

「エクソソームの循環型機能性短鎖 RNA を指標にした血清バイオプシー」

神戸薬科大学薬学部

棚橋 俊仁

## 1 研究の背景と目的

肝線維化は、肝発癌と密接な関係があり、線維化が進行した肝硬変での発癌は、年 8% に上昇する。そのため、肝線維化の早期診断は、肝細胞癌の早期発見へとつながり重要である。線維化診断は、肝生検による侵襲的な組織学的診断が標準であるが、低侵襲的な生体試料による診断技術の開発が望まれている。血清エクソソームには、マイクロ RNA を代表とする機能性短鎖 RNA が含まれ、体内を循環しながら幅広く生体反応に関与する。肝線維化の安全かつ簡便な早期診断の実現のため、血清エクソソームに含まれるあらゆる機能性短鎖 RNA を、高速シーケンサーで限界なく同定し、人に優しい Exosome-RNA-Seq 診断技術を創出する。

申請者らは、低侵襲性に簡便かつ再現性高く、肝疾患を診断する技術を開発してきた。とくに、マイクロ RNA の発現変化は、慢性肝炎から肝細胞癌に至る肝疾患の病態に広く関係し、新しい診断マーカーとして有用であることを見出した (PLoS ONE 2012, BMC Cancer 2013)。さらにごく最近、細胞から分泌される膜小胞であるエクソソームに、マイクロ RNA を代表とする核酸が梱包され血液中を循環し、ドナー細胞からレシピエント細胞へ移動することが報告され、新たな細胞間伝達機構の存在が示されている。

## 2 研究方法・研究内容

過去の多くの研究では、全血清から RNA を抽出し、マイクロ RNA の発現が解析されてきた。しかし、エクソソーム分画のマイクロ RNA は、より各種疾患の病態を反映していることが示唆されている。そのため、全血清と血清エクソソーム分画でのマイクロ RNA の発現を比較解析した (PLoS One 2012)。

同一被検者より 2 回採血を行い、それぞれ全血清と血清エクソソーム分画から total RNA を抽出し、アレイ技術 (アジレント社) で、904 種類のマイクロ RNA の発現を解析した。その結果、検体間の相関係数は、エクソソーム分画の発現で最も高く、強い再現性を示した。

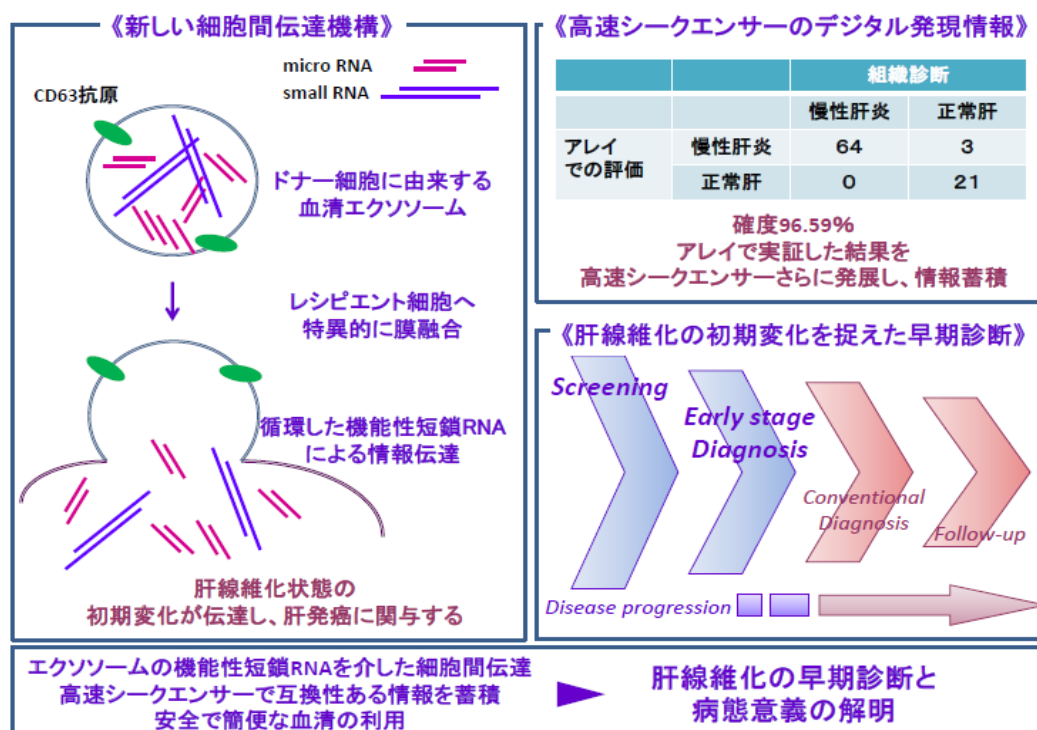
エクソソーム分画の精製は、従来は超遠心法を必要とする煩雑な方法であったが、簡便に精製し得るエクソクイックを用いた。エクソソーム膜表面には、CD63 抗原が豊富に表出しているため、CD63 抗原認識抗体を用いたウエスタンブロット法で、エクソクイックによる分画と、従来の超遠心法による分画を比較検討した。その結果、エクソクイック分画 (EQ+) は、対象分画 (EQ-) と比べ、CD63 抗原の発現が強く、エクソソーム分画が特異的に濃縮されていることを明らかとした。

