

アジレント miRNA マイクロアレイおよび バイオアナライザを用いた exosomal miRNA の検出

アプリケーションノート

著者

福岡 弥生
小高 アラン
田谷 敏貴

アジレント・テクノロジー株式会社
ゲノミクス部門

要旨

近年、疾患の臨床研究では非侵襲的なサンプル源として、Liquid biopsy が注目されています。中でも体液中に含まれる細胞外小胞エクソソームに含まれるマイクロ RNA (miRNA) は、生体内の RNase による分解を免れ、細胞から細胞へ運搬されていることから、疾患の進行のメカニズム解明やバイオマーカーとして役立てられないか探索が進められています。

アジレントのバイオアナライザは DNA や RNA、タンパクを高感度に検出できる装置で、使用するキットを変えることで様々な濃度のサンプルを泳動することが可能です。体液中に含まれる RNA は、分光光度計で測ることが困難なほど濃度が低いことが多く、そのような低濃度サンプルの場合、RNA 6000 ピコキットが適しています (定性範囲 50 ~ 5,000 pg/uL)。またアジレント miRNA マイクロアレイは、組織や培養細胞由来、あるいは FFPE 由来 total RNA に含まれる miRNA の解析に実績があり、5 ケタのダイナミックレンジで miRNA の発現差を検出することが可能です。

本アプリケーションノートでは、健常人の血清に含まれるエクソソーム由来 RNA を市販の 3 種類のキットで抽出し、バイオアナライザでの泳動を行いました。また抽出キットで使用が推奨されているスパイクインの検出を行いました。次に抽出したエクソソーム由来 RNA をアジレント miRNA マイクロアレイにハイブリダイズし、再現性や抽出キットの違いによる影響を検証しました。



Agilent Technologies

はじめに

血漿由来 miRNA の白血病マーカー探索などをはじめとして (Tanaka M. *et al.*, 2009)、体液中に含まれる RNA が病態の変化に関与していることが知られています。近年ではさらに、体液中の細胞外小胞、特にエクソソームに含まれる RNA が細胞間の情報交換を担っているという報告がなされています (Kosaka N., 2016)。エクソソーム由来 RNA の生体内での詳しい作用機序 (メカニズム) はいまだ不明な点が多く、様々な病態で解明が期待されます。アジレント miRNA マイクロアレイを用いた報告としては、乳がんが脳へ転移する際に特定の miRNA が脳関門を破壊するメカニズムの解明 (Tominaga N. *et al.*, 2015) や、2 型糖尿病のマーカー miRNA 探索などがあります (Delić D. *et al.*, 2016)。

これまでエクソソーム由来 RNA は、さまざまな抽出方法が検討されていますが、エクソソーム中の RNA 含有量が少なく、抽出が難しいといった問題がありました。最近、エクソソーム由来 RNA を抽出するためのキットが市販されるようになりましたが、RNA の抽出量が少なく、UV 分光光度計での検出・定量が困難となることから、total RNA のように一般的な質を確認するための基準がない、さらには続く実験に必要な量の RNA を確保できないといった課題があります。

このアプリケーションノートでは、複数種の抽出キットで健常人のエクソソーム由来 RNA を抽出し、アジレントの電気泳動装置バイオアナライザを用いた分析を行い、抽出キットの差が見られることを確認しました。必要な RNA 量の確保には満たないものの、全てのサンプルをアジレント miRNA マイクロアレイで解析した結果、同一抽出キットを用いた場合、同一人物由来 RNA のデータは再現性良く取得された一方、抽出キットによるデータ差も検出されました。

実験

RNA 抽出

健常人 3 名分 (A ~ C、白人女性、70 歳代) の血清を PromedDx 社から購入し、株式会社 DNA チップ研究所にて 3 種類の市販キットを用いてエクソソーム由来 RNA を抽出しました。夾雑物を除くため、 -80°C にて保存されていた血清を融解後、 ϕ 0.22 μm のフィルターでろ過し、血清 3.7 mL からは exoRNeasy Serum/Plasma Maxi Kit (キアゲン社) を用いて、血清 1 mL からは exoRNeasy Serum/Plasma Midi Kit (キアゲン社) あるいは Total Exosome isolation from serum と Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit の組み合わせ (サーモフィッシャーサイエンティフィック社、以後 Total exosome Kit と表記) で RNA を抽出しました。抽出はそれぞれのメーカー推奨プロトコルに従い、exoRNeasy キットが提供している miRNeasy Serum/Plasma Spike-In control (キアゲン社) を 2 種類の exoRNeasy キットの他、Total exosome Kit での抽出時にも、スタート血清量が同じ exoRNeasy Midi Kit と同条件で添加しました。3 人の血清サンプルから、3 種類のキットで、テクニカルレプリケートとして独立して 2 回ずつ、計 18 回抽出を行いました。それぞれの血清量やカラム溶出量、最終的に得られた液量を表 1 にまとめました。

表 1 計 18 回の抽出の内訳

抽出キット	抽出回数	抽出血清量 (mL)	カラム溶出量 (uL)	得られた液量 (uL)
exoRNeasy Serum/Plasma Midi Kit	ヒト A, B, C 各 2 回	1	14	10 ~ 12.8
exoRNeasy Serum/Plasma Maxi Kit	ヒト A, B, C 各 2 回	3.7	14	11.8 ~ 12.6
Total Exosome isolation from serum および Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit	ヒト A, B, C 各 2 回	1	100	85.6 ~ 100

