に値も減少した (図 4)。しかし、それぞれの相関をとると、有意な相関を示すものの、RIN に対しては *PS18* の方が *Actb* より高い相関を示した。

標準 RNA が RNA 評価に有用であること、また RNA の種類 (配列または構造) により、変性の程度が異なる可能性があることが確認された。

② 標準 RNA による RNA の抽出効率の評価法の検討

細胞から RNA の抽出操作を行う前に標準 RNA を添加し、RNA を抽出後、最初に添加した標準 RNA を定量することで、RNA 全体の回収率の算出が可能となる。また、抽出操作の各工程でそれぞれ異なる種類の標準 RNA を添加すると、各工程での RNA 回収率を算出が可能となる。

ここでは、特に RNA の抽出が困難である大腸菌、または酵母から、Hot Phenol 法を用いて RNA を抽出した。Hot phenol 法の RNA 抽出操作は、細胞破碎、クロロホルム精製、エタ

ノール沈殿の3つの工程がある。各工程の初めに、それぞれ種類の異なる標準 RNA を添加した。その後、抽出液の各標準 RNA をリアルタイム RT-PCR で定量し、回収率を算出した。

その結果、大腸菌、酵母ともにクロロホルム精製過程での RNA 損失が大きく、全体の RNA 回収率は約 60%と推定出来た。

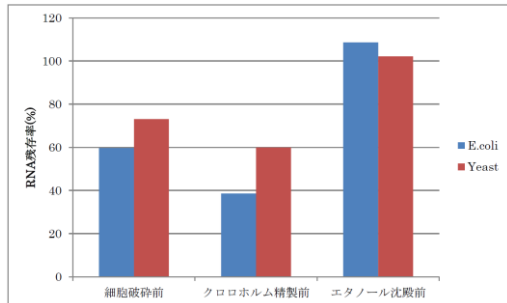


図5 各 RNA 抽出工程における RNA 回収率の変化

③ 標準 RNA によるポリメラーゼ等酵素反応阻害の評価

RNA を抽出した溶液中に逆転写酵素やポリメラーゼへの酵素反応の阻害物質が含まれる可能性がある。酵素反応の阻害因子は、試料由来の物質の他に、RNA 抽出前、また抽出工程で使用する薬品等が考えられる。RNA の純度は一般に 260nm と 280nm の吸光度の比、および 260nm と 230nm の比で評価されるが、濃度および酵素反応への阻害効果を定量的に評価するものではない。ここでは、前項において RNA の抽出効率を評価する際に、抽出 RNA に同様の標準 RNA を再添加し定量した。標準 RNA を再添加の有無による標準 RNA 量を比較することで、逆転写および PCR の酵素反応等の阻害率を算出した。標準 RNA は 1000A (GenBank AB61946)、1000B (GenBank AB61946) を用いて評価したところ、以下の様な結果が得られた。

表1 酵素反応阻害率 (%)

標準 RNA	1000A	1000B
大腸菌	19.3	-0.8
酵母	50.7	24.7

標準 RNA の種類により異なる阻害率となり、大腸菌より酵母の RNA 抽出液に多くの酵素反応阻害物質が存在することが確認された。これらのことから標準 RNA を用いると、ポリメラーゼ等酵素反応等の阻害の評価が可能であることが確認された。

(2) 臓器由来 RNA 評価モデルの構築

臓器由来 RNA 評価モデルとして血液中の白血球細胞の減少が著しい放射線モデルを用いた。放射線モデルでは照射線量と採決のタイミングによっては、白血球細胞由来の RNA が無視出来る条件とすることが可能である。

X 線 7Gy を BALB/c マウスの全身に照射し、血液中の RNA 量、血液状態等の経時変化を検討した。全血の RNA 抽出は NucleoSpin® RNA Blood (Takara)、肝臓の RNA 抽出は RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いた。

照射 0, 1, 2, 3 日後の血液および肝臓から抽出した RNA 濃度を図 6 に示す。抽出試料の量、および回収液量は一定としており、血液 RNA 量は照射 1 日後 22%、2 日後 2%、3 日後 1%となったが、肝臓 RNA 量はほぼ変化しなかった。電気泳動図をみると、肝臓の RNA は変性が生じないが、血液は 1 日目でやや劣化がみられた。2 日目以降は濃度が低いため、正常な泳動波形は得られなかった。

