

(別紙1)

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いく。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。

第四年度である本年度は、これまでに収集したコホートおよび臍帯血から抽出した RNA 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り、かつ全年齢を通じて共通して発現する miR (分散が小さい) を見いだした。一方、成長に伴い変動する miRNA は同定できず、また各年齢ごとに男女で有意に発現が異なる miRNA も同定出来なかった。

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いく。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える。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)

②成長に伴い変動するmiRNAが見いだされた場合には、その変動機序についての検索を行う。(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)

⑦in 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
研究所免疫アレルギー・感染研究部

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試料収集体制を整

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例を収集した。

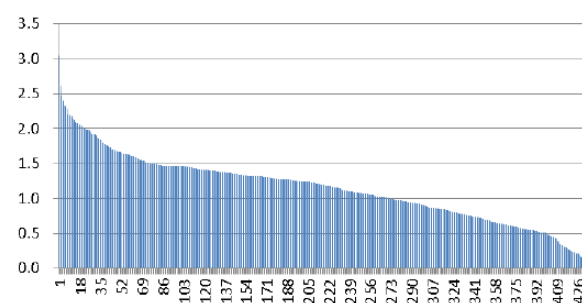
第三年度と第四年度には成育母子コホート研究の3歳児のEDTA検体、および臍帯血EDTA検体を収集した(図1)。

図1 収集した検体の詳細

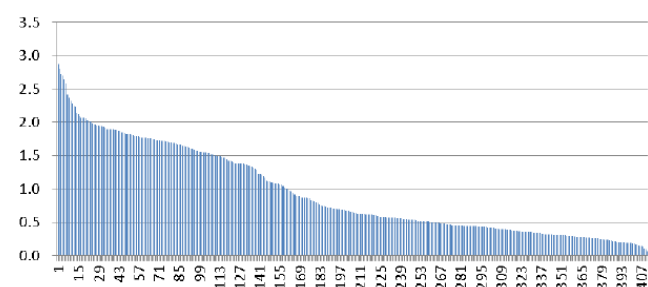
	検体提供元	検体数	Microarrayに使用した検体数
0歳	産科(臍帯血)	29	16(男8女8)
3歳	母子コホート	11	11(男4女7)
9歳	成育コホート	35	13(男6女7)
13歳	成育コホート	39	10(男5女5)
食物アレルギー罹患児	アレルギー科	40	23(男12女11)

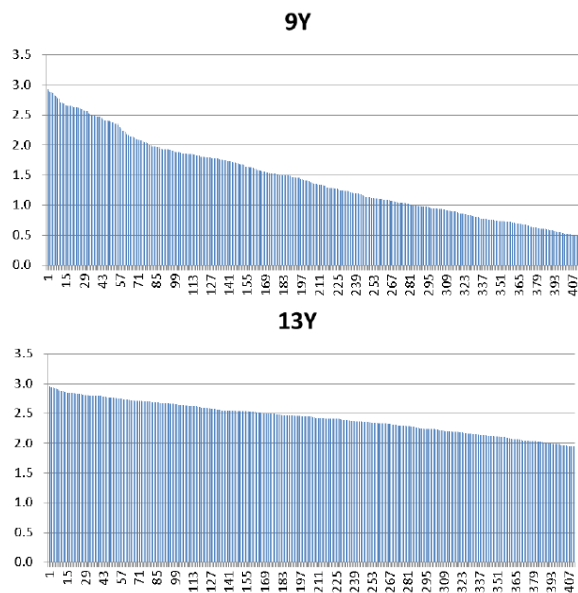
収集した検体をAgilent miRNA version 21(miR Base Rel.21.0 準拠、ヒトmiRNA 2549種類を搭載)を用いて、miRNAの網羅的な発現解析を行った。その結果、血漿から検出されたmiRNAの種類(各年齢すべての検体で検出されたmiRNA/各年齢で検出されたmiRNA)は、0歳115/439 entities、3歳211/476 entities、9歳203/789 entities、13歳162/411 entitiesであった。それらの分散を検討したところ、以下の図のようになった(縦軸は分散、横軸は検出された個々のmiRNA)。

図2 各年齢層でのmiRNAの発現の分散
0Y



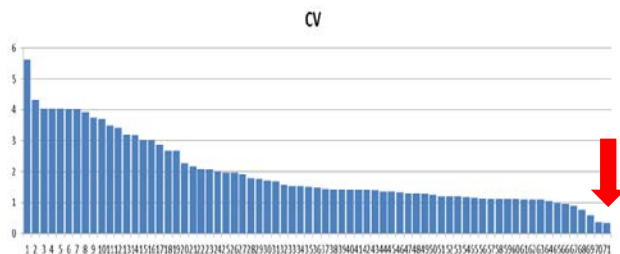
3Y





これらをまとめて、全年齢層を通して発現が検出され、バラツキ（分散）の少ない miRNA は Has-miR-4665-3p であった（図 3 矢印）。このことから、今後は miR-4665-3p を house keeping miRNA として使える可能性が示唆された。

