

アジレント miRNA マイクロアレイを用いた exosomal miRNA の発現差解析

筆者

福岡 弥生
小高 アラン

アジレント・テクノロジー株式会社
診断・ゲノミクス部門

要旨

近年、血液など体液に含まれる核酸は侵襲性の低いバイオマーカーとして期待されています。中でも血液中のエクソソームに含まれる miRNA は分解されにくく、エクソソーム自体が細胞間の情報のやり取りを担っていることから、疾患の進行状態や老化などに関与しているとして注目を集めています。

アジレント miRNA マイクロアレイは、RNA の逆転写や増幅を行わずに、サンプル中に含まれる miRNA を直接ラベル化・ハイブリダイズし検出します。高い再現性・広いダイナミックレンジで miRNA を検出できますが、組織あるいは細胞由来 miRNA を対象に開発されました。そこで前アプリケーションノートでは、血清から抽出したエクソソーム由来 RNA に含まれる miRNA をアジレントの電気泳動装置バイオアナライザで評価し、アジレント miRNA マイクロアレイで検出できることを示しました。

本アプリケーションノートでは、マイクロアレイでの解析に必要な血清量の検証を行い、さらに市販の肺癌患者および健常者の血清からエクソソーム由来 RNA を抽出しマイクロアレイでの発現差解析を行いました。その結果、血清量に応じてマイクロアレイのシグナル強度が変化すること、2 mL の血清サンプルから解析に十分な数の miRNA を検出でき、バイオロジカルな発現差解析が可能なが示されました。

はじめに

体液中に含まれる細胞外小胞のうち、直径 100 nm 前後の小胞がエクソソームと呼ばれています。近年、エクソソームに内包されている様々な RNA が、細胞間の情報伝達を担っていることが報告されています (Takahashi RU. *et al.*, 2017)。中でもがんにおいては、がん細胞から放出されたエクソソーム由来 miRNA が他の細胞に作用し、腫瘍化や転移、薬剤耐性の獲得に関与することが報告され注目が集まっています。

体液由来あるいはエクソソーム由来 miRNA は、分解されづらく侵襲性の低いマーカーとしても期待されていますが、生体内のメカニズムは未だ解明途中で、これからの解析に期待が持たれています。一方でエクソソーム由来 miRNA は、分光光度計を使用した測定方法では定量できないほど微量である等、実験面での難しさがあります (Garcia-Elias A. *et al.*, 2017)。前報のアプリケーションノート (5991-7468JAJP) では、アジレントバイオアナライザや miRNA マイクロアレイで、エクソソーム由来 miRNA を検出可能であることを示しました。本アプリケーションノートでは、解析に用いる miRNA 数を検出するには、どのぐらいの量の血清が必要かを検証し、さらに健常人と肺癌患者のエクソソーム由来 miRNA で発現差解析を試みました。

実験

RNA 抽出

健常人 3 名分 (A~C、白人女性、70 歳代) および肺がん患者 3 名分 (D~F、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、exoRNeasy Maxi kit (Qiagen P/N 77064) を用いて、RNA を抽出しました。抽出はメーカー推奨プロトコルに従いました。健常人 A の血清サンプルは 3.7 mL (n=2)、2.0 mL (n=3)、1.0 mL (n=3) の血清サンプルから抽出し、マイクロアレイで検出される miRNA 数の検証に用いました。発現差解析には、健常人及び肺がん患者計 6 人の血清サンプル 2.0 mL から RNA 抽出を行いました。肺がん患者 F のみ 1.0 mL からも抽出を行いました (サンプル G)。

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 2100 バイオアナライザおよび RNA 6000 ピコキット (Agilent, 型番 5067-1513) を用いて RNA の電気泳動を行いました。RNA Pico キットでの泳動は、RNA 抽出時のバッファや塩等サンプル溶液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 Universal Human miRNA Reference RNA (Agilent, 型番 750700) もチップごとに泳動しました。

サンプルの濃縮

抽出した RNA はバイオアナライザでの泳動に用いた残り 10 μL の溶液を濃縮遠心機で濃縮し、Nuclease Free Water (Thermo Fisher Scientific, P/N 10977015) で 9 μL に調製しました。miRNA マイクロアレイには濃縮後のサンプルを用いました。