バイオアナライザでの電気泳動

溶出したサンプル溶液 1.5 μL を 72°C 2 分で熱変性した後、Agilent RNA6000 ピコキット (Agilent P/N 5067-1513) を用いて RNA の電気泳動を行いました。Total exosome Kit で抽出したサンプルは、溶出量が多く検出できなかったため、濃縮した後に再度泳動を行いました (図 1)。また RNA 6000 ピコキットでの泳動は、抽出時のバッファや塩の影響を受けやすいため、ポジティブコントロールとして、9 種のヒト組織および細胞由来の Universal Human miRNA Reference RNA (Agilent P/N 750700) もチップごとに泳動しました。

サンプルの濃縮

exoRNeasy Midi Kit あるいは exoRNeasy Maxi Kit で抽出した RNA はバイオアナライザでの泳動や定量 PCR に用いた残りの溶液を濃縮遠心機で濃縮し、Nuclease Free Water (NFW) で 7 μL に調整しました。Total exosome Kit で抽出した RNA は、原液を泳動した後、全量を濃縮し、NFW で 4 μL に調整しました。0.5 μL を希釈しバイオアナライザで泳動した後、NFW で 7 μL に調製しました。

qRT-PCR 実験

エクソソームから RNA を抽出する際に添加した、miRNeasy Serum/Plasma Spike-In control (キアゲン社) を検出するため qRT-PCR を行いました。exoRNeasy Midi Kit あるいは exoRNeasy Maxi Kit で抽出した RNA は原液を 1.5 μ L、Total exosome Kit で抽出した RNA は濃縮後の RNA 溶液 1.5 μ L をテンプレートとし、exoRNeasy Kit に含まれる Ce_miR-39_1 miScript Primer Assay および miScript II RT Kit (キアゲン社) を用いて逆転写反応を行いました。その後、miScript SYBR Green PCR Kit (キアゲン社) を用い、AriaMx リアルタイム PCR システム (Agilent P/N G8830A) でリアルタイム PCR 反応を行いました。AriaMx リアルタイム PCR システムは Fast タイプの装置のため、サーマルプロファイルはキアゲン社推奨のプロファイルから変更しました。

また定量範囲を検証するため、miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control を $10 \sim 10^6$ copies となるように調整し、検量線を得ました。エクソソーム由来 RNA サンプルおよび検量線のデータはトリプリケートでデータを得ました。

マイクロアレイ実験

miRNA マイクロアレイ実験は、Input RNA 量の変更を除いて Agilent miRNA microarray protocol Version 3.1.1 August 2015 (G4170-90011) の和文プロトコルに従いました。通常、アジレント 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、本検討ではエクソソーム由来 RNA サンプルについては、濃度に関わらず濃縮遠心後の 7 μ L のうち 2 μ L をラベル化に用いました。

miRNA Complete Labeling and Hyb キット (Agilent P/N 5190-0456) を用いてラベル化を行う際、各 RNA サンプルには microRNA Spike In キット (Agilent P/N 5190-1934) に含まれる Labeling Spike-In を添加しました。またラベル化反応後、Hyb Spike-In を添加し、3 スライドの SurePrint G3 Human miRNA マイクロアレイ 8 \times 60K Rel.21.0 (Agilent P/N G4870C) にハイブリダイゼーションしました。

マイクロアレイ実験に問題が生じた際、サンプル溶液の影響かどうかを判断するため、Universal Human miRNA Reference RNA (Agilent P/N 750700) をポジティブコントロールとして、エクソソーム由来 RNA と同時にラベル化反応を行い、1 スライドごとに 2 アレイずつハイブリダイズしました。マイクロアレイは洗浄後、SureScan マイクロアレイスキャナ (Agilent P/N G4900DA) でスキャンし、スキャナ付属の Feature Extraction ソフトウェア ver.11.5 で数値化を行いました。スポット位置の自動認識がずれたデータは、マニュアルでスポット位置の修正を行いました。また Feature Extraction が Detected とコールした miRNA を、バックグラウンドと区別して検出された miRNA として扱いました。

マイクロアレイのデータ解析

Feature Extraction から出力された数値化テキストファイルを GeneSpring GX ソフトウェア ver.14.5 (Agilent) に取り込み、解析を行いました。組織あるいは培養細胞由来の total RNA を解析する際は、90 percentile のシグナル強度で percentile shift を行うアレイ間補正が推奨されていますが、本検討では、全体のシグナル強度が低いこと、またサンプル間の違いがマイクロアレイデータに及ぼす影響を検証するため、アレイ間補正は行わずデータの解析を行いました。

結果と考察

バイオアナライザでの電気泳動

exoRNeasy Serum/Plasma Midi あるいは Maxi Kit で抽出したエクソソーム由来 RNA を Agilent RNA 6000 ピコキットで泳動すると、small RNA 領域にピークが見られた一方、高分子側にもスミアなピークが観察されました (図 1 a および b)。一部のサンプルはスミアなピーク中に階段状のピークが検出され、濃度も高く算出されました。階段状のピークがサンプル溶液中のパuffa 由来か判断するため、3 倍に希釈し泳動したところ同様な泳動結果が得られました (data not shown)。

またラダや Universal Human miRNA Reference RNA、ブランクレーンに異常は見られないため、泳動に問題は生じておらず、サンプルの特性であると判断しました。

Total exosome Kit で抽出した RNA は原液ではバイオアナライザ RNA 6000 ピコキットの検出限界を下回り、ピークが観察されなかったため、濃縮後再度泳動を行いました (図 1 c)。その結果、ヒト A および C について small RNA 領域にわず

