

マイクロ RNA 測定技術の最近の動向

秋山 英雄（東レ株式会社 新事業開発部門）

森脇 有加（株式会社東レリサーチセンター バイオメディカル分析研究部）

要旨 マイクロ RNA (miRNA) は、その機能や動態からヒト疾患の低侵襲バイオマーカーや細胞株の品質管理マーカーとして脚光を浴びている。東レ（株）が開発したマイクロアレイ 3D-Gene®は、次世代シーケンサーと異なり、測定感度・定量性に優れ、かつ発現量に依存しない高い再現性を有するため、測定値のばらつきを極小化できる特長がある。本稿では、3D-Gene®を用いたマイクロ RNA 測定技術の特徴と、血清を用いた次世代シーケンサーとの比較例及び細胞外小胞由来マイクロ RNA の分析事例を紹介する。

1. はじめに

すべての生物の体の設計図は DNA であり、その情報は RNA に転写され、さらに RNA をもとにタンパク質が合成されて生命が維持される。近年、マイクロ RNA (miRNA) と呼ばれる非常に短い RNA (20~30 塩基) が、タンパク質の合成を調整する重要な役割を担っていることが明らかになり、マイクロ RNA が細胞の中だけでなく、細胞外に放出されて様々な体液中に存在することが知られるようになった。このような背景から、現在、医薬・医療分野ではマイクロ RNA はヒト疾患の低侵襲バイオマーカーとして、また、再生医療分野において CMC (Chemistry, Manufacturing and Control) 研究でその有用性が注目されている。特に「モノづくり (製品化)」の実現において、細胞株の状態や均質性を、その培養上清中のマイクロ RNA の発現量を指標に非破壊的に確認できる点で大いに期待がもたれる。本稿では、マイクロ RNA の発現を定量する際のマイクロアレイの特徴を紹介し、次世代シーケンサーとの比較について概説する。

2. マイクロ RNA を定量的に測定する

現在、マイクロ RNA は約 2,600 種同定されているが、鎖長が非常に短い上に、類似配列からなるファミリー

が複数存在する。またマイクロ RNA の発現量は低く、特に細胞培養上清から調製した試料には、マイクロ RNA 以外に分解された DNA や RNA 等の核酸も多く含まれる。そのため、マイクロ RNA を特異的、かつ高感度に再現良く検出する方法が検討されてきた。

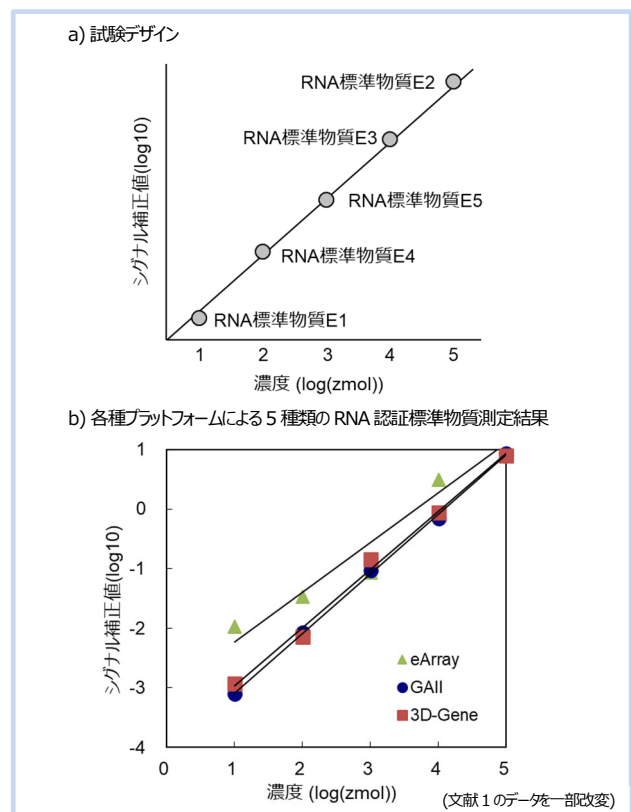


図1 5種類のRNA認証標準物質の希釈直線性比較

主な測定手法としては、定量 PCR (qPCR)、マイクロアレイ、次世代シーケンサー等が挙げられる。いずれの手法も蛍光色素を用いるが、測定原理の違いにより、データの直接比較は困難とされてきた。