マイクロアレイ実験

miRNA マイクロアレイ実験は、Input RNA 量以外は 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。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、本検討では濃度に関わらず、濃縮遠心後の溶液から 2 μL をラベル化反応に用いました。

マイクロアレイ実験に問題が生じた際、サンプル由来の影響かどうかを判断するため、9 種のヒト組織および細胞由来の Universal Human miRNA Reference RNA (Agilent, 型番 750700) 100 ng 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。

miRNA Complete Labeling and Hyb キット (Agilent, 型番 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, 型番 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、2x Hi-RPM Hybridization Buffer と 10x GE Blocking Agent を加えた後に 3 スライドの SurePrint G3 Human miRNA マイクロアレイ 8 × 60K Rel.21.0 (Agilent, 型番 G4870C) に 55°C で 20 時間、20 RPM でハイブリダイゼーションしました。マイクロアレイは洗浄後、SureScan マイクロアレイスキャナ (Agilent, 型番 G4900DA) でスキャンし、スキャナ付属の Feature Extraction ソフトウェア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。

数値化データの発現差解析には GeneSpring GX (Agilent) を用いました。

結果と考察

スタート血清量の検証

1.0~3.7 mL の血清から exoRNeasy Maxi kit で抽出したエクソソーム由来 RNA をバイオアナライザで泳動すると、small RNA 領域にピークが見られた一方、高分子にもスミアなピークが観察されました (Fig.1、3.7 mL の血清データはアプリケーションノート 5991-7468JAJP より抜粋)。泳動結果からは small RNA あるいは miRNA のみの定量は難しい点、アジレント miRNA マイクロアレイは成熟 miRNA のみを検出する原理である点から、RNA 量の調整は行わず、いずれのサンプルでも 2 μ L をマイクロアレイのラベル化に用いました。プロトコルに従い、ハイブリダイゼーションおよびスキャン、数値化を行い得られたデータの評価を行いました。エクソソーム由来 miRNA は量が少なく、マイクロアレイのシグナル強度が低くなるため、99 percentile のシグナル強度を確認しました。ポジティブコントロールの Universal Human miRNA Reference RNA (UR) と比べると、エクソソーム由来 miRNA サンプルは、シグナル強度は低くなるものの、スタートの血清量が多い方がシグナル強度が高くなる傾向がありました (Fig.2、左軸)。

またマイクロアレイ実験評価の目安の 1 つとなるアレイ内再現性 (CV%) を観察しました。その結果、全体のシグナル強度が低い 1 mL スタート時でも、ポジティブコントロールの UR と同等で、目安となる 15% 未満となり、本検討では CV% はスタート血清量に依存せず、良好であることが示されました (Fig.3)。

ノイズと区別して検出された miRNA の数は、同一スタート量の繰り返し実験間で同等であり、スタート血清量に応じて多くなりました (Fig.2、右軸)。これらのことから、エクソソーム由来 miRNA の検出は、シグナル強度は低いものの安定した結果が得られることが示されました。

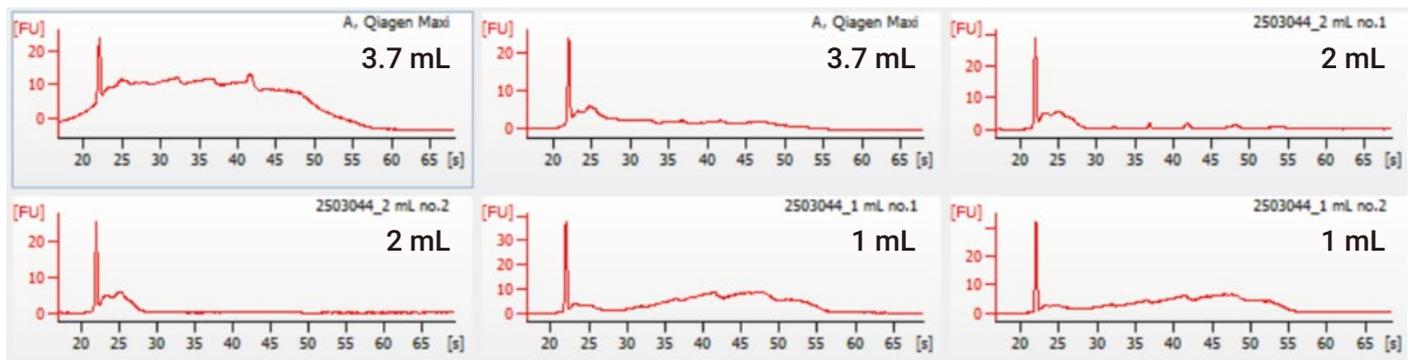


Fig.1 1~3.7 mL の血清由来 RNA の泳動図 (バイオアナライザ RNA 6000 ピコアッセイ)