かにピークが検出されましたが、ヒト B の 2 サンプルに関してはノイズになりました。サンプルレーン以外は正常に泳動できているため、ノイズはサンプル溶液由来と判断しました。またいずれのサンプルも、便宜上濃度は算出されましたが、RNA 6000 ピコキットの検出範囲以下の濃度となりました。

また全体の傾向として、抽出した血清量が多いほど、濃度が高くなり、より多くの RNA が得られていることが示されました。

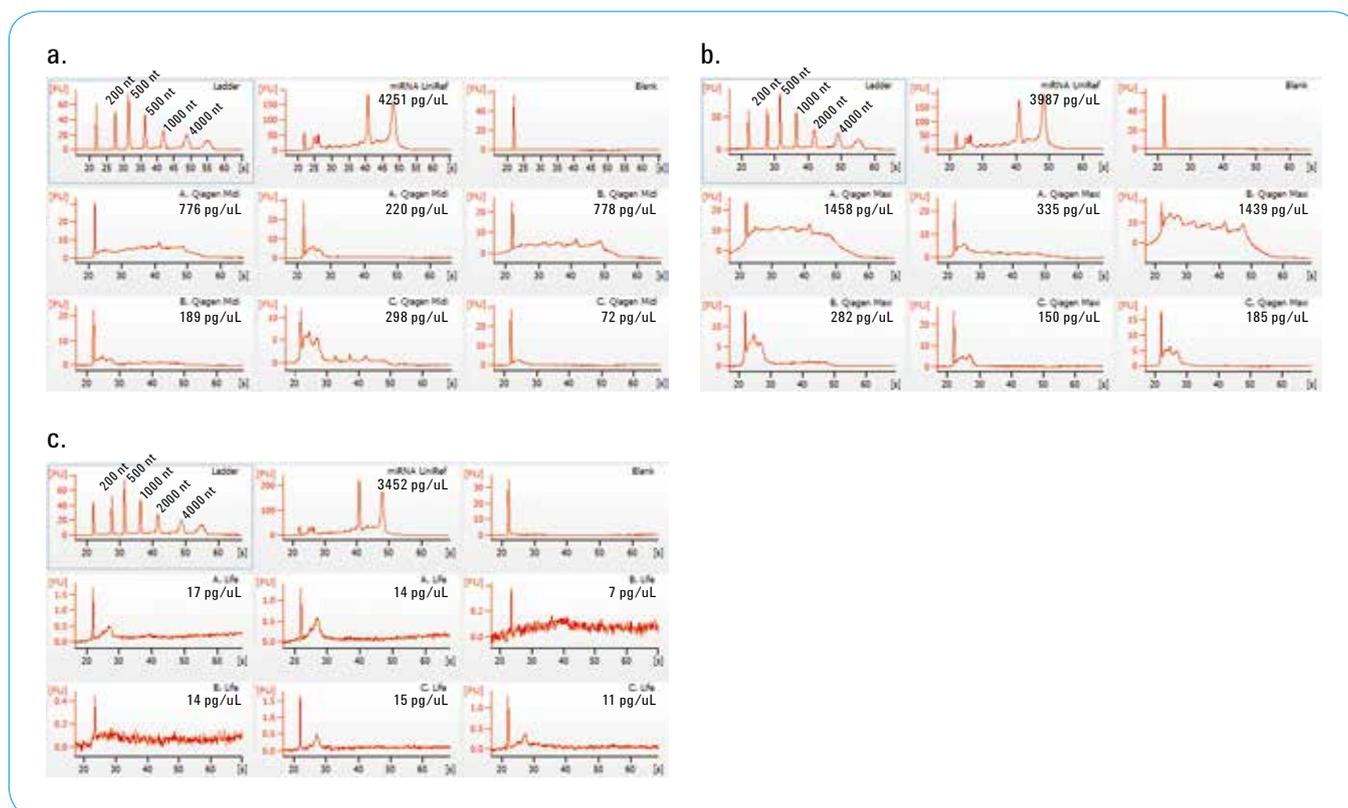


図 1. エクソソーム由来 RNA の泳動図

- 血清 1 mL から exoRNeasy Serum/Plasma Midi Kit で抽出
- 血清 3.7 mL から exoRNeasy Serum/Plasma Maxi Kit で抽出
- 血清 1 mL から Total Exosome isolation from serum と Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit で抽出 (濃縮後のサンプル)

miRNA UniRef : Universal Human miRNA Reference RNA

A~C : 正常人 3 名

濃度 : RNA 6000 ピコキットの測定値

定量 PCR による Spikeln の検出

各抽出の成否を判断するために抽出時に添加した miRNeasy Serum/Plasma Spike-In control の検出を行いました。まず、この Spike-In control を用いて検量線を得、定量性が保たれている範囲を検証したところ、今回の実験系では 20 ~ 32 Cq で直線性が得られました (図 2 a)。

exoRNeasy Serum/Plasma Midi あるいは Maxi Kit で抽出した各サンプルの Cq 値は、検量線で直線性が得られた範囲で検出され、抽出は成功していることを確認できました (図 2 b)。一方、Total exosome Kit で抽出したサンプルは Cq 値 32 を超え、定量範囲内では検出できませんでした。

血清 1 mL から抽出した exoRNeasy Midi Kit 使用時と同じ条件で miRNeasy Serum/Plasma Spike-In control を添加しましたが、溶出量が多いこと、濃縮し溶液量を調節したことなどから、検出できなかったことが考えられます。

