

# アジレントの miRNA マイクロアレイ を用いた血清中 miRNA の プロファイリング

## アプリケーションノート

### 著者

堀井 鈴子  
福岡 弥生  
箕浦 加穂

アジレント・テクノロジー株式会社  
ゲノミクス部門

### 要旨

マイクロ RNA (miRNA) の発現プロファイル解析は、近年基礎研究だけではなく臨床研究の分野でも活用が広がり、癌をはじめとするさまざまな疾患の診断および病態の予測などへの利用が期待されています。特に、細胞から様々な形態で血中に放出され、体内を循環している細胞外 miRNA は、より非侵襲的で感度の高いバイオマーカーとして注目を集めており、血清・血漿中から Total RNA を抽出し、miRNA の発現変動を解析することで、疾病や生物学的プロセスを診断・予測する可能性が探索されています。

アジレントの miRNA マイクロアレイは、高感度・高精度に miRNA を検出します。これまで多岐にわたる研究において、組織由来・培養細胞由来・FFPE サンプル由来など様々な検体を用いて、信頼性の高い miRNA 発現プロファイルが得られてきました。現在、アジレントの miRNA マイクロアレイを用いて、血清・血漿など体液中に存在する miRNA の発現解析を行う試みが精力的に行われています。

本アプリケーションノートでは、2 種類の市販 RNA 抽出キットを用いて、健常人の血清サンプルより抽出された RNA を検討に用いました。まず、マイクロアレイに供する前の RNA サンプルの品質チェック方法を検討しました。次に、これらのサンプルから得たマイクロアレイデータを比較し、再現性・感度を確認しました。さらに、濃度既知の人工合成 RNA を段階的に希釈して添加した結果より、マイクロアレイデータの信頼性の検討を行いました。



Agilent Technologies

## はじめに

アジレントの miRNA マイクロアレイは、基礎研究、臨床研究などの分野で、組織・培養細胞などから抽出した Total RNA 中の miRNA の発現プロファイル測定に広く使われてきました。一方、アジレントの miRNA マイクロアレイを用いた血清や血漿などの細胞成分を含まない体液の miRNA 発現プロファイル測定は、これまでに複数のグループからの成功例の報告がある (Kawata-Ogata *et al.* 2014, Sukata *et al.* 2011) もの、細胞・組織由来の Total RNA からの miRNA 発現プロファイルと比較して、以下のような課題があります。

1. RNA 含量が少ないため、得られる RNA 溶液の濃度が低く、通常用いられる吸光度測定では正確な濃度の測定が不可能である
2. 得られる RNA には rRNA や mRNA など細胞・組織由来の Total RNA の大部分を占める RNA 種が含まれておらず、マイクロアレイ解析に必要な RNA 量の決定が困難である
3. 血清や血漿内には、マイクロアレイ実験に用いるラベル化酵素の反応の阻害物質が存在する
4. 細胞・組織由来の Total RNA の場合よりも、マイクロアレイデータのノーマライゼーションが難しい

このアプリケーションノートでは、アジレントの miRNA マイクロアレイを用いて、ヒト血清から再現性のよい miRNA 発現プロファイルを得るための検討を行いました。

表 1. 血清由来 RNA

RNA#	血清 ID	抽出キット	溶出
1	ID7	miRNeasy	Nuclease-free 水 14 $\mu$ L
2			
3		miRVana PARIS	Nuclease-free 水 100 $\mu$ L バッファ 100 $\mu$ L
4			
5	ID8	miRNeasy	Nuclease-free 水 14 $\mu$ L
6			
7		miRVana PARIS	Nuclease-free 水 100 $\mu$ L
8			