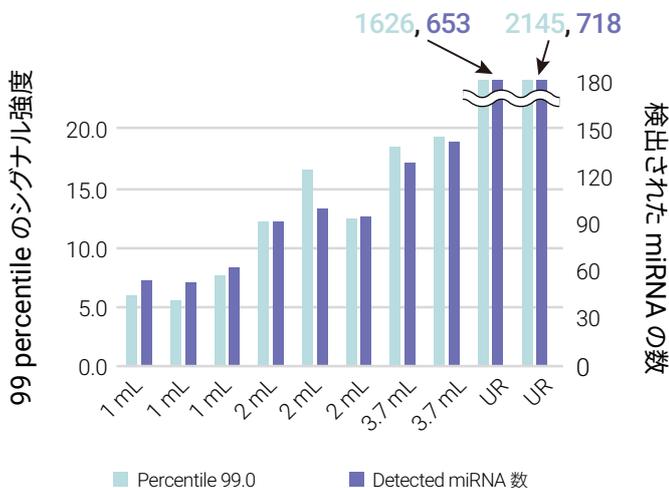


Fig.2 各アレイの 99 percentile のシグナル強度と検出された miRNA 数
UR : Universal Human miRNA Reference RNA

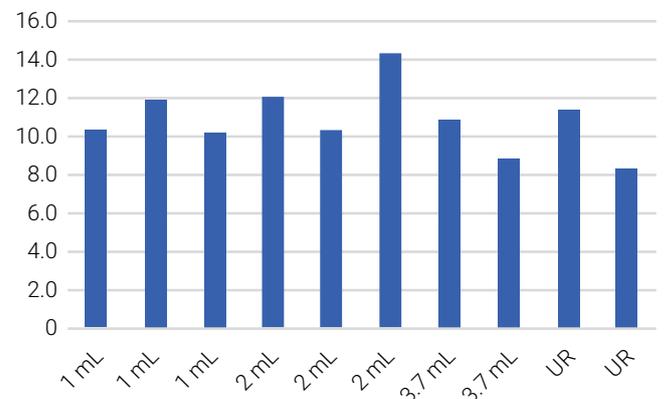


Fig.3 同じ配列のプロープから算出されるアレイ内再現性 (CV%)

マイクロアレイによる発現差解析

安定してマイクロアレイのデータが得られることが示されたので、2 mL の血清から RNA を抽出し、miRNA の発現差解析を行いました。健康人 3 人 (normal, A~C) および肺癌患者由来 3 人 (cancer, D~F)、スタート血清量の違いを観察するため、F のみ 1 mL での抽出データも取得しました (G)。99 percentile のシグナル強度は、cancer サンプルの方がシグナル強度が高く、miRNA の発現量が多いことが示唆されました (Fig.4, 左軸)。シグナル強度同様、ノイズと区別して検出された miRNA 数は、cancer サンプルの方が多くなりました (Fig.4, 右軸)。F と同一の血清サンプルを半量用いた G の 99 percentile シグナル強度は、F の半分程度となり、検出 miRNA 数は、F と比べて減少しました。クラスタリング解析を行うと、血清量の違い (F および G) よりもサンプル種の差が顕著となり、病態の差が検出されていることが示唆されました (data not shown)。

またバイオロジカルレプリケートの再現性を確認すると、発現している miRNA の大部分が中心線に沿ったプロットとなり (Fig.5)、normal 内、cancer 内それぞれで再現性のあるデータが得られていることを確認しました。