その後、JMAC (特定非営利活動法人 バイオ計測技術コンソーシアム) が主導した 5 種類の RNA 混合物を用いた取組み¹⁾により、東レが開発した 3D-Gene[®]や eArray (Agilent Technologies 社) 等のマイクロアレイは、次世代シーケンサー-GAII (Illumina 社) と同等の感度や濃度直線性を有し、定量性に優れることが示された (図 1)。

一方、マイクロ RNA 検出技術の同等性や性能を評価するために実施された miRNA quality control study (miRQC) では、マイクロ RNA 検出性能は、マイクロアレイや次世代シーケンサー等の検出プラットフォームによって異なることも報告された²⁾。

そこで筆者らのグループは、マイクロアレイの性能評価を目的に、miRQC の試験デザインを参考に 2 種類の市販 RNA から 4 種類の検体 A~D を作製し、マイクロ RNA 測定で実績のある 3D-Gene[®] miRNA Oligo chip 4-plex³⁾ を 3 枚使用し、マイクロ RNA 発現データ (各検体につき、N=3 の繰り返し測定) を取得した (図 2)。なお、データ補正には中央値補正を用いた。

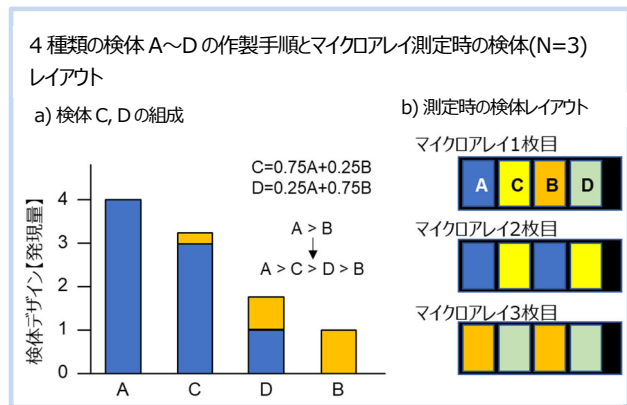


図 2 試験デザイン

マイクロ RNA の発現量は、次世代シーケンサーでは蛍光色素で標識したシーケンスの出現回数 (カウント) として検出され、リード数を増加させることで検出精度を向上できる。一方、マイクロアレイでは、発現量はシンプルに蛍光強度 (蛍光シグナル値) として検出される。図 3 に示したように、繰り返し測定したときの各マイクロ RNA の蛍光シグナル値の標準偏差は、検体の種類が違ってもほぼ同様な分布であり、ばらつき度合いの指標である標準偏差の二乗平均平方根

も 0.05~0.06 と十分低く、併行精度が非常に高い。特に次世代シーケンサーでは、低発現遺伝子の精度が低くなる傾向にあるが⁴⁾、マイクロアレイでは低発現の領域でも高発現と同じように標準偏差が低く、測定のばらつきを極小化できる特長がある。

