九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

The Influence of Pre-analytical Factors on the Analysis of Circulating MicroRNA

塩津, 弘倫

https://hdl.handle.net/2324/2236070

出版情報：九州大学, 2018, 博士（保健学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（2）

氏　　名：　塩津　弘倫

論 文 名：The Influence of Pre-analytical Factors on the Analysis of Circulating miRNA
（循環 miRNA の解析に解析前因子が及ぼす影響の検討）

区　　分：甲

論　文　内　容　の　要　旨

MicroRNA(miRNA)は遺伝子発現を抑制的に制御する低分子 RNA であり、次世代のバイオマーカーとしての応用が期待される。その臨床解析は世界的に盛んであるが、同一疾患を対象としても報告者によって結果が一致しないケースが散見される。その要因として、疾患研究の対照群となる健常人での miRNA プロファイルや生理的変動など生体側の基礎的知見、Normalizer の選択や測定手順、阻害物質などの技術的な知見が不足していることが挙げられる。本検討では循環 miRNA 解析の標準化の一環として、健常者を対象とし解析前段階での変動要因に焦点をあて検討を実施した。

対象は非喫煙者の健常ボランティアとし、早朝空腹時に採血を行った。健常ボランティアには全てインフォームドコンセントを行った後に採血を実施した。全血から血清および血漿を分離し、miRNA を抽出した後に、RT-qPCR を用いて解析した。血球分離時の遠心条件の違いによる変化を除外するため、血清、血漿の遠心条件は共に 3000G、10 分の血漿準備用の条件に統一して血球分離を行った。miRNA 解析の対象は miR-16、451、126、223 とし、相対定量のコントロールとして抽出時に線虫由来の cel-miR-39 を 1fmol 添加して解析を実施した。

まず血球分離直後の血漿、血清内 miRNA の発現量の比較を行った。miR-16、126、223 は血清よりも血漿内にて高値であった。一方、miR-451 は血漿よりも血清内で有意に高値を示した。

次に血球分離後の血清、血漿に 10000G、1min の追加遠心を行い、得られた上清内の miRNA 解析を行った。先の検討では血漿内で高値を示していた miR-16、126、223 の miRNA 値は低下し、血清内とほぼ同程度の値を示した。先の検討にて唯一血清内で高値を示した miR-451 は、血漿内で有意に高値を示した。

次の検討では血清準備用の採血管に含まれる凝固促進剤(Coagulation Accerelator、CA)が miRNA 解析に与える影響について検討を行った。同一被検者由来の全血から得た、血清、血漿に加え、血清準備用の採血管で室温、30 分インキュベートした血漿の 3 サンプルを準備し、同時に miRNA を抽出し、解析を実施した。解析の結果、対象に設定した 4 種の miRNA と、人工的に添加した cel-miR-39 の全てにおいて、CA の有無による結果への影響は確認できなかった。

さらに、miRNA 値算出時にコントロールとして用いる miRNA(Normalizer)の違いが解析結果に与える影響について、Normalizer を cel-miR-39 とサンプル由来の miR-16 にてそれぞれ解析を行った。はじめに各サンプルに添加した cel-miR-39 の Ct 値を確認したところ、血清と血漿間で有意な差は認めなかった。次に cel-miR-39、miR-16 のそれぞれで補正を行い比較したところ、各 miRNA 値の大小関係に大きな変化はなく、血清と血漿間においても有意差を示さなかった。

先の検討において、血漿内 miR-451 は血球分離直後には低値を示し、高速遠心後では高値を示すといった他の miRNA とは異なる変化を示した。この現象を検証するために、２つの検証実験を行った。第１の検証では異なる小孔サイズをもった膜フィルタを用いて血漿内から小胞体を除去し、血漿内 miR-451 の解析を行った。0.45μm 以上の膜フィルタを使用した場合、血漿内 miR-451 は有意に高い値を示し、0.2μm 以下のフィルタを使用した場合、血漿内 miR-451 の値は大幅に低下した。第 2 の検証では、A)フィルタにて処理した分画と B)未処理分画、C)処理分画と未処理分画を等量混合した分画の 3 検体を作成し、miRNA を抽出して解析を行った。C)混合分画から得られた miRNA 値は、A)フィルタ処理分画に比べて大幅に低く、B)未処理分画とほぼ同程度の値を示した。

最後に血中に存在する RNase による miRNA 分解を阻害する目的で RNase 阻害剤(RNase Inhibitor、RI)を添加し、解析結果に与える影響を検討した。採血直後の全血に 300U の RI を添加し、0、1、2 時間インキュベーションののちに miRNA 抽出を行った。放置時間が 0、1 時間において、RI を添加した検体は未添加の検体よりも高い miRNA 値を示した。また、RI 添加から 2 時間が経過すると、cel-miR-39、miR-451 を除いた 3 種の血漿内 miRNA 値は RI 添加したものに関しても減少を認めた。

以下では、得られた結果の考察を示す。まず血球分離直後の血漿内で miR-16、126、223 は高値を示したが、高速遠心ののちに減少した。遠心条件から推察すると、血漿内には血小板由来マイクロパーティクルやアポトーシス小体などの細胞由来のデブリの混入が考えられた。次に血清準備用の採血管内に添加されている CA は、miRNA 解析に影響しないと考えられた。RI をサンプル内に添加した場合、0～1 時間においては血漿内 miRNA の減少を防ぐことができた。しかしながら 2 時間後には miRNA 値の減少を認め、RI を添加しても時間経過によって miRNA の分解が起きると考えられた。一方、miR-451 が 2 時間放置後に減少しなかった要因として、目に見えない程度の溶血の影響が考えられた。

Normalizer をサンプル外から人工的に添加した場合と、サンプル由来の miRNA を選択した場合の比較に関して、今回測定した４種の miRNA に関して明らかな差は認められなかった。しかし、今回サンプル由来のコントロールとして選択した miR-16 は、他の miRNA よりも血中に豊富に存在していることが知られている。本研究においても miR-16 にて補正を行った場合は、補正した miRNA 値は小さくなることを確認した。そのため Normalizer を検体内に豊富に含まれる miRNA とした場合には、微細な変化をマスキングしてしまう可能性を示唆した。

今回の検討にて安定した解析を行うには、血小板由来の miRNA 成分を除去するため追加遠心は必須であること、核酸抽出時の抽出効率の違いやサンプル固有の影響などの条件を除去するため

適切な濃度の外部コントロールが推奨されること、膜フィルタを用いることで赤血球成分の影響を除去できること、RNase 阻害剤を使用することで安定した miRNA 解析が可能となることが明らかとなった。