マイクロアレイで発現差解析をする際、実験誤差を補正するためアレイ間の補正を行うことが一般的です。アジレントは組織あるいは細胞株由来の total RNA を使用した場合は、各 miRNA マイクロアレイの 90 percentile で補正することを第一候補としていますが、エクソソーム由来 RNA を解析した本検討では、アレイ全体のシグナル強度が低く 90 percentile のシグナル強度もノイズレベルとなりました。血清由来 RNA をマイクロアレイで解析する際に、アレイ間補正に用いられている複数の miRNA は (Shimomura A. et al., 2016)、本検討ではノイズレベルあるいは normal と cancer 間で発現差があり、アレイ間の補正には使用できませんでした。体液由来 RNA のアレイ間補正は議論が続いており、未だエクソソーム由来 RNA 解析時のコントロールとして使用できる miRNA の報告はありません。本検討では、同一のがん患者の血清 2 mL

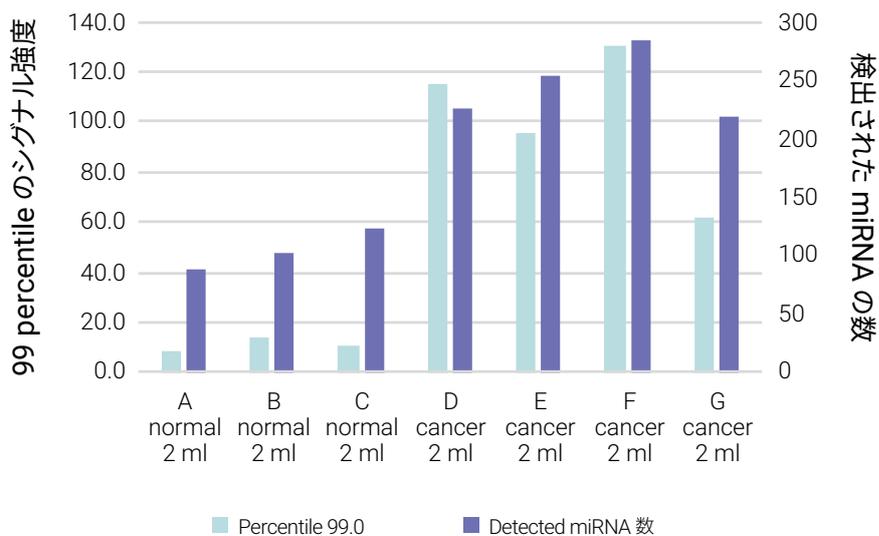


Fig.4 各アレイの 99 percentile のシグナル強度と検出 miRNA 数



Fig.5 サンプル A~C および D~F のスクアタープロット
赤枠内がバイオロジカルレプリケート

あるいは 1 mL から抽出したエクソソーム由来 miRNA をスカッタープロットで比較すると、ほぼ 1/2 のラインに沿ってプロットされ、抽出血清サンプルの量がマイクロアレイでのシグナル強度にある程度反映されていることが示されました (Fig.6)。がん組織ではエクソソームの放出が増えるという報告があること (Bhome R. et al., 2018)、抽出血清量を 2 mL と統一していることから、本検討では検出 miRNA 数の差自体を病態の差とみなし、アレイ間補正を行わずに発現差解析を行うこととしました。

GeneSpring GX を用い、normal A~C および cancer D~F の発現差解析を行いました。2 群のうち、どちらか 3 データ全てでノイズと区別して発現が検出された miRNA から、volcano plot 機能で (T Test unpaired, corrected p-value cut-off < 0.05, Fold change > 2.0)、185 個の miRNA で発現差が検出され、184 個が cancer で発現が上昇していました (Fig.7)。この 184 個の miRNA を Table1 にまとめました。miR-150-5p は唯一発現が下がり、予測ターゲット遺伝子には、がんへの関与が報告されている MYB や MDM4 などの転写因子が含まれていました。

cancer で発現が上昇した miRNA のうち miR-6794-5p や miR-4476 は肺がん患者での発現上昇が報告されています (Dejima H. et al., 2017)。また miR-3195、miR-4459 や miR-1273g-3p は他の miRNA と合わせて卵巣がんのマーカー候補となっています (Yokoi A. et al., 2018)。

GeneSpring の TargetScan 機能を使用して、発現が上昇した 184 個の miRNA がターゲットとしている遺伝子を予測しました。2073 遺伝子がターゲット候補として検索され、さらにそれらの遺伝子を GeneOntology 解析したところ、各種 Development の他、ニューロン新生などに関わる遺伝子をターゲットとしている傾向が見られました (Table 2)。