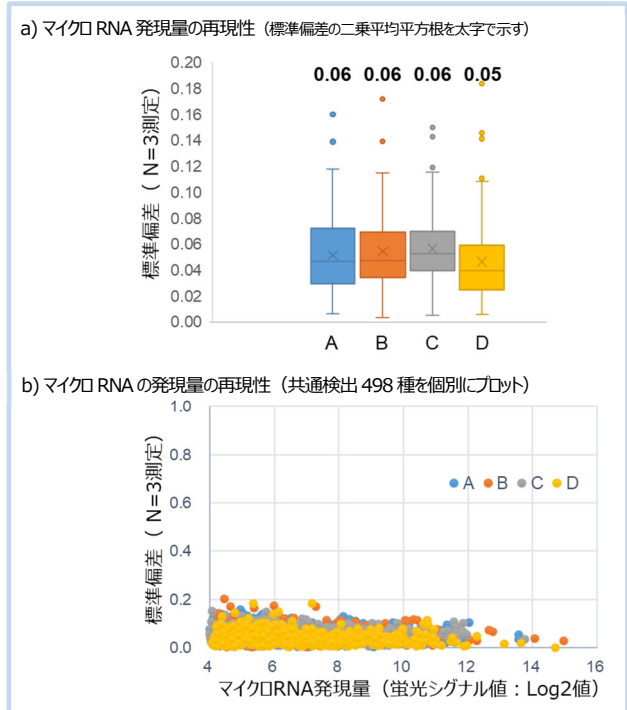


図 3 マイクロ RNA 発現量の日内再現性 (併行精度)

次に、定量性の評価として次の検討を行った。本試験デザインでは、マイクロ RNA の発現量が $A > B$ のとき、検体 C や検体 D では検体 A の混合割合に応じて低くなり、検体 C では 0.75 倍、検体 D では 0.25 倍となる。同様に、マイクロ RNA の発現量が $B > A$ のときには、検体 C では 0.25 倍、検体 D では 0.75 倍となることから、発現比 D/A 、 C/A 及び B/A の関係は式 1、式 2 で表される:

$$\text{発現比 } D/A = 0.25 + 0.75B/A \dots \text{式 1}$$

$$\text{発現比 } C/A = 0.75 + 0.25B/A \dots \text{式 2}$$

全ての検体で共通に検出できた 498 種のマイクロ RNA について、発現比 D/A 、 C/A 及び B/A を算出し、プロットした時の相関、及び回帰式を図 4 に示す。発現比 D/A と B/A との回帰式の決定係数 R^2 は 0.9994、発現比 C/A と B/A との回帰式の決定係数 R^2 は 0.997 と、回帰式の精度が非常に高い。また各回帰式の係数と定数は、いずれも理論式 (式 1 と式 2) の数値とほぼ一致し、定量性に優れることがわかる。

さらに検体 A で検出され、検体 B で検出限界以下と

なるマイクロ RNA に着目し、発現比の正確性を評価した。このような検体 A 特異的に検出できるマイクロ RNA の発現量は、検体 A の混合割合に応じて、検体 C では 0.75 倍、検体 D では 0.25 倍と低くなり、発現比 C/D は $0.75/0.25=3$ 倍と期待できる。実際に検出できた 48 種のマイクロ RNA は、検出限界付近のものが多く発現量が低かったものの、発現比 C/D は 2.8 ± 0.4 倍であった。理論値である 3 倍に近く、検体間の発現比を正確に検出できていることがわかる。