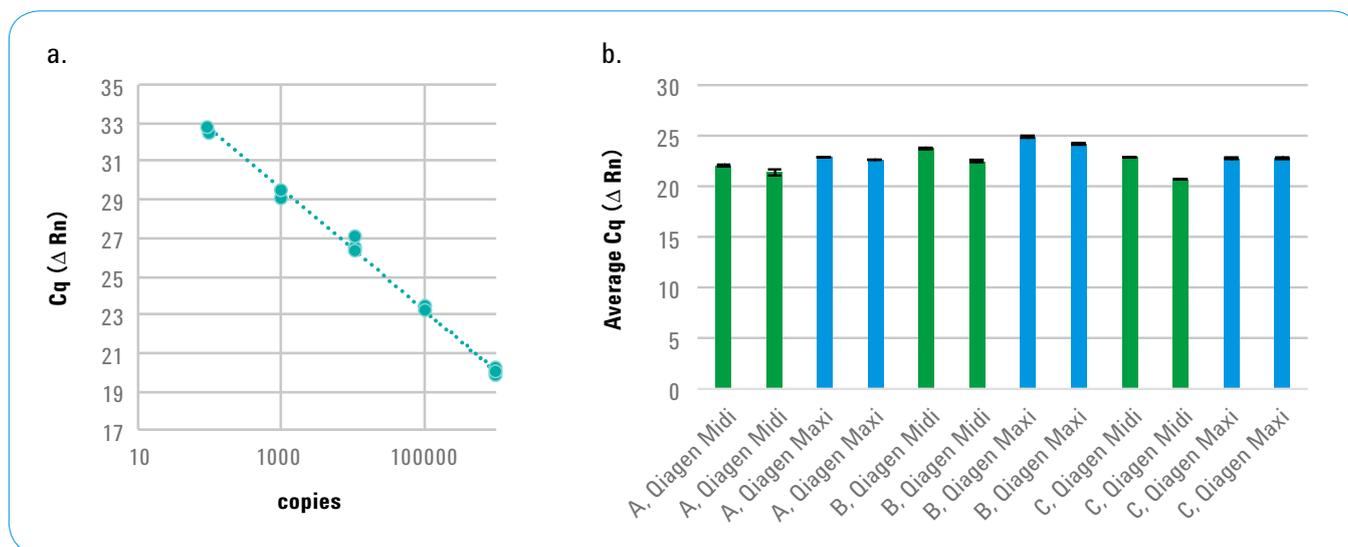


図 2. miRNeasy Serum/Plasma Spike-In control の検出

a. Spike-In control を用いた検量線

b. 各サンプル中の Spike-In control の Cq 値

miRNA マイクロアレイ

シグナル強度

本検討では、推奨プロトコルよりも少ない RNA 量をラベル化・ハイブリダイズしていること、エクソソーム由来 RNA は miRNA 含有量が少ないことが予想されることから、シグナル強度の確認を行いました。マイクロアレイに搭載されている

miRNA の 90 percentile のシグナル強度を確認したところ(図 3 a)、ポジティブコントロールの Universal Human miRNA Reference RNA を除き、全てのサンプルで、有意なシグナル強度ではないことを示す 0.1 となりました。一方 99 percentile では

シグナル強度が観察され(図 3 b)、miRNA が検出されていることが示唆されました。ただし、Total exosome Kit で抽出されたヒト B の 2 サンプルのみ、99 percentile のシグナル強度も 0.1 となりました。