## 実験

### RNA 抽出

健常人 2 名分の血清 (ID7 および ID8) は、株式会社セルイノベーターのご厚意により入手しました。-80°C にて凍結保存されていた血清 200  $\mu$ L から、miRNeasy Serum/Plasma キット (キアゲン社) または miRVana PARIS キット (ライフテクノロジー社) を用いて Total RNA を抽出しました。抽出はそれぞれのメーカーの推奨するプロトコル通りに行いましたが、miRNeasy キットが提供するデータ補正用コントロールである miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control は用いず、等量の水で代用しました。ID7・ID8 血清それぞれについて、2 種類の抽出キットで、Technical replicate として 2 回ずつ独立して抽出を行い、合計 8 つの RNA サンプルを得ました。

miRNeasy キットでは 14  $\mu$ L の Nuclease-free 水、miRVana キットでは 100  $\mu$ L の Nuclease-free 水またはキットに含まれる溶出バッファで RNA を溶出し (表 1)、濃縮遠心器を用いて水分を蒸発させ、ボリュームダウンしました。その際、RNA のロスを避けるため、完全乾固させず、マイクロチューブの壁に付着した RNA も回収できるようボルテックスで攪拌し、Nuclease-free 水で 8  $\mu$ L に容量を調整しました。

### RNA の確認

濃縮後 8  $\mu$ L に調整した RNA 溶液 1  $\mu$ L を用いて、NanoDrop 分光光度計 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) で吸光度測定を行いました。続いて、Agilent 2100 バイオアナライザの Total RNA Pico Assay を用いて RNA の電気泳動を行いました。

### マイクロアレイ

miRNA マイクロアレイ実験は、Input RNA 量の変更を除いてアジレントの miRNA microarray protocol Version 1.7 October 2009 (G4170-90010) の和文プロトコル通りに行いました。通常、アジレントの miRNA マイクロアレイのプロトコルでは、吸光度測定結果をもとに Total RNA 100 ng をラベル化に用いますが、本検討では血清由来 RNA については、濃度に関わらず濃縮遠心後の 8  $\mu$ L のうち 4  $\mu$ L をラベル化に用いました。

マイクロアレイ実験におけるサンプル由来の問題を区別する目的で、前述の血清由来 RNA8 検体の中から RNA #6 (表 1: 血清 ID8, miRNeasy による抽出) を除き、その代わりに組織由来市販 Total RNA を 1 検体、同一バッチでラベル化し、同一マイクロアレイにハイブリダイズしました。

miRNA Complete Labeling and Hyb キット (アジレント: P/N 5190-0456) を用いてラベル化を行う前に、各 RNA サンプルには miRNA Spike In キット (アジレント: P/N 5190-1934) に含まれる Labeling Spike-In を添加しました。またラベル化完了後には Hyb Spike-In を添加し、2x Hi-RPM Hybridization Buffer と 10x GE Blocking Agent を加えた後に SurePrint G3 Human miRNA マイクロアレイ 8  $\times$  60 K Rel.16.0 (アジレント: P/N G4872A #31181) に 55°C で 20 時間、20 RPM で回転させながらハイブリダイゼーションさせました。

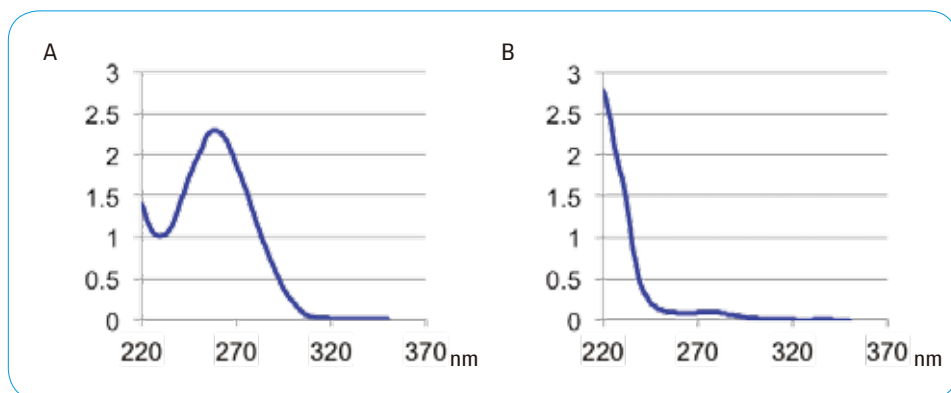


図 1. NanoDrop による吸光度測定結果  
 A) リファレンスとして測定した、組織由来 Total RNA の吸収スペクトル  
 B) miRVana PARIS キットで抽出された、血清由来 RNA の吸収スペクトル