これらの特長から、マイクロアレイ 3D-Gene® は発現量が低いマイクロ RNA を検出するプラットフォームとして最適であると考えられる。

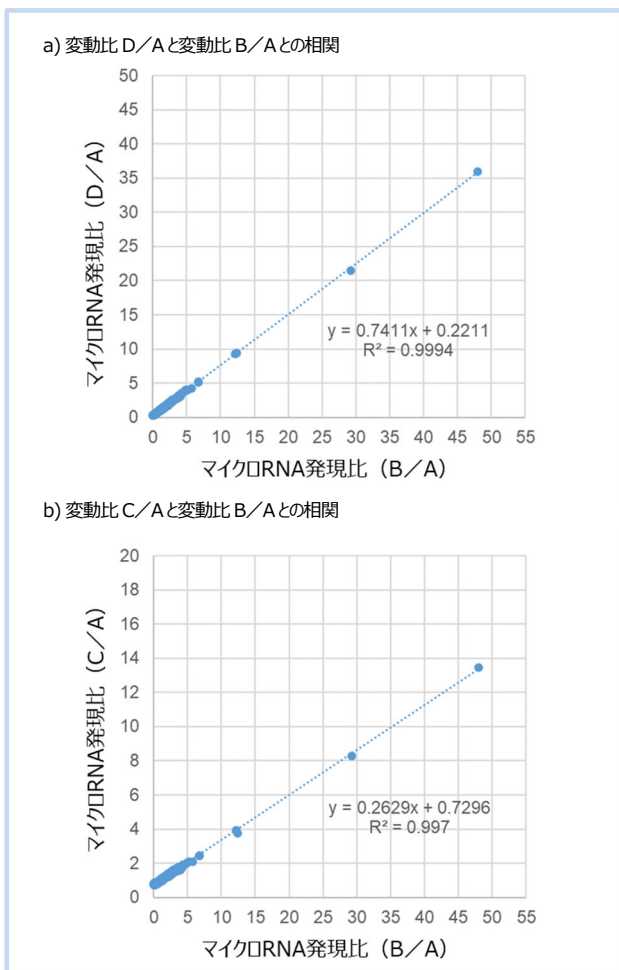


図4 マイクロ RNA 発現量の定量性評価結果
(3D-Gene® miRNA Oligo chip)

3. 血清中マイクロ RNA 分析の事例

本項では、同一のヒト由来血清（複数の健康人血清を混合した血清）を試料としてマイクロアレイを用いて分析した例を示す。

ヒト由来血清には細胞の培養上清と同様、マイクロ RNA 以外に、細胞死に伴って放出された後に分解された DNA や RNA 等の核酸が多く存在する。アルブミン等のタンパク質、脂質も多く含まれるため、マイクロ RNA を特異的に、かつ高純度に再現良く抽出精製することが求められる。

そこで検出プラットフォームの適合性評価を目的に、 -80°C 以下で保管した血清から各社推奨プロトコルにより RNA 抽出・精製を 2 回繰り返した後、マイクロアレイ 3D-Gene® miRNA Oligo chip 4-plex と次世代シーケンサー NovaSeq 6000 (Illumina 社) でマイクロ RNA 発現量を測定した (表 1)。

表 1 測定・解析法の概要

測定法	3D-Gene® miRNA Oligo chip	NovaSeq 6000
試料	複数の健康人血清を混合した血清	
使用量/抽出	300 μL	200 μL
RNA 抽出・ 精製方法	3D-Gene®抽出試薬	miRNeasy Serum/ Plasma Kit (Qiagen)
補正方法	内在性マーカー	CPM (Count per Million)
マイクロ RNA 検出数	774	319

検出されたマイクロ RNA の測定値には、抽出・精製操作や各反応段階におけるばらつきが含まれるため、同一血清を 2 回測定したときの各マイクロ RNA の発現量比を算出し、繰り返し測定における発現比の確率密度分布を比較した。

次世代シーケンサー NovaSeq 6000 の発現比の確率密度分布は、図 5 に示すように、3D-Gene® と比べて横方向に広がり、ばらつきが大きく、収束性が低いことがわかる。このデータから、同じ血清を測定した際に検出されたマイクロ RNA が 2 倍以上 (x 軸で 1 以上あるいは 1 未満) ばらつく確率は、3D-Gene® では 0.16%、次世代シーケンサー NovaSeq 6000 では 16.6% となる。つまり、同じ血清からマイクロ RNA を 1,000 種類検出したときに、2 倍以上発現比があると誤検出される数が、3D-Gene® では 1.6 種に対して NovaSeq 6000 では 166 種となると推察でき、次世代シーケンサーを用いて 3D-Gene® と同じデータ品質を得るには、測定を 3~4 倍繰り返してリード数を増加させて精度を高めなければならない。