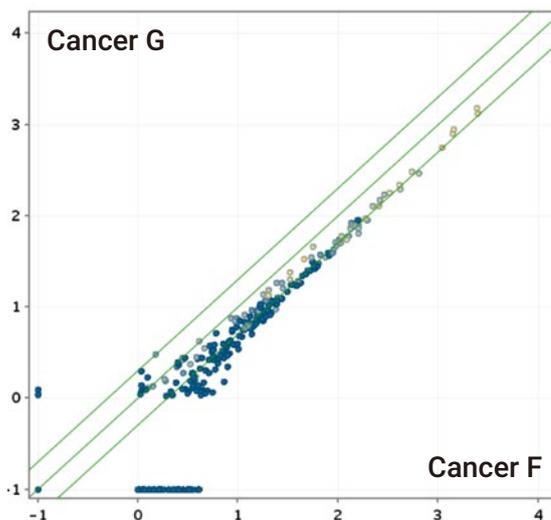


Fig.6 同一個人の 2 mL (F) または 1 mL (G) の血清から抽出したエクソソーム由来 miRNA のスカッタープロット
Log₁₀ signal intensity without normalization
緑のライン：中心線および 2 倍の差

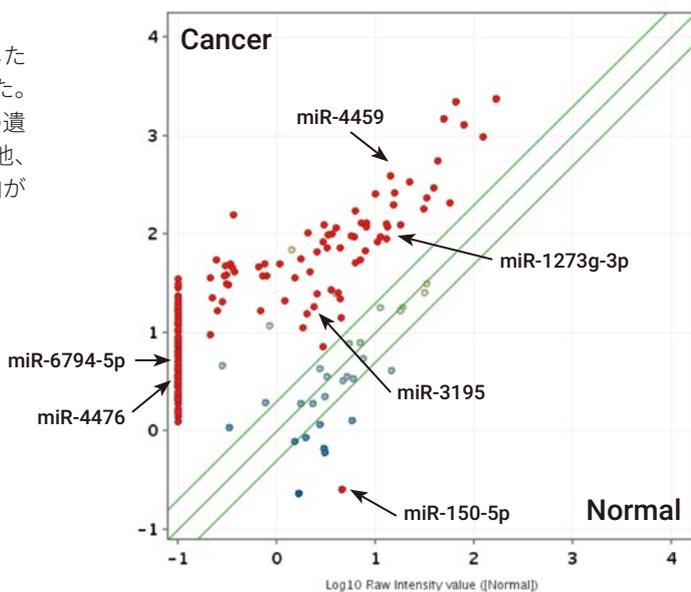


Fig.7 健常者およびがん患者の発現差解析。
Log₁₀ signal intensity without normalization
赤ドット：発現差がコールされた 185 個の miRNA