以上より、ヒト血清エクソソーム分画の効率的な抽出方法と、再現性のある循環型マイクロ RNA の発現解析方法を確立している。この成果を発展させ、高速シーケンサーによる技術的に限界が存在しない発現解析を実施し、低侵襲的な血清バイオプシーによる診断技術の創出を目指す。

本研究課題では以下の項目を実施する。

1. 血清エクソソーム分画に存在するあらゆる機能性短鎖 RNA を、高速シーケンサー機器で限界なく同定し、各検体あたり 500 万リード以上の配列情報を得る。
2. 機能性短鎖 RNA の発現情報をデジタル検出し、正常と肝線維化を 80%以上の精度で判別する機能性短鎖 RNA の数と種類を同定し、互換性のある Exosome-RNA-Seq 診断技術確立する。

診断技術に寄与する機能性短鎖 RNA の種類と数およびその特異的な塩基配列は、確保すべき知的財産権と捉える。現在までに特許調査を実施したが、本案件を進める上で障害となる先行特許は、認めない。本研究課題に関する基本特許は、研究協力者により出願済みである。研究を進める中で、製法特許や用途特許を適時出願する。



### 3 研究成果

エクソソームの解析に先立ち、まずは肝組織中のマイクロ RNA を次世代型シーケンサーで検出可能であるか検討した。肝線維化を合併した肝癌組織 14 例と、年齢と性別を一致させた正常肝組織 6 例を対象に、イルミナ社 MiSeq を用いて、50-bp シングルリードでのマイクロ RNA ディープシーケンセスを実施した。14 例のうち 11 例では、アレイ技術（アジレント社）を用いて、904 種類のマイクロ RNA の発現解析を実施している。

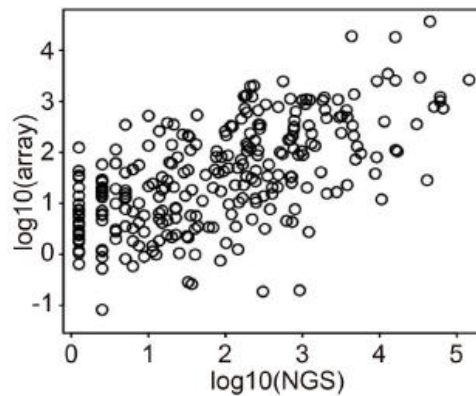
マイクロ RNA ディープシーケンセスで、各サンプルには少なくとも 220 万以上のシーケンシングリードが得られ、ヒトゲノムには約 57%がマッピング可能であった。同一サンプル間でのディープシーケンセスとアレイとの相関係数は、0.613 であり、旧来のアレイ技術と比較し、ディープシーケンセスによる発現解析は、遜色がないと考えられた。さらに、