以上のことから、マイクロ RNA のようにデータベースに登録のある既知遺伝子の分析が目的の場合には、

3D-Gene®は次世代シーケンサーを凌ぐ精度で、効率的にデータを取得できると考えられる。

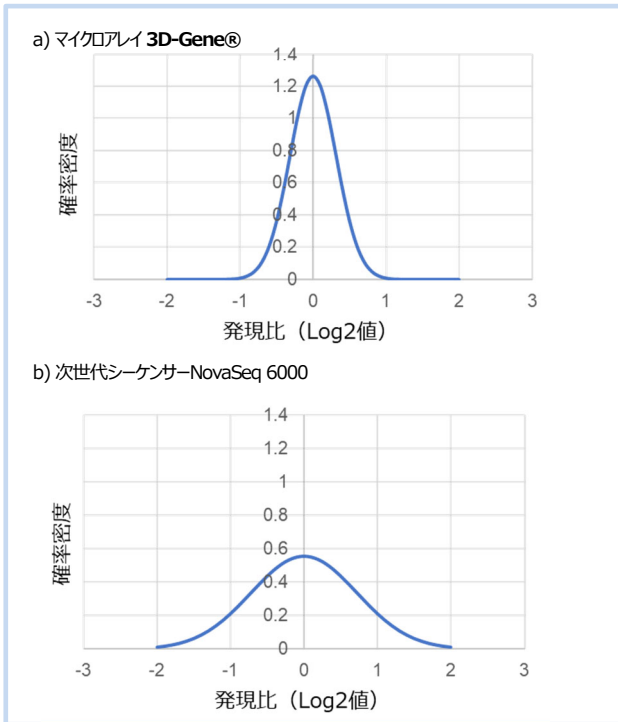


図5 同一血清測定における発現比の確率密度分布

4. 細胞外小胞由来マイクロ RNA 分析の事例

本項では、細胞培養上清中に存在する細胞外小胞 (Extracellular vesicles : EVs) を試料としてマイクロ RNA の発現量を測定した例を示す。

細胞外小胞は、様々な細胞から分泌される脂質二重膜を有する小胞の総称であり、タンパク質や核酸 (DNA、RNA、マイクロ RNA 等) 等の機能性分子を内包する。その機能は細胞間の情報伝達であり、血液等の体液を通じて周囲の細胞や遠隔の細胞へと機能性分子を受け渡し、免疫抑制やがん細胞の増殖、転移等、様々な作用をもたらす。このような特徴を生かして、最近では、疾患バイオマーカーとしての利用以外に、治療用製剤としての可能性が指摘されており、実用化に向けた開発が進められている。

細胞外小胞の精製には、超遠心法が汎用されるが、膜上の表面タンパク質に対する抗体を用いる方法 (抗体法) や、PEG 等のポリマーを用いて膜の水和性を低下させて遠心で沈澱・濃縮させる方法 (沈降法) 等もよく用いられる。またサイズ排除クロマトグラフィーや限外ろ過膜を用いて目的サイズの小胞のみ分離・精製することもあるが、治療用製剤化においては製造用

細胞株の均質性や安定性に加え、分泌される細胞外小胞の純度や均質性の確保も課題となる⁹⁾。

そこで精製方法の特性評価を目的に、モデル細胞としてヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 (A549 細胞) を選び、細胞外小胞を単離する 24 時間前に血清含有培地から無血清培地 Opti-MEM 培地に交換、37°C、5% CO₂ の条件で培養した。培養上清液を回収した後、表 2 に示す手順にしたがって細胞外小胞由来 RNA を精製し、マイクロアレイ 3D-Gene® miRNA Oligo chip 4-plex でマイクロ RNA 発現量を測定した。

表 2 細胞外小胞の精製方法 (概要)

	超遠心法	抗体法	沈降法
試料	ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 (A549 細胞)		
使用量	培養上清 10 mL		
前処理	細胞片や細胞残屑等の除去 4°C, 2,000 g, 10 min ⇒ 0.22 μm フィルターを過後、-85°C で保存		
原理	遠心により沈澱	CD9, CD63, CD81, EpCAM に対する抗体ビーズを使用して回収	ポリマー試薬を添加してから遠心で沈澱
遠心条件	4°C, 110,000 g, 70 min	—	1,500 g, 5 min
抽出	3D-Gene®抽出試薬		

