

総 括 研 究 報 告 書

課題番号：27-15

課題名：小児期の血漿中 miRNA プロファイルのバイオマーカーとしての有用性を検討するためのデータベース作成

松本健治 (所属施設) 国立成育医療研究センター研究所
(所属・職名) 免疫アレルギー・感染研究部・部長

(研究成果の要約) 本研究では血漿中の microRNA (miRNA) の各種成育疾患の新規バイオマーカーとしての有用性の検討を行うための基盤整備として、小児期の各年齢層の健常児約 50 名の血漿を採取して microRNA 分画を抽出し、アレイを用いた網羅的な miRNA 発現解析を行う。また、同時に血漿中の miRNA の主要な産生源である血管内皮細胞や血球細胞の疾患である循環器疾患、リンパ管腫、腎疾患を第一の候補疾患として、miRNA プロファイリングによる新規バイオマーカーの探索を並行して行ってゆく。また、単にバイオマーカーとしての意義だけでなく、変動が生じる機序の解析として、*in vitro* で血管内皮細胞などを培養する実験系も併せて行う。

第三年度である本年度は、コホートおよび臍帯血の収集を継続し、これまでにアンケートによる各種疾患のない約 30 検体を用いて、マイクロアレイ解析を行い、全ての検体で検出限界以上である miRNA を検索した。その結果、各年齢層で最も変動の少ない miRNA (今後、Housekeeping miRNA となる可能性のある) は各年齢層で異なる事が明らかとなった。

さらに解析を継続し、各年齢別の正常値を作ると共に、年齢に依存して変動する miRNA や性差を認める miRNA を同定する予定である。

1. 研究目的

タンパク質をコードしていない RNA (non-coding RNA) の中でも長さ 22 塩基程度の 1 本鎖 RNA である microRNA; miRNA) が、細胞内で相補的な配列をもつ mRNA の 3' 非翻訳領域と結合し、転写後の遺伝子発現を調節する“機能性 RNA 分子”として注目されている。興味深いことに、この miRNA は血漿や体液中にも分泌されることが明らかとなっており、疾患マーカーあるいは病態マーカーとして有用となる可能性から、現在、癌疾患を筆頭に様々な疾患群で探索が始まっている。しかし、小児科領域での報告はまだ限定的であり、今後の研究の進展が大いに期待される分野である。

本研究の目的は小児期の各種疾患のバイオマーカー候補となりうる血漿 miRNA の基準値を設定して今後の臨床

検体を用いた検索の基盤を整備することを第一の目標とする。また、同時に血漿中の miRNA の主要な産生源である血管内皮細胞や血球細胞の疾患である循環器疾患、リンパ管腫、腎疾患を第一の候補疾患として、miRNA プロファイリングによる新規バイオマーカーの探索を並行して行ってゆく。このような基準値設定は今後のこの分野の研究の基盤整備のために極めて重要な役割を果たすと考えられるが、そのためには多くの検体とそれを解析する労力や時間、資金が必須である。しかし一方、基準値設定のみを目的とした場合には競争的な資金を得ることは極めて困難であり、是非とも成育医療研究開発費で行うべき研究であると考えられる。また、バイオマーカーが見いだされた場合には、単に臨床症状との相関を報告するだけでなく、*in vitro* でその miRNA 量

の変動が誘導される機序の検討が重要となる。当研究部では既に各種サイトカイン刺激した培養血管内皮細胞を miRNA を含まない牛胎児血清中で培養し放出される miRNA を検索する実験系も確立しており、本研究の後半ではこの *in vitro* 刺激系の結果も併せて研究結果をデータベース化し、活用する。以下の5点について検討する。

本研究の具体的な研究計画を示す。

- ①小児期の血漿 miRNA の正常値を決定するため、0才、1-3才、3-6才、7-12才、13-15才の5群の男児女児それぞれ5例ずつの血漿からmiRNAを抽出してマイクロアレイによるmiRNAのプロファイリングを行う。(初年度~2年度)
- 成長に伴い変動するmiRNAが見いだされた場合には、その変動機序に関しての検索を行う。(初年度~2年度)
- ③心疾患患児の血漿中のmiRNAプロファイルを測定し、手術やカテーテルインターベンション前後に、酸素飽和度や血行動態の変化に伴い変動するmiRNAを同定する。(初年度~3年度)
- ④リンパ管腫患児の手術や各種治療の前後で血漿中のmiRNAプロファイルを測定し、手術や各種治療によってmiRNAを同定する。(初年度~3年度)
- ⑤腎疾患患児の手術や各種治療の前後で血漿中のmiRNAプロファイルを測定し、手術や各種治療によってmiRNAを同定する。(2年度~4年度)
- ⑥血液腫瘍患児の発症時の末梢血を用いて血漿中のmiRNAプロファイルを測定し、手術や各種治療によってmiRNAを同定する。(2年度~4年度)
- ⑦*in vitro* で血管内皮細胞やリンパ管内皮細胞を培養して上清中に放出されるmiRNAの検討を行う。(初年度~5年度)