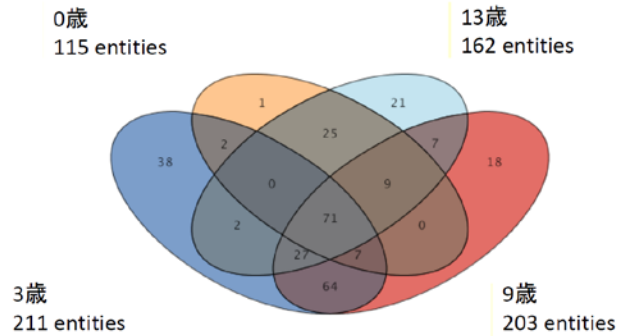
図 3 最も分散の小さい miRNA の同定



②成長に伴い変動する miRNA の検索（初年度～2 年度）

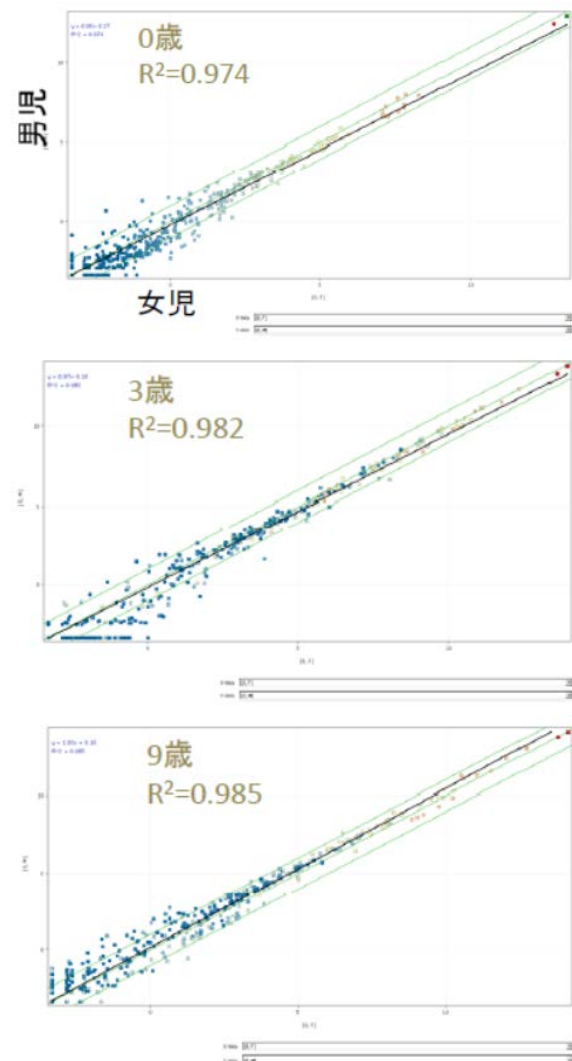
各年齢層で発現する miRNA の相互関係を右図に示す。各年齢層でのみ発現し、他の年齢層には発現しない miRNA は 0 歳 1 entities、3 歳 38 entities、9 歳 18 entities、13 歳 21 entities であった。また、全年齢層で共通に発現する miRNA 71 種のうち、分散の大きい（年齢ごとに発現が異なる）miRNA も散見されたが、年齢よりも個体差が大きく、成長に伴い変動する miRNA は同定できなかった（図 4）。

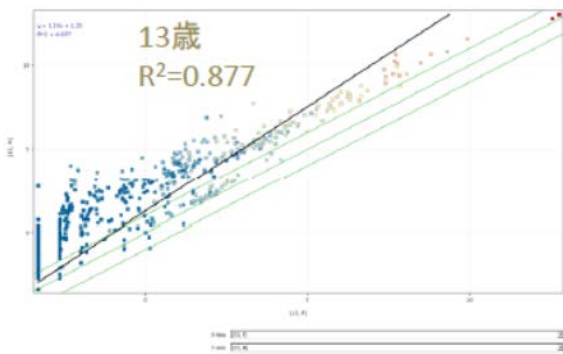
図 4 年齢特異的な miRNA の同定



また、各年齢ごとの性差を検討するため、男女間で発現の異なる miRNA を検索した（図 5）。その結果、0 歳、3 歳および 9 歳では性差が認められる miRNA は無かった。一方、13 歳では男女差が大きい傾向がみられるが、各年齢とも、男女で有意差（FC 2.0

図 5 各年齢ごとの性差





$p < 0.05$)のある miRNA は認められなかった。このことは、血漿中の miRNA の再生の主要なソースである血管内皮細胞や血球細胞には性差が少なく、そのため正常値の設定においては男女を考慮することは必須では無いと考えられた。

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。

④in 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。

⑤臨床検体 (心疾患、腎疾患) は現在収集中であり、最終年度である来年度に一括して解析予定。

⑥食物アレルギー児の血漿中の miRNA の解析は、日本ハム食の未来財団「平成 29 年度公募型研究助成事業」(2017 年) の援助を得て行われた。

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。