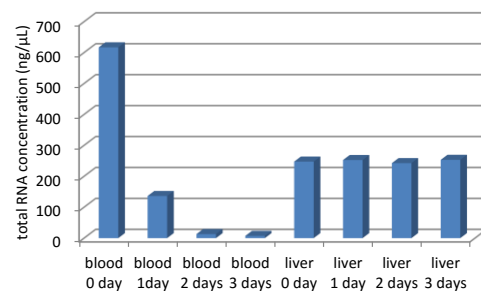


図6 7Gy の X 線全身照射 0, 1, 2, 3 日の血液と肝臓のトータル RNA 量

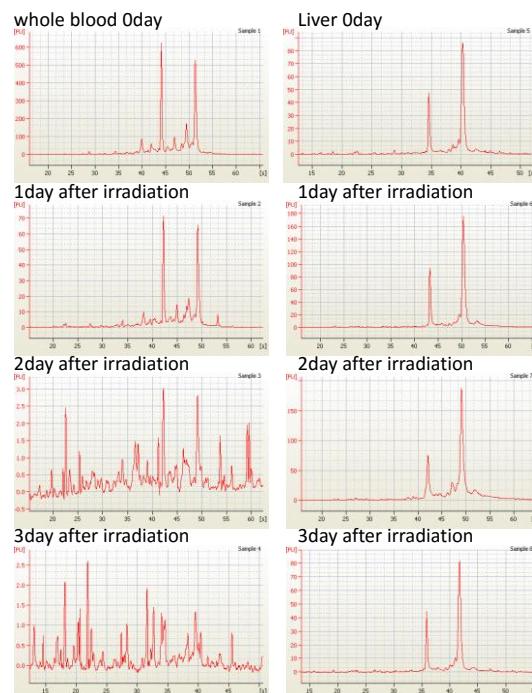


図7 7Gy の X 線全身照射 0, 1, 2, 3 日の血液と肝臓のトータル RNA の電気泳動図

放射線照射により誘導されることが知られている遺伝子 *Cdkn1a*, *Pcna* を real-time RT-PCR により計測すると、血液と肝臓では応答パターンが異なり、肝臓の遺伝子発現が血液に影響しているという様な所見はみられなかった。

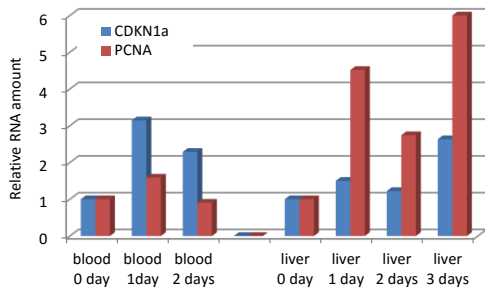


図8 放射線応答遺伝子 *Cdkn1a*、*Pcna* の発現

照射後 0, 1, 3 日におけるトータル RNA 量, 白血球数, リンパ球の割合の変化調べた (表 2)。トータル RNA の減少は白血球数の減少によるものであると考えられた。また, 白血球はリンパ球, 単球, マクロファージ, 顆粒球から構成されているが, この構成も変化することが確認された。

表 2 照射後の白血球と全血の RNA の変化

Day	total RNA (ng/μl)	White blood cells /mm ³	リンパ球 /WBC (%)
0day	318.8	5500	26
1day	63.8	1370	48
3day	6.3	30	60

次に, 放射線照射 (7Gy) 一日後, 照射有無による遺伝子発現をマイクロアレイにより解析した。マイクロアレイは Whole Mouse Genome マイクロアレイキット (Agilent) を用いた。

図 9 に個々のアレイ結果の相関係数, 赤は相関が高く, 青は低いという様で表現した図を示す。相関係数は未処理群内, 処理群内, 未処理-処理群間それぞれ 0.97 ± 0.01 , 0.92 ± 0.04 , 0.93 ± 0.03 であり, 白血球が約 80% 減少した場合でも, 極端なプロファイルの変化が無いことが確認された。また, 縦軸に有意差 ($-\log_{10} p\text{-value}$), 横軸に発現差 ($\log_2 \text{Fold change}$) をプロットしたボルケーノプロットを図 10 に示す。抑制される遺伝子が多い傾向を示し, 遺伝子発現倍率はそれほど高く無いことが確認された。

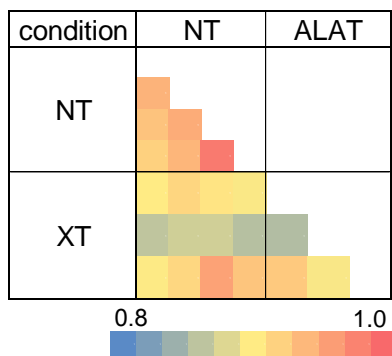


図 9 血液 RNA のマイクロアレイ解析一相関係数

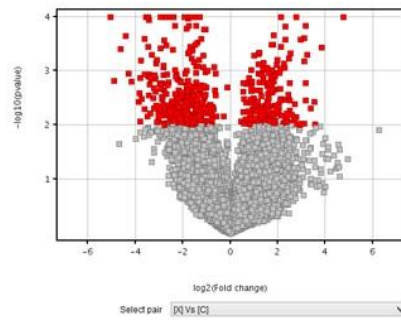


図 10 血液 RNA のマイクロアレイ解析一ボルケーノプロット

これらの結果から, 放射線ストレスモデルは, 照射 2 日で血球由来の RNA 量を約 2% まで低減できることが確認された。

臓器由来 RNA はエクソソームの形態の他, RNA が単体として存在する可能性もある。この場合, RNA は血液中の RNA 分解酵素等の影響を受けることとなる。