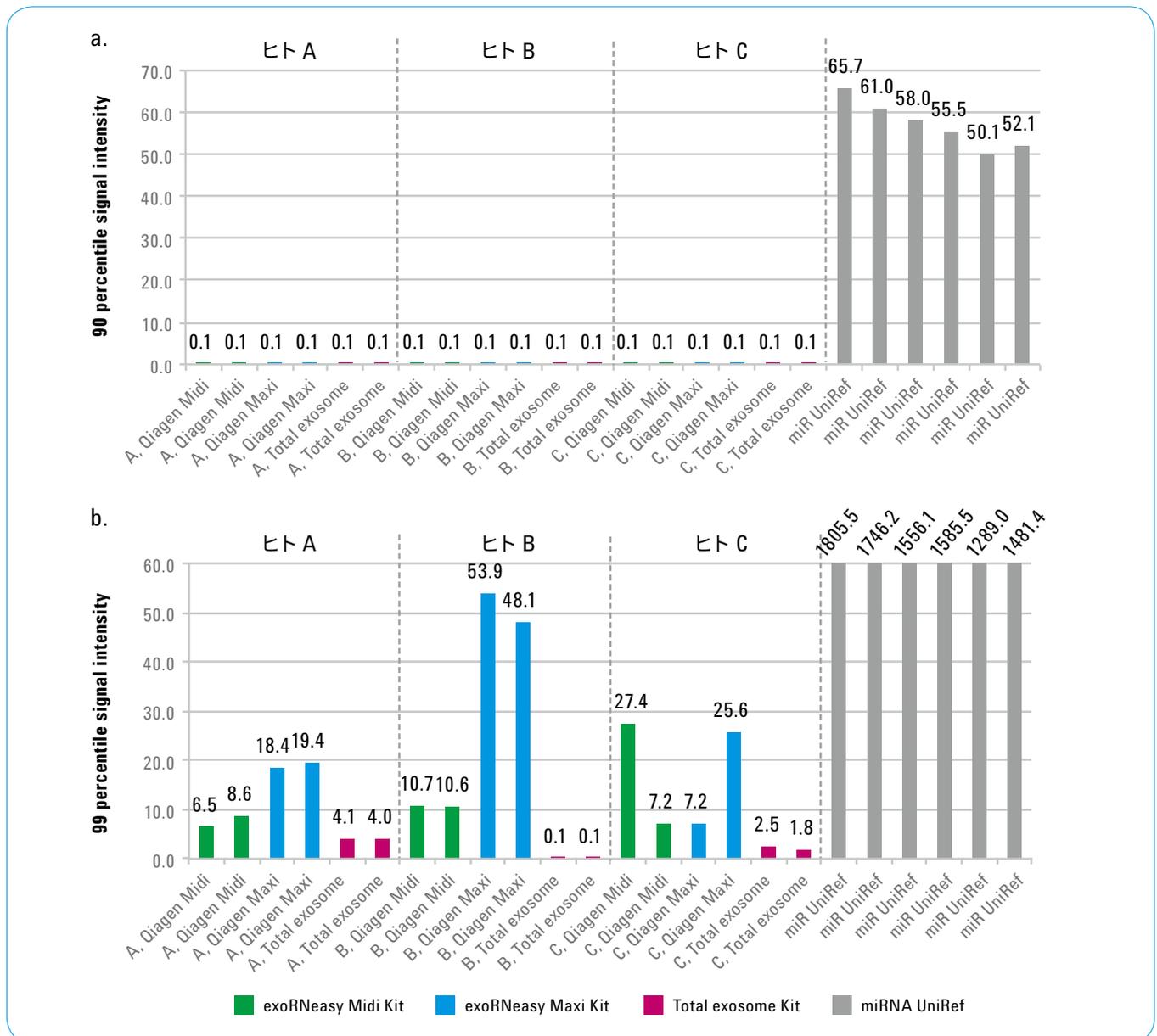


図 3. miRNA マイクロアレイで検出されたシグナル強度

a. 90 percentile のシグナル強度

b. 99 percentile のシグナル強度

マイクロアレイ結果の QC

本検討で用いた microRNA Spike In キット (Agilent P/N 5190-1934) は、ヒトには相同 miRNA が存在しない、人工合成 RNA の混合物です。Labeling Spike-In は RNA サンプルに添加しラベル化反応を行い、Labeling Spike-In に対応したマイクロアレイ上のシグナル強度を確認することで、ラベル化反応の成否を判断することができます。同様に Hyb Spike-In はラベル化反応後、ハイブリダイズ時にサンプルに添加することで、ハイブリダイゼーション以降の実験ステップを評価することができます。

今回の結果では Hyb Spike-In は添加したすべてのアレイで基準の 2.5 を超え、ハイブリダイズ以降の実験ステップに問題が生じていないことが示されました (図 4 b)。一方、Labeling Spike-In を添加したサンプルのうち、ヒト B のエクソソーム由来 RNA を Total exosome Kit で抽出したデータは、Labeling Spike-In が検出されず負の値となりました (図 4 a)。

またアレイ内の再現性は CV15% 以下が目安となります。アレイ全体のシグナル強度が低いので、アレイ内再現性が悪くなることが予測されましたが、Universal Human miRNA Reference RNA だけではなく、エクソソーム由来 RNA のデータも 15% 下回りました。ただしヒト B のエクソソーム由来 RNA を Total exosome Kit で抽出したサンプルは、検出された miRNA 数が少なく、正しく計算されず負の値となりました (図 4 c)。