検出できたマイクロ RNA 数は、図 6 に示したように、いずれの方法でも 1,100 前後と多く、そのうち 840 種が精製方法に依存せず共通であった。これら共通に検出したマイクロ RNA の数や発現量の分布が、細胞由来と類似したことから、細胞外小胞由来マイクロ RNA は分泌源である細胞の状態等を反映して発現変動する可能性が高い。一方で、高い発現量を示すマイクロ RNA が各手法特異的に検出されたため、精製原理

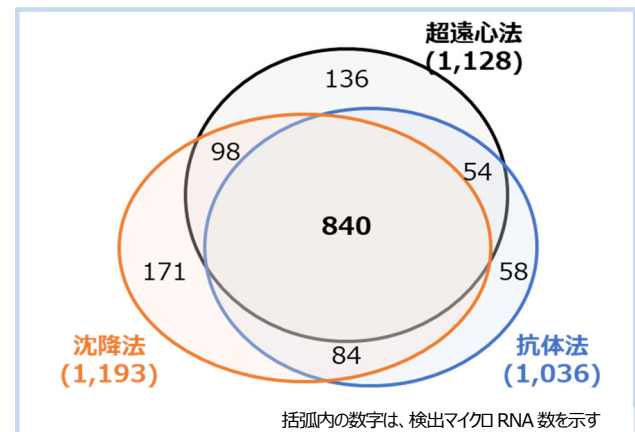


図6 細胞外小胞由来マイクロ RNA の精製方法比較

によって回収できる細胞外小胞が異なると考えている。治療用製剤化においては、目的以外の細胞外小胞が混入しない工程の確立が必要である。したがって、細胞外小胞の精製を最適化し、発現量の低いマイクロRNAを再現性良く、高感度に検出できる 3D-Gene®が適切である。

5. まとめ

近年、マイクロRNAの検出のために様々なプラットフォームが開発されている。網羅的測定手法であるマイクロアレイ 3D-Gene®は次世代シーケンサーと同様、定量性や正確性に優れる一方で、次世代シーケンサーと異なり、発現量に依存することなく測定のばらつきが小さい。このような特長から、特にマイクロRNAのような発現量が低い遺伝子の検出には最適な方法と考えられる。加えて、マイクロアレイはデータサイズが小さく、解析が容易で解釈しやすい利点がある。

3D-Gene®を用いたマイクロRNA解析は信頼性基準（医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律施行規則第43条）に基づいて実施可能であり、基礎研究以外にも医薬・医療分野や再生医療分野での各種申請のためのデータとして活用できる。

（株）東レリサーチセンターでは、3D-Gene®の販売及び受託解析の代理店としてお客様からの様々なニーズにお応えすべく活動している。本技術について、お問い合わせやご不明な点がございましたら是非ともお問い合わせ頂きたい。

引用文献

- 1) Akiyama H, et al. A set of external reference controls/probes that enable quality assurance between different microarray platforms. *Anal. Biochem.* 2015, 472, 75–83.
- 2) Mestdagh, P, et al. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nat. Methods* 2014, 11, 809–815.
- 3) <https://www.3d-gene.com/>
- 4) Xu, W., et al. Human transcriptome array for high throughput clinical studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011, 108(9), 3707–3712
- 5) エクソソームを含む細胞外小胞（EV）を利用した治療用製剤に関する報告書
<http://immunology.w3.kanazawa-u.ac.jp/000249829.pdf>

秋山 英雄
東レ株式会社 新事業開発部門
主幹
趣味：テニス・散策

森脇 有加
株式会社東レリサーチセンター
バイオメディカル分析研究部
主任研究員
趣味：サイクリング・旅