そこで単体として存在する RNA に血液, および臓器抽出液を付加し, その分解の程度を評価した。ここで, 標準 RNA は 500B (AB61940), 500C (AB61942) の 2 種類を用いた。図 11 に示すようにこの 2 つの RNA の立体構造は異なり, 500-B は 2 本差になりやすく, 500-C は 2 本差になりやすい。これらの標準 RNA の検出は 5' 端, 中央, 3' 端を増幅し, 部位による分解性の違いの評価も併せて行った。

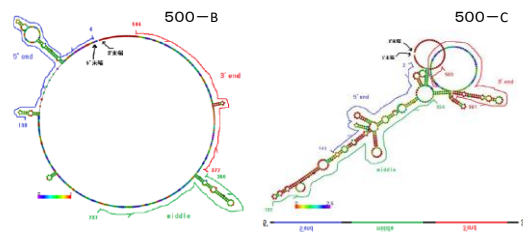


図 11 標準 RNA 500-B、500-C の立体構造, および 5' 端 (青), 中央 (緑), 3' 端 (赤) の増幅領域

原液を 10000 倍に希釈した標準 RNA 500-C を 20ul ずつ 1.5ml チューブに分注した。ここに PBS で 10 倍希釈したマウスの血液または肝臓粗抽出液をそれぞれ 5ul 添加し, 37°C で保温した。保温時間は 0, 5, 15, 45, 135 分で振り分けた。保温後, RNA 精製キット (RNeasy) で精製した標準 RNA を real-time RT-PCR で定量した。

その結果, 肝臓は接触後早い時間で RNA が分解されるが, 血液は比較的緩やかな影響であった (図 12)。臓器由来の場合には, 臓器から徐放されるので常にある程度の RNA が恒常的に存在することが予測された。

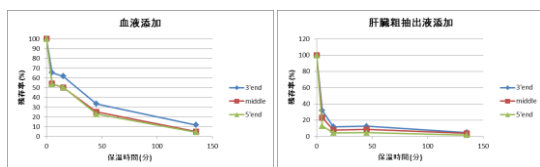


図 12 血液、肝臓抽出液による標準 RNA (500-C) の分解の評価

さらに、大腸菌、酵母抽出液による標準 RNA の分解の結果を示す(図 13)。酵母では 500-B と 500-C の分解は同等であり、5' 端、中央、3' 端の分解位置もほぼ均等であった。一方、大腸菌では 500-B が 500-C より多く分解され、分解位置も 5' 端の方の分解が進行するという結果が得られた。これらは、RNA の立体構造により、分解の容易さが異なることを示している。血液 RNA 診断において、RNA のプロファイル全体の均一な減少は診断に影響しないが、個々の RNA の状態による変化は、サンプルの状態が診断結果に影響するという事示す。この影響の評価は重要であり、今後の診断の validation 法の確立の必要性が確認された

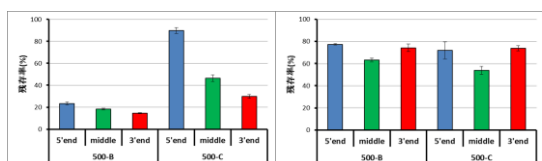


図 13 大腸菌、酵母抽出液による標準 RNA (500-B, 500-C) の分解の評価

<引用文献>

- ① Schroeder et al., The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. BMC Mol. Biol. 7:3, 2006
- ② 定量解析用リボ核酸 (RNA) 水溶液 (NMIJ CRM 6204a), https://www.nmij.jp/service/C/crm/42/6204b_J.pdf
- ③ 土屋直人, 血清エクソソーム miRNAs による大腸がん診断バイオマーカー, 日本分子腫瘍マーカー研究会誌, 31:60-61, 2015

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 2 件)

- 1) Junko Takahashi, Akiko Takatsu, Hitoshi Iwahashi. Evaluation for Integrity of Extracted RNA by Reference Material of RNA. Journal of Medical Diagnostic Methods 2:128, 2013
doi:10.4172/2168-9784.1000128
- 2) Junko Takahashi, Masaki Misawa, Hitoshi

Iwahashi. Gene expression profiling can predict the fate of HeLa cells exposed to X-ray irradiation with or without protoporphyrin accumulation. Genomics data 5:192-194, 2015

doi:10.1016/j.gdata.2015.05.044

[学会発表] (計 1 件)

- 1) 長谷川丈真, 高橋淳子, 岩橋均, 標準 RNA を用いた抽出 RNA のクオリティコントロール. 日本農芸化学会, 札幌コンベンションセンター(札幌), 2016.3.27-30.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 淳子 (TAKAHASHI, Junko)
産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員
研究者番号: 80415702

(2) 研究分担者

岩橋 均 (IWAHASHI, Hitoshi)
岐阜大学・応用生物科学部・分子生命科学コース・教授
研究者番号: 60356540