2. 研究組織

主任研究者 所属施設
松本 健治 国立成育医療研究センター

3. 研究成果

①小児期の血漿 miRNA の正常値を決定する

倫理委員会への申請を行い(「小児期の血漿中 miRNA プロファイルのバイオマーカーとしての有用性を検討するためのデータベース作成(受付番号940)」)、平成27年6月29日に承認を得た。小児期の血漿 miRNA の正常値を決定するため、成育医療研究センターで行われている二つのコホート研究である、成育コホート研究(大矢幸弘研究代表者)および成育母子コホート研究(堀川玲子研究代表者)において行われる採血のうち、血算に用いられるEDTA化血の余剰分を頂くように資料収集体制を整備し、平成28年3月までに約30件体を確保した。

第二年度は、コホートから収集し、アンケートによる各種疾患のない9歳児の約30検体のうち、非特異IgE値が170 IU/ml未満、かつ血清TARC値が450 pg/ml以下、かつ抗原特異IgE値が測定した抗原全て1 IU/ml以下の症例13例を対象として、Agilent miRNA version 21(miR Base Rel.21.0準拠、ヒトmiRNA 2549種類を搭載)を用いて、miRNAの網羅的な発現解析を行った。その結果、QCにて外れた1例を除き(図1 No.9)、残る12症例を対象として、全ての検体で検出限界以上であるmiRNAを195種類

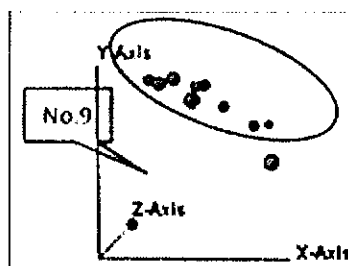


図1 PCAによるQuality Check

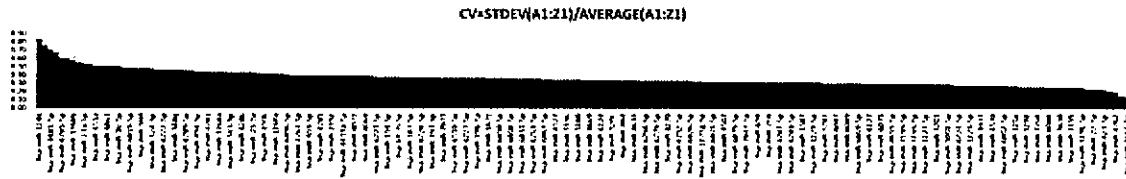


図2 9才の健常12検体における195種のmiRNAの血中濃度の分散

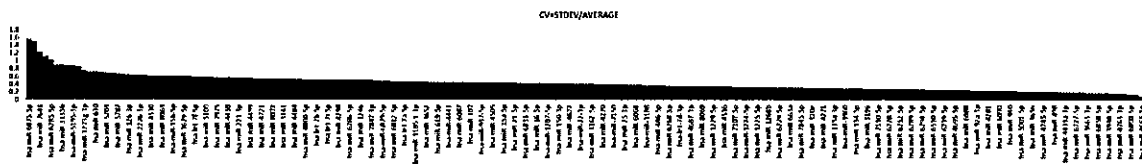


図3 3才の健常11検体における203種のmiRNAの血中濃度の分散

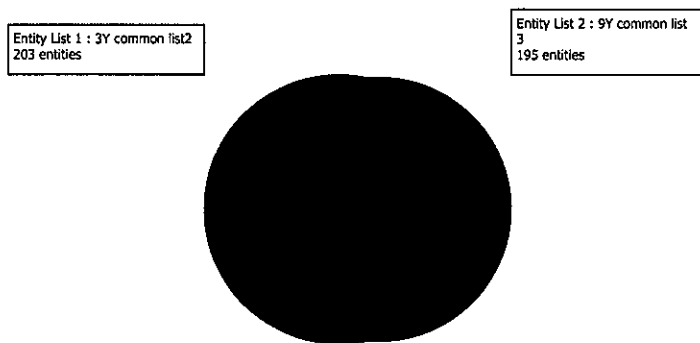


図3 3才および9才の健常検体におけるmiRNAの発現：共通なmiRNAは161種であった

見いだした。これらのmiRNAの12症例での分散を検討したところ(図2)、分散の大きいmiRNA(図2左端)と分散の小さいmiRNA(図2右端)が見いだされた。この分散の小さいmiRNAのうち、発現量の大きいhas-miR-1246は血中miRNAの中でhouse-keeping geneの様に標準化するために有用なmiRNAとなる可能性がある。