Table 1. 発現差がコールされた 184 個の miRNA

hsa-miR-30c-2-3p	hsa-miR-1207-5p	hsa-miR-3679-5p	hsa-miR-4669	hsa-miR-6090	hsa-miR-6819-5p
hsa-miR-134-5p	hsa-miR-1225-5p	hsa-miR-3911	hsa-miR-4673	hsa-miR-6124	hsa-miR-6821-5p
hsa-miR-135a-3p	hsa-miR-1229-5p	hsa-miR-3940-5p	hsa-miR-4687-3p	hsa-miR-6125	hsa-miR-6826-5p
hsa-miR-150-3p	hsa-miR-1236-5p	hsa-miR-3960	hsa-miR-4707-3p	hsa-miR-6126	hsa-miR-6829-5p
hsa-miR-187-5p	hsa-miR-1249-5p	hsa-miR-4270	hsa-miR-4716-3p	hsa-miR-6127	hsa-miR-6831-5p
hsa-miR-188-5p	hsa-miR-1268a	hsa-miR-4271	hsa-miR-4739	hsa-miR-6165	hsa-miR-6833-5p
hsa-miR-197-5p	hsa-miR-1268b	hsa-miR-4281	hsa-miR-4741	hsa-miR-6510-5p	hsa-miR-6848-3p
hsa-miR-198	hsa-miR-1273f	hsa-miR-4298	hsa-miR-4745-5p	hsa-miR-6722-3p	hsa-miR-6850-5p
hsa-miR-320c	hsa-miR-1273g-3p	hsa-miR-4306	hsa-miR-4763-3p	hsa-miR-6723-5p	hsa-miR-6865-5p
hsa-miR-328-5p	hsa-miR-1275	hsa-miR-4314	hsa-miR-4767	hsa-miR-6724-5p	hsa-miR-6867-5p
hsa-miR-483-5p	hsa-miR-1471	hsa-miR-4327	hsa-miR-4778-5p	hsa-miR-6727-5p	hsa-miR-6869-5p
hsa-miR-514b-5p	hsa-miR-1587	hsa-miR-4419a	hsa-miR-4785	hsa-miR-6728-5p	hsa-miR-6875-5p
hsa-miR-516a-5p	hsa-miR-1908-3p	hsa-miR-4429	hsa-miR-4787-3p	hsa-miR-6740-5p	hsa-miR-6879-5p
hsa-miR-557	hsa-miR-1915-3p	hsa-miR-4433a-3p	hsa-miR-4787-5p	hsa-miR-6745	hsa-miR-6891-5p
hsa-miR-630	hsa-miR-2392	hsa-miR-4442	hsa-miR-4788	hsa-miR-6749-5p	hsa-miR-6893-5p
hsa-miR-638	hsa-miR-2861	hsa-miR-4443	hsa-miR-4800-5p	hsa-miR-6752-5p	hsa-miR-7106-5p
hsa-miR-642a-3p	hsa-miR-3074-3p	hsa-miR-4459	hsa-miR-5006-5p	hsa-miR-6756-5p	hsa-miR-7107-5p
hsa-miR-642b-3p	hsa-miR-3135b	hsa-miR-4463	hsa-miR-5100	hsa-miR-6763-5p	hsa-miR-7108-5p
hsa-miR-652-5p	hsa-miR-3138	hsa-miR-4466	hsa-miR-5195-3p	hsa-miR-6768-5p	hsa-miR-7109-5p
hsa-miR-671-5p	hsa-miR-3141	hsa-miR-4476	hsa-miR-5585-3p	hsa-miR-6775-5p	hsa-miR-7110-5p
hsa-miR-711	hsa-miR-3162-5p	hsa-miR-4484	hsa-miR-5703	hsa-miR-6780b-5p	hsa-miR-7150
hsa-miR-718	hsa-miR-3195	hsa-miR-4499	hsa-miR-5739	hsa-miR-6785-5p	hsa-miR-7641
hsa-miR-762	hsa-miR-3196	hsa-miR-4505	hsa-miR-5787	hsa-miR-6789-5p	hsa-miR-7704
hsa-miR-765	hsa-miR-3202	hsa-miR-4507	hsa-miR-6068	hsa-miR-6791-5p	hsa-miR-7845-5p
hsa-miR-937-5p	hsa-miR-3610	hsa-miR-4516	hsa-miR-6071	hsa-miR-6794-5p	hsa-miR-7846-3p
hsa-miR-939-5p	hsa-miR-3620-3p	hsa-miR-4530	hsa-miR-6076	hsa-miR-6800-5p	hsa-miR-7847-3p
hsa-miR-1181	hsa-miR-3648	hsa-miR-4532	hsa-miR-6085	hsa-miR-6803-5p	hsa-miR-8063
hsa-miR-1183	hsa-miR-3656	hsa-miR-4534	hsa-miR-6086	hsa-miR-6808-5p	hsa-miR-8069
hsa-miR-1185-1-3p	hsa-miR-3663-3p	hsa-miR-4634	hsa-miR-6087	hsa-miR-6809-5p	hsa-miR-8072
hsa-miR-1185-2-3p	hsa-miR-3665	hsa-miR-4655-3p	hsa-miR-6088	hsa-miR-6812-5p	
hsa-miR-1202	hsa-miR-3667-5p	hsa-miR-4667-5p	hsa-miR-6089	hsa-miR-6819-3p	

Table 2. GeneOntology 結果 (上位 15 個)