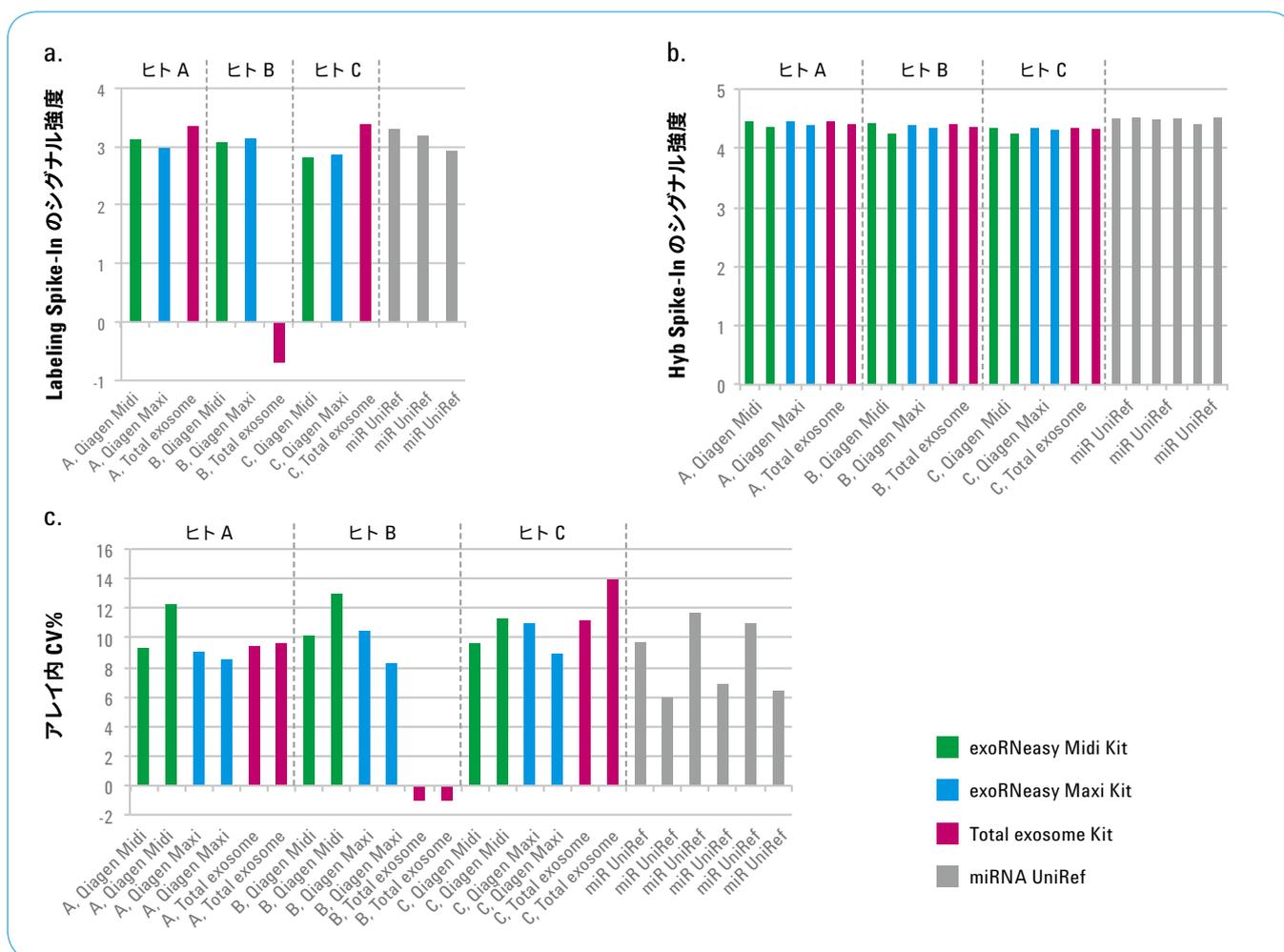


図 4. miRNA マイクロアレイの QC
a. Labeling Spike-In のシグナル強度
b. Hyb Spike-In のシグナル強度
c. アレイ内 CV%

マイクロアレイの検出感度

各サンプルで検出された miRNA 数を比較するため、Detectedとコールされた miRNA (バックグラウンドとくらべ、シグナル強度が有意に差があると判定された miRNA) をまとめました (図 5)。その結果、若干の差はあるものの、同一人物から同じキットで抽出したサンプルでは似た傾向を示しました。

一方で、同一人物由来でも抽出キットが異なると検出数に違いが生じることが示されました。特にヒト B のエクソソーム由来 RNA を Total exosome Kit で抽出したサンプルは、2 回のデータとも検出 miRNA 数が少なく、前述のマイクロアレイの QC 結果と合わせ、サンプル溶液中に miRNA が少なかった、あるいは何らかの要因でラベル化反応がうまくいかなかったことが考えられます。

再現性

同じ抽出キットを用いた各 6 データで検出された miRNA から算出した correlation 値を GeneSpring GX ソフトウェアを用いて比較しました (図 6 a ~ c)。その結果、同一条件で抽出した同一人物由来の 2 回のアレイデータは再現性は高く、個人間の違いが捉えられていることが示されました。

また図 1 a. のバイオアナライザのデータでは同一人物由来でも、small RNA 領域のみに検出されたサンプルと、階段状のスマアピークが検出されたサンプルがありました。このピーク形状の違いは、アレイデータの再現性との関連性は見いだされませんでした (図 6 d)。

抽出キット間の比較

本検討に用いた、健康人 3 名を 3 つの抽出キットで抽出したことのアレイデータへの影響を確認するため、PCA を行いました。PCA ではマイクロアレイ実験のポジティブコントロールとして用いた Universal Human miRNA Reference RNA およびラベル化がうまくいっていないと思われる、ヒト B のエクソソーム由来 RNA を Total exosome Kit で抽出した 2 データを除き、残り 16 データで解析しました。また 16 データ中 8 データで検出された 115 個の miRNA で解析しました (図 7)。その結果、個人間差よりも用いた抽出キットの違いが、マイクロアレイデータに影響を与えることが示されました。このことから、抽出方法は比較したい一連のサンプルで、統一することが望ましいことが示唆されました。