同一サンプルを3回ディープシーケンスし、各データ間の相関係数を求めると、0.9861と示され、極めて高い技術的反復値を呈した。

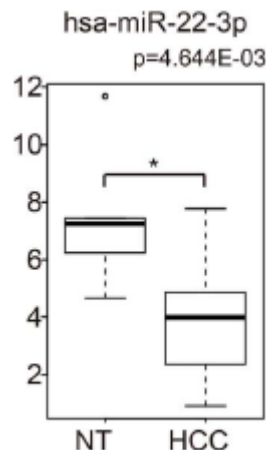
肝癌組織14例と正常肝組織6例で、マイクロRNA発現を比較解析すると、miR-10a-5p、miR-122-5p、miR-22-3pが統計学的有意差 ( $p < 0.05$ ) を示し発現変動した。これらマイクロRNAの発現変動に基づくPCA解析により、肝癌組織と正常肝組織の分離能は、 $P < 0.0007$ と示されている。

次いで、マイクロRNAディープシーケンスの特色を生かし、未だデータベースに登録されていない新規マイクロRNA配列の検出を試みた。4種類の配列(miR-9985、miR-1843、miR-548bc、miR-9986)が新規マイクロRNAとして発見された。

今回の我々の検討で(PLoS One 2014)、マイクロRNAディープシーケンスは、非常に再現性が高く、旧来のアレイ技術の結果とも良く相関し、新規配列を有するマイクロRNAの発見も可能であった。さらに、マイクロRNAの発現変動に基づく、肝癌組織と正常肝組織の診断も十分可能であった。現在、同一症例での血清中エクソソームに含有されるマイクロRNAディープシーケンスを実施しており、今回の肝組織でのマイクロRNA発現結果と比較検討を実施する予定である。



**Figure 1. Comparison between logarithmic HCC miRNA expression in NGS (horizontal axis) and microarray (vertical) analysis (K-177\_1 means the first technical replicates of code No. K-177). One black circle showed one miRNA. Pearson's correlation coefficient is 0.6059.**  
doi:10.1371/journal.pone.0106314.g001





**Figure 5. Comparison of novel miRNA candidates ((a) hsa-mir-9985, (b) hsa-mir-1843, (c) hsa-mir-548bc and (d) hsa-mir-9986) with known miRNAs and transcripts. (e) hsa-mir-6715a novel miRNA was not included in miRBase release 18, but was present in later releases. Nucleotides highlighted in red show hairpin constructs. F, g, h, i and j are constructs of each miRNA and respectively correspond to a, b, c, d, and e. doi:10.1371/journal.pone.0106314.g005**

#### 4 生活や産業への貢献および波及効果

マイクロRNAは、2,038種類発見されているが、肝疾患では、肝組織で豊富に発現しているmiR-122に、ほぼ解析が限られている。高速シーケンサーにより、血清エクソソームに含まれる2,038種類以上の分泌循環型マイクロRNAの発現を解析し、成熟型および未成熟型に加え、あらゆる機能性短鎖RNAをも含め、互換性あるデータを取得し、情報蓄積を実施する。高速シーケンサーを用いた技術的に限界が存在しない発現解析であるExosome-RNA-Seq診断技術を確立し、先行技術との差別化を目指す。

現存する診断技術では、血清を用いて肝組織の線維化を評価することは不可能であり、組織採取を伴う肝生検が必須である。しかし、肝生検は患者さんに与える侵襲性が強く、反復した実施は困難である。治療効果を判断するための複数回のモニタリングにも適さない。高齢者においては、肝組織の採取に常に危険性が伴う。

安全で簡便な生検技術“血清バイオプシー”に立脚したExosome-RNA-Seq診断技術は、より低侵襲性に肝線維化を診断し得る。専門医による診断が不要で、癌予備群の受診者へ検診などで広く利用することも可能であり、汎用化の実現が見込める。肝線維化の早期診断技術の開発で、肝疾患の患者さんに対して、より早く専門治療を施すことも可能となる。結果的に治療効果と予後の改善へとつながり、医療費の有効活用へも貢献し得る。兵庫県内で類似の研究内容は存在しない。