GO ACCESSION	GO Term	p-value	corrected p-value
GO:0048731	system development	1.25538E-30	1.51032E-25
GO:0007399	nervous system development	6.07322E-29	3.65326E-24
GO:0007275	mµLticellµLar organism development	1.42849E-27	5.72861E-23
GO:0048856	anatomical structure development	1.48083E-26	4.45387E-22
GO:0032502 GO:0044767	developmental process	2.77794E-25	6.68414E-21
GO:0097458	neuron part	5.57105E-23	1.11706E-18
GO:0045202	synapse	1.24013E-22	2.13138E-18
GO:0044456	synapse part	2.40977E-21	3.62392E-17
GO:0030054	cell junction	3.43148E-21	4.58702E-17
GO:0005515 GO:0001948 GO:0045308	protein binding	5.26826E-21	6.33811E-17
GO:0023051	regµLation of signaling	2.6237E-20	2.86955E-16
GO:0003674 GO:0005554	molecµLar_function	1.69804E-19	1.70239E-15
GO:0005488	binding	2.1747E-19	2.01256E-15
GO:0048522 GO:0051242	positive regµLation of cellµLar process	1.77038E-18	1.52135E-14
GO:0022008	neurogenesis	3.87768E-18	2.91571E-14

まとめ

Small RNA-seqでの解析は、ライブラリ調製が煩雑、miRNA以外の small RNA も多数検出されるという課題がありますが (Buschmann D. *et al.*, 2018)、アジレント miRNA マイクロアレイは迅速に簡便に実験ができ、成熟 miRNA だけを検出することが可能です。

前報でアジレント miRNA マイクロアレイでエクソソーム由来 miRNA を検出できることを示しました。本検討では、抽出する血漿量がマイクロアレイのデータに影響を与えるため、比較するデータ間で抽出血漿量を統一したほうが良いことが示されました。さらに、がんサンプルでは健常者に比べ検出される miRNA が多いことがわかりました。本検討ではがん患者および健常者間で優位なシグナル強度の違いが観察されたため、アレイ間補正を行わずに発現差解析を行いました。その結果、がんに関連すると報告のある miRNA 含め複数の miRNA で発現差が見られ、マイクロアレイでエクソソーム由来の miRNA の発現差を解析できることが示されました。

参考文献

Takahashi RU. *et al.*, The role of extracellular vesicle microRNAs in cancer biology. *Clin Chem Lab Med.* 2017 May 1;55 (5) :648-656.

Garcia-Elias A. *et al.*, Defining quantification methods and optimizing protocols for microarray hybridization of circulating microRNAs. *Sci Rep.* 2017 Aug 10;7 (1) :7725.

Shimomura A. *et al.*, Novel combination of serum microRNA for detecting breast cancer in the early stage. *Cancer Sci.* 2016 Mar;107 (3) :326-34.

「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」 5991-7468JAJP

Bhome R. *et al.*, Exosomal microRNAs (exomiRs) : Small molecules with a big role in cancer. *Cancer Lett.* 2018 Apr 28;420:228-235.

Dejima H. *et al.*, Exosomal microRNA in plasma as a non-invasive biomarker for the recurrence of non-small cell lung cancer. *Oncol Lett.* 2017 Mar;13 (3) :1256-1263.

Yokoi A. *et al.*, Integrated extracellular microRNA profiling for ovarian cancer screening. *Nat Commun.* 2018 Oct 17;9 (1) :4319.

Buschmann D. *et al.*, Evaluation of serum extracellular vesicle isolation methods for profiling miRNAs by next-generation sequencing. *J Extracell Vesicles.* 2018 Jun 4;7 (1) :1481321.

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様、石澤様には RNA の抽出を始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。

[お問い合わせ窓口]

アジレント・テクノロジー株式会社

本社 / 〒 192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1

●カスタムコンタクトセンター ☎ 0120-477-111

mail : email_japan@agilent.com

※仕様は予告なく変更する場合があります。

※本資料掲載の製品はすべて研究用です。

その他の用途にご利用いただくことはできません。

<http://www.agilent.com/chem/genomics:jp>

© Agilent Technologies, Inc. 2020

本書の一部または全部を書面による事前の許可なしに複製、
改変、翻訳することは、著作権法で認められている場合を除き、
法律で禁止されています。

Printed in Japan, Feb., 2020

5994-1777JAJP