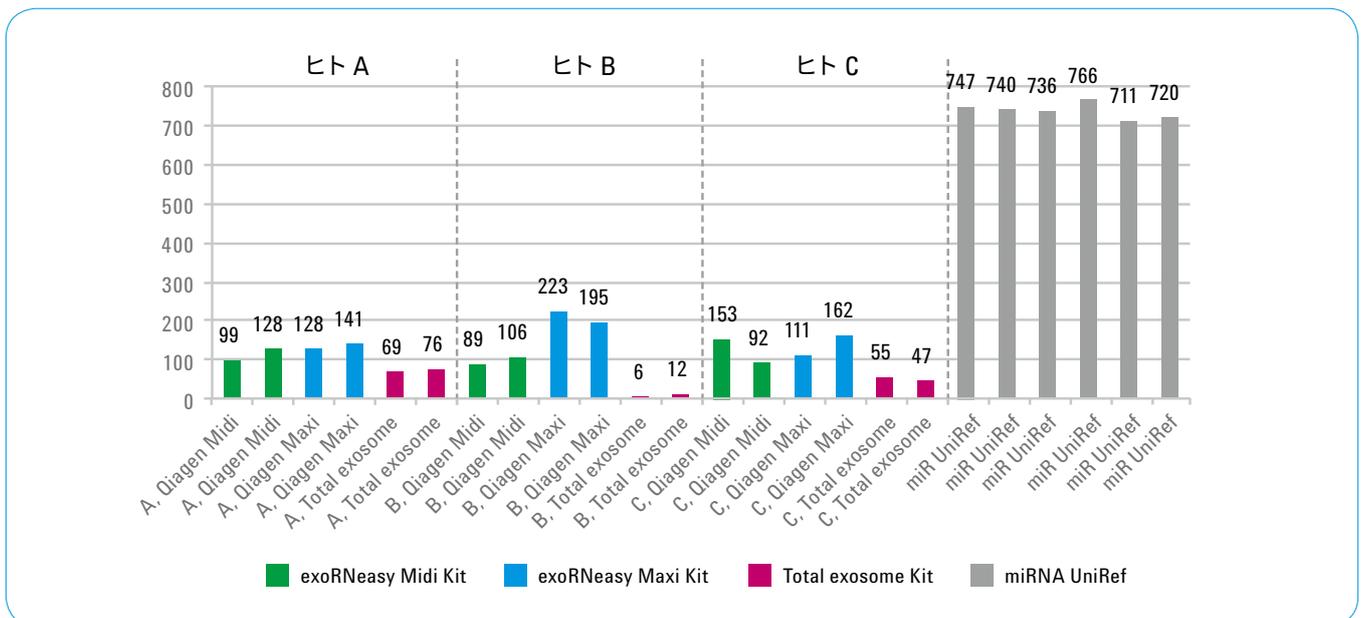
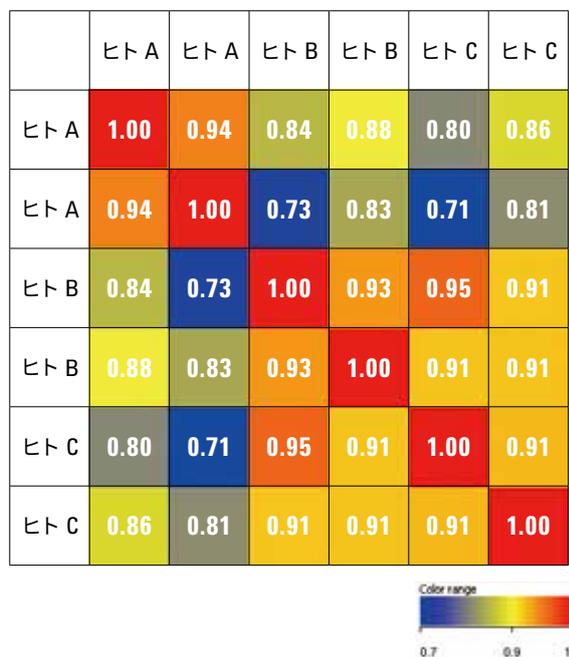
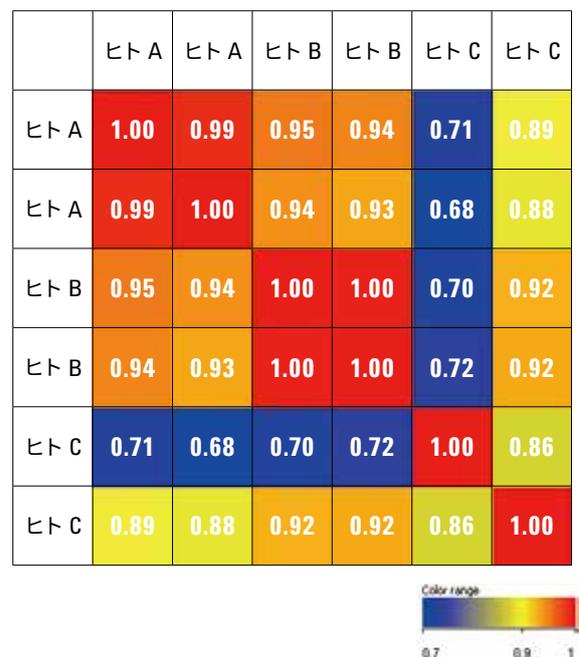


図 5. Detected とコールされた miRNA の数

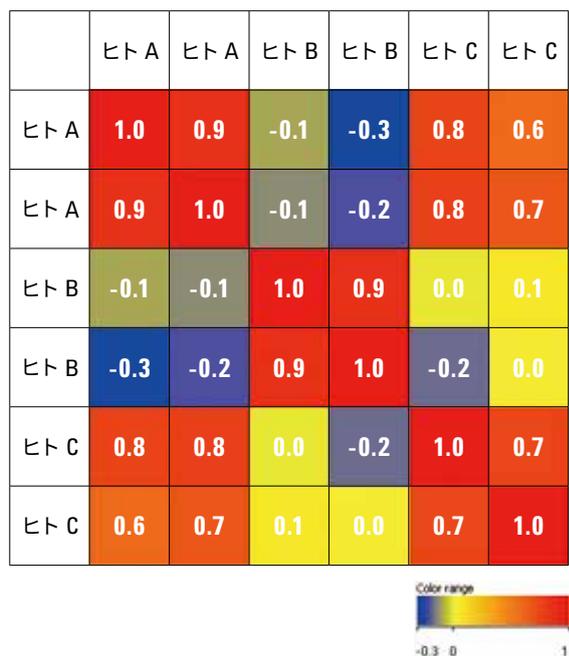
a.



b.



c.



d.