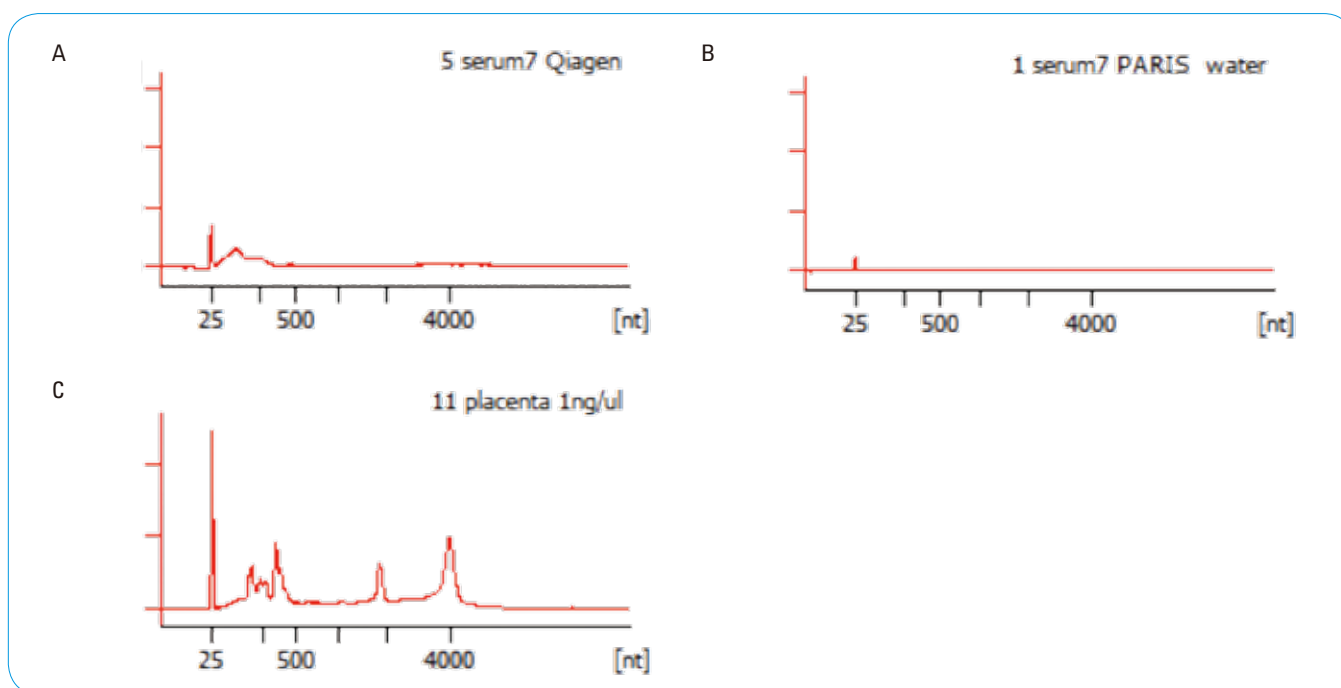


図 2. Total RNA Pico Assay による電気泳動結果  
 A) miRNeasy Serum/Plasma キットを用いて血清から抽出された RNA  
 B) miRVana PARIS キットを用いて血清から抽出された RNA  
 C) リファレンスとして同一ラボチップで測定した、組織由来市販 Total RNA

表 2. miRNeasy キットを用いて抽出した RNA の、Total RNA Pico Assay を用いた定量結果

Serum ID	RNA#	濃度 (pg/μl)	収量 (ng)
ID7	1	262.57	2.10
	2	1560.80	12.49
ID8	5	678.21	5.43
	6	236.85	1.89

## 結果と考察

### RNA の確認結果：吸光度測定

純度の高い組織・細胞由来の Total RNA であれば、260 nm に吸収の最大値を持ち (図 1A)、260 nm の吸光度で核酸濃度の算出が可能です。血清から抽出された RNA は 260 nm に吸収の最大値を持たず (図 1B)、260 nm の吸光度を用いた濃度算出は正確な結果を出さないことが示唆されました。この傾向はいずれの抽出キットでも同様でした。(Data not shown)