一方、第三年度である本年度は、3歳児および臍帯血から採血後に血漿を分離し、miRNAのプロファイルをAgilent miRNA version 21(miR Base Rel.21.0準拠、ヒトmiRNA 2549種類を搭載)を用いて検討した。その結果、11症例を対象として、全ての検体で検出限界以上であるmiRNAを203種類同定した。

このうち、9歳児でも同定できたmiRNAは161種であった。また、発現量のばらつきが最も少ないmiRNAは

has-miR-1246ではなく、こうしたhouse-keeping geneの様に標準化するために有用なmiRNAは年齢ごとに異なる可能性が強く示唆された。

さらに解析を継続し、各年齢別の正常値を作ると共に、年齢に依存して変動するmiRNAや性差を認めるmiRNAを同定する予定である。

②in vitroで血管内皮細胞やリンパ管内皮細胞を培養して上清中に放出されるmiRNAの検討

ヒト正常肺由来血管内皮細胞(HMVEC)を所定の培養液にmiRNAを含まないウシ胎児血清を添加した条件下で80% confluentとなるまでin vitroで培養し、細胞および培養上清を回収した。細胞および培養上清からmiRNAを含むtotal RNAをmiRNAeasyキットで抽出し、miRNA量をAgilent bioanalyzer miRNAキットを

用いて定量した。また、一部の検体では、10 ng/mL の TNF- α の存在下で 24 時間培養し、TNF- α の影響を検討した。その結果、Exosome 中に含まれる miRNA は Total miRNA の約 3-5% であること、TNF- α 刺激によって、上清中の Total miRNA は約 2 倍に増加することを見いだした。

③ 血漿中の miRNA の抽出方法の最適化と、マイクロアレイ解析の SOP 作成

血漿中の exosome fraction を超遠心により分離することに成功した。3 つの異なるキッ

ト (miRNeasy Serum/Plasma kit (QIAGEN)、mirVana miRNA Isolation kit (Life Technologies)、miRCURY RNA Isolation kit -Cell & Plant (EQICON)) を用いて exosome fraction からの miRNA の抽出を行い、Agilent Bioanalyzer (Small RNA Kit) で small RNA 分画の Quality check を行い、マイクロアレイ解析に適した抽出方法と、マイクロアレイのプラットフォームを検討した。その結果、miRNeasy Serum/Plasma kit を用いた抽出方法が最も適していること、マイクロアレイは Agilent の SurePrint Human miRNA Microarrays を用いた網羅的な解析が最も適していること を明らかにした。一方、全血漿分画から抽出された miRNA と上記 exosome fraction から抽出された miRNA を網羅的に測定して比較したところ、両者は相関が低く、plasma と exosome では明らかに異なる種類の miRNA が検出されることが明らかとなった。このことは miRNA が何らかの選択性をもって exosome 分画へ放出されることを意味している。

さらに、exosome にはその由来する細胞の表面抗原が発現していることから、抗体付着ビーズを用いた濃縮によって、特異的な細胞の情報を血中 exosome から得る方法 (Liquid biopsy) が昨年暮れから立て続けに一流誌に掲載され、注目されている。本研究においてもその予備検討を行う予定である。

④ in vitro で血管内皮細胞やリンパ管内皮細胞から放出される miRNA の検討 (初年度~5 年度)

ヒト血管内皮細胞を miRNA を含まない血清存在下に培養し、TNF- α 刺激後の

細胞および上清中の miRNA を回収し、その量を測定した。その結果、血管内皮細胞内の mRNA の約 1% が miRNA であること、上清中には刺激なし約 1 ng、刺激あり約 2 ng の miRNA が放出され、そのうち、約 3-5% が exosome 中に含まれることが明らかとなった。今後は各種刺激下での miRNA 産生動態を検討すると同時に、疾患病態を mimic した環境での miRNA 産生について検討を行う予定である。

4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究の内容は倫理委員会に申請後、臨床研究に関する倫理指針を遵守して実施する。特に、臨床検体の採取にあたっては、両親に対し十分な同意説明を行う。

本研究の実施については「小児期の血漿中 miRNA プロファイルのバイオマーカーとしての有用性を検討するためのデータベース作成 (受付番号 940)」として平成 27 年 6 月 29 日付にて承認を受けている。