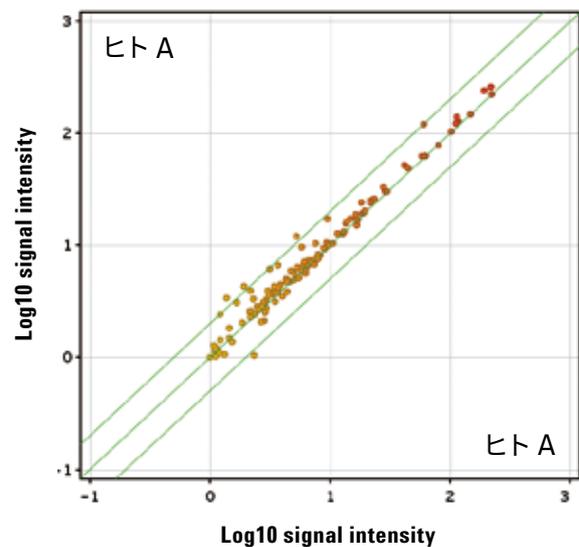


図 6. アレイ間の再現性

a. exoRNeasy Midi Kit で抽出したレプリケート間の Correlation 値 (67 miRNAs)

b. exoRNeasy Maxi Kit で抽出したレプリケート間の Correlation 値 (75 miRNAs)

c. Total exosome Kit で抽出したレプリケート間の Correlation 値 (51 miRNAs)

d. ヒト A のエクソソーム由来 RNA を exoRNeasy Maxi Kit で抽出したテクニカルレプリケートのスクリーンショット
(アレイ間補正なし、両アレイで検出された 124 miRNAs を表示)

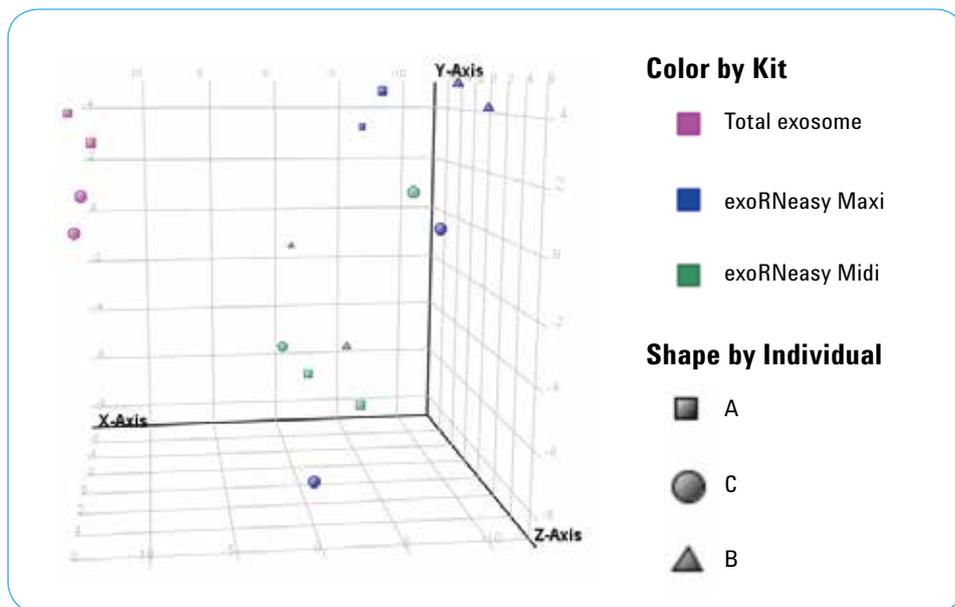


図 7. マイクロアレイの PCA データ

結論

最近では次世代シーケンサによる small RNA の解析も報告されるようになりましたが、解析手法に関わらず、試料となる RNA の確認は重要です。Agilent 2100 バイオアナライザ電気泳動システムを用いることで、エクソソーム由来 RNA が抽出できているかという確認や、抽出キットによる泳動パターンの違いを検出することができました。またバイオアナライザのデータが次に続く実験の成否に関連することが示唆されました。

アジレント miRNA マイクロアレイでは、通常プロトコルで推奨されている、組織や培養細胞由来の total RNA を想定した量には満たない RNA 量でもデータが得られることが示されただけでなく、個人間の再現性や抽出キットの違いを捉えられることも判明しました。エクソソーム由来 RNA をアジレント miRNA マイクロアレイを用いて解析することで、迅速・簡便に疾患などサンプル特有の miRNA 発現差を検出できることが期待されます。

参考文献

1. Tanaka M. *et al.* (2009) **Down-regulation of miR-92 in human plasma is a novel marker for acute leukemia patients.** *PLoS ONE* 2009;4(5):e5532
2. Kosaka N. (2016) **Decoding the Secret of Cancer by Means of Extracellular Vesicles.** *J Clin Med.* 2016 Feb 4;5(2).
3. Tominaga N. *et al.*, **Brain metastatic cancer cells release microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood-brain barrier.** *Nat Commun.* 2015 Apr 1;6:6716.
4. Delić D. *et al.*, (2016) **Urinary Exosomal miRNA Signature in Type II Diabetic Nephropathy Patients.** *PLoS One.* 2016 Mar 1;11(3):e0150154

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 DNA チップ研究所の上田由美様、石澤洋平様には RNA の抽出をはじめ、多大なご協力を頂きました。ここに感謝の意を表します。

<http://AgilentGenomics.jp>

本資料掲載の製品は全て研究用です。その他の用途にご利用いただくことはできません。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., 2016

Published in Japan, Oct. 3, 2016

5991-7468JAJP



Agilent Technologies