### RNA の確認結果：電気泳動

Total RNA 6000 Pico Assay は Total RNA の品質評価のために開発され、正確な定量を目的とした製品ではありませんが、miRNeasy キットを用いて抽出された RNA では、低分子領域にピークが検出され (図 2A)、抽出液中の RNA の存在が確認されました。

miRVana キットを用いて抽出された RNA ではピークが検出されず (図 2B)、RNA の存在を確認することはできませんでした。Nuclease-free 水で溶出をした RNA も溶出バッファで溶出したバッファでも同様の結果が得られました。これらのデータでは、泳動バッファに等量ずつ含まれる Lower Marker のピークが、リファレンスとして同一チップ上で測定した組織由来市販 RNA (図 2C) の Lower Marker のピークよりも著しく低くなっていることから、RNA 溶液の Lab チップ流路内への Injection が、正常には行われていない可能性が示唆されます。よって、RNA のピークが検出できないことを根拠に、抽出が失敗し RNA が得られていないと結論付けるのは難しいと考えられます。

miRNeasy キットで抽出された RNA の Lower Marker も、リファレンス RNA の Lower Marker と比較して低くなっており、得られた定量値 (表 2) は過少評価されている可能性が示唆されます。

### マイクロアレイ結果の QC

本検討で用いた miRNA Spike In キットは、ヒトには相同 miRNA の存在しない、2種類の人工合成 RNA 混合物から構成されています。Labeling Spike-In はラベル化前に RNA 溶液に添加して検体の miRNA と一緒にラベル化し、そのマイクロアレイ上のシグナル強度を確認することでラベル化以降の実験過程の成否を評価することを可能にします。また Hyb Spike-In はあらかじめ蛍光標識されており、ラベル化済みのサンプルに加えて一緒にハイブリダイゼーションを行い、そのマイクロアレイ上のシグナル強度を確認することで、ハイブリダイゼーション以降の実験結果の成否を評価することを可能にします。

今回の結果では 1 検体が僅かに QC Metric を下回った以外は基準値を超え (表 3)、ラベル化ならびにハイブリダイゼーションに問題が無かったことが示されました。

### 再現性の確認

アジレントのマイクロアレイ数値化ソフトウェア Feature Extraction が出力したマイクロアレイ実験結果テキストファイルを、GeneSpring GX v12.5 に取り込み、同一血清から同一 RNA 抽出キットを用いて RNA を抽出し、同時にマイクロアレイで分析された Technical Replicate のシグナル強度を Scatter Plot で比較し、実験の再現性を確認しました (図 3)。ノーマライゼーションをかけない Raw 値の Total Gene Signal 同士の比較でも Technical Replicate 間のシグナル強度はよく一致することから、RNA 抽出からマイクロアレイのシグナルを得るまでの過程は問題なく行われ、再現性のよいデータが得られていることが確認されました。

### 感度比較

各データでの感度を比較する目的で、Feature Extraction によって Detected (バックグラウンドノイズと有意に差があるレベルのシグナル強度を持つ) とコールされた miRNA の数を比較しました (図 4)。同一抽出キットで抽出された Technical Replicate 間では Detected の miRNA 数はよく一致しました。また、miRVana キットの方が miRNeasy キットに比較して、より多くの miRNA が Detected とコールされる傾向が見られました。

表 3. Spike-In Control の結果。Feature Extraction 内で定められている Metric は Labeling Spike-In、Hyb Spike-In 共に 2.5 以上であれば Good、2.5 未満であれば Evaluate

血清 ID	抽出キット	溶出	Labeling Spike-In	Hyb Spike-In
ID7	miRVana	Nuclease-free 水	2.89	3.68
ID7	miRVana	溶出バッファ	2.98	3.67
ID7	miRNeasy	Nuclease-free 水	2.45	3.66
ID7	miRNeasy	Nuclease-free 水	2.97	3.58
ID8	miRVana	Nuclease-free 水	2.99	3.6
ID8	miRVana	Nuclease-free 水	2.98	3.54
ID8	miRNeasy	Nuclease-free 水	2.81	3.64
組織由来 Total RNA			3.21	3.92

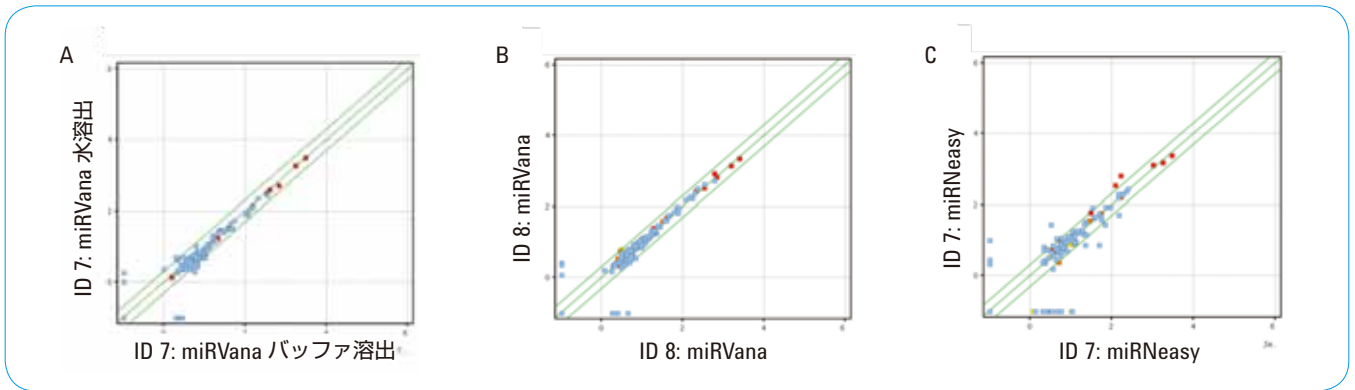


図 3. Technical Replicate 間の再現性。Feature Extraction によって算出された各 miRNA の Total Gene Signal 値をノーマライゼーションなしでプロット。水色のドットはヒト miRNA に対応したプローブ、それ以外の色はコントロールプローブ。

- A) 血清 ID7 から miRVana キットで抽出し、Nuclease-free 水で溶出した RNA とバッファで溶出した RNA の比較
- B) 血清 ID8 から miRVana キットで抽出し、Nuclease-free 水で溶出した RNA 同士の比較
- C) 血清 ID7 から miRNeasy キットで抽出し、Nuclease-free 水で溶出した RNA 同士の比較

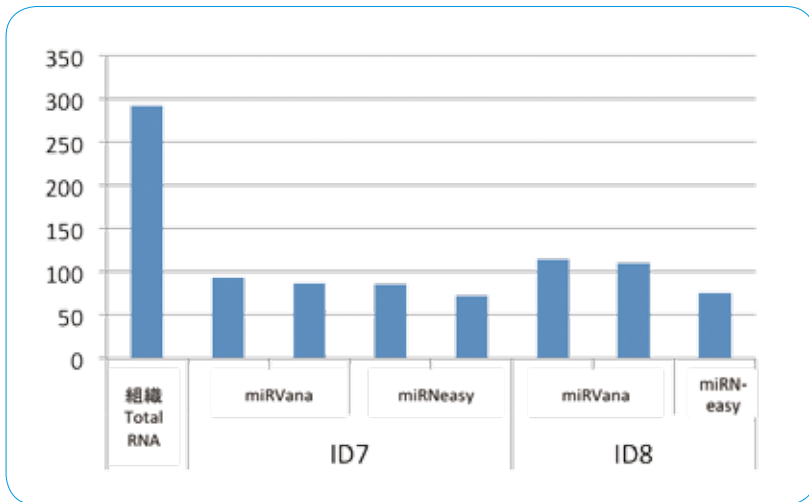


図 4. Feature Extraction によって Detected とコールされた miRNA の数

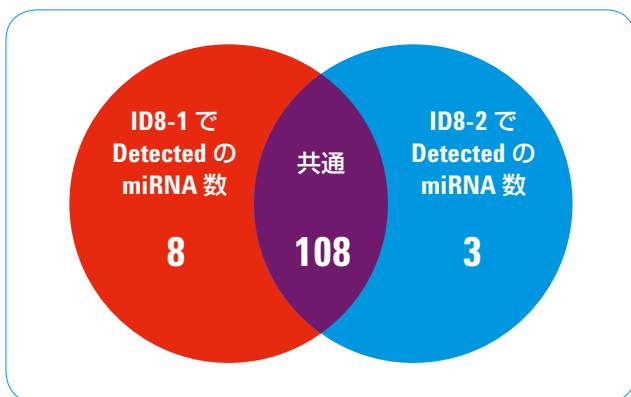


図 5. 血清 ID8 から miRVana PARIS キットを用いて抽出された Technical Replicate 間で Detected とコールされた miRNA の比較

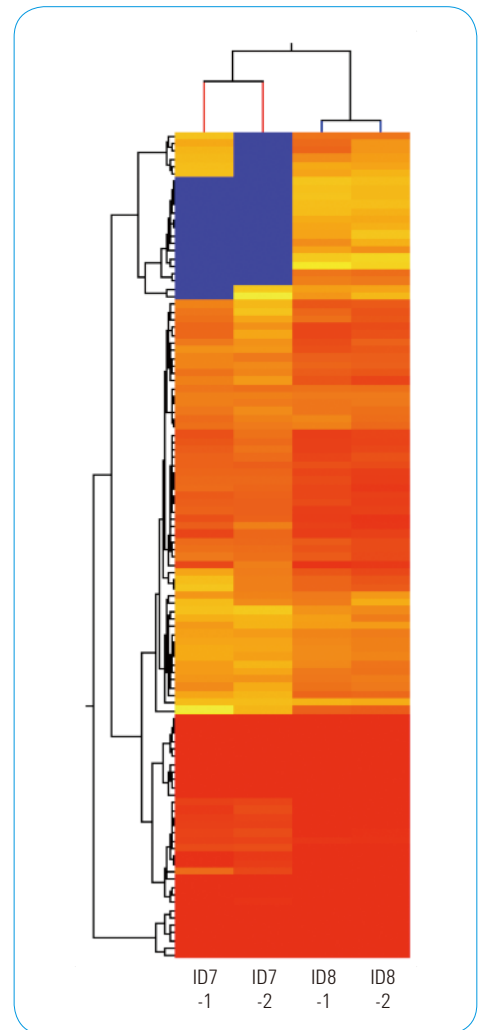


図 6. 血清 ID7 と ID8 から miRVana PARIS キットを用いて抽出した RNA (各 Technical Replicate=2 の計 4 データ) の、miRNA 発現パターンによる Hierarchical Clustering 結果。

### 検出された miRNA リストの比較

血清 ID8 から miRVana PARIS キットを用いて抽出された Technical Replicate 間で、Detected とコールされた miRNA を比較しました (図 5)。それぞれ 116 個、111 個の miRNA が Detected とコールされ、その内 108 個が両者で共通して Detected とコールされており、高い一致率を示しました。同一血清から独立して RNA 抽出を行い、それぞれラベル化してマイクロアレイにかけた結果がよく一致したという結果から、本法を用いることで、信頼性の高い血清中 miRNA の発現プロファイルを得ることができると考えられます。

### miRNA 発現プロファイルを用いたクラスタリング結果

血清 ID7 と ID8 から miRVana キットを用いて抽出された計 4 サンプル (内 2 サンプルずつは同一血清から抽出された Technical Replicate) について、GeneSpring GX v12.5 を用いて、それぞれの miRNA 発現パターンにもとづいて Hierarchical Clustering を行いました (Euclidean distance metrics and centroid linkage rule)。その結果、同一血清から抽出した RNA 同士は同じ Cluster に分類され、RNA 抽出、マイクロアレイ実験の実験誤差よりも個人差による血清中の miRNA 発現パターンの違いが明確に検出できていることを示唆しました。

### 合成 RNA を用いた結果の確認

本法による血清中 miRNA 量の測定真度を確認するため、濃度既知の人工合成 RNA 配列のプール (miRXplore Universal Reference (ミルテニーバイオテク社) を 0.05 fmol から 2 fmol まで 4 段階の量でそれぞれ血清に添加し、RNA 抽出を行って miRNA マイクロアレイで分析しました。その結果、添加量に応じたシグナル強度の変動が確認された (図 7) ことから、本法では、血清中の miRNA の発現量の変動が正確に測定できていると考えられます。

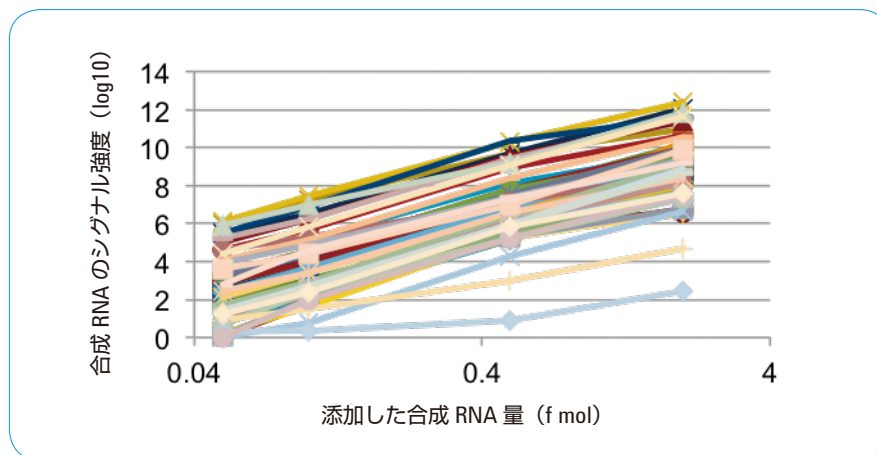


図 7. miRXplore を添加した血清から抽出された RNA の、マイクロアレイによる測定結果。X 軸に各血清に添加した合成 RNA の量 (4 段階) を、Y 軸に各血清から得られた、添加された合成 RNA のシグナル強度を示す。

## 結論

アジレントの miRNA マイクロアレイを用いることで、正確で再現性の高い血清中の miRNA プロファイリングを行った例を示しました。またフレキシブルなアジレントのカスタムアレイ作成ツール eArray を用いることで、複数の生物種の miRNA を同一マイクロアレイ上に搭載することも可能になるため、ある生物種に存在しない他生物種の miRNA を搭載することも可能です。例えば、miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control のような合成 RNA を RNA 抽出前に血清に添加し、それに対応したプローブを搭載したカスタムアレイにハイブリダイゼーションすることにより、ノーマライゼーションのツールとして活用したり、RNA 抽出効率のばらつきがないかを確認したりすることも可能です。

## 参考文献

1. Ogata-Kawata *et al.* (2014) **Circulating Exosomal microRNAs as Biomarkers of Colon Cancer** *PLoS ONE* 2014; **9(4)** e92921
2. Sukata *et al.* (2011) **Circulating microRNAs, possible indicators of progress of rat hepatocarcinogenesis from early stages.** *Toxicol Lett.* 2011; **200(1-2)**46-52

## 謝辞

本アプリケーションノートの作成にあたり、株式会社セルイノベーターの安田香央里様にはサンプルのご提供をはじめ多大なご協力をいただきました。ここに感謝の意を表します。

<http://AgilentGenomics.jp>

このアプリケーションノートに記載されている情報は研究目的のみの使用向けであり、診断目的には対応していません。このアプリケーションノートの情報、記述、および仕様は予告なく変更されることがあります。Agilent Technologies は本書に含まれる誤植、あるいは本品の性能、または使用に関する偶発的ないし間接的な損害に関して責任を負いません。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2014

Published in Japan, July 10, 2014

5991-4979JAJP



**Agilent Technologies**