

長寿医療研究開発費 2020年度 総括研究報告

血中マイクロ RNA 情報を用いたがんと認知症のバイオマーカー解析と エクソソームの疾患特性に関する研究 (20-10)

主任研究者 新飯田 俊平

国立長寿医療研究センター MGC (センター長)

研究要旨

我々は先行研究(「体液中マイクロ RNA 測定技術基盤開発」AMED, 2014~18)において、血液中を循環する microRNA (以下 miRNA) を標的とした、がん、認知症の血液バイオマーカー探索を実施。多くの優れた miRNA マーカーを同定し、報告してきた。この先行プロジェクトでは 20,000 例に及ぶバイオバンク登録者の血清 miRNA プロファイル情報が取得され、蓄積されている。本研究では、①先行研究で取得したデータの未解析分を用いた認知症とがんのスクリーニングマーカーの探索、②血中エクソソームの疾患特性に関する研究、③miRNA の eQTL データベース構築が実施された。

主任研究者

新飯田 俊平 国立長寿医療研究センター MGC (センター長)

分担研究者

浅海 裕也 国立長寿医療研究センター MGC・臨床ゲノム解析推進部 (研究員)

尾崎 浩一 国立長寿医療研究センター MGC・臨床ゲノム解析推進部 (部長)

落谷 孝広 東京医大・医学総合研究所/国立がん研究センター (教授/客員研究員)

吉岡 祐亮 東京医大・医学総合研究所 講師 (特任)

A. 研究目的

研究1：認知症とがんのスクリーニングマーカーの同定

認知症領域においては基礎疾患となる病気によって病気の進行や治療戦略も違ってくることなどから、認知症を層別化するバイオマーカーが必要とされている。また、まだ有効な治療薬がないため、創薬研究や治験に資する患者層別化も重要な課題となっている。一方、がんにおいてはこれまでも多くのがんマーカー研究が行われてきたが、臨床実装されている早期スクリーニングマーカーはほとんどなく、また一度の血液検査で複数のがんを同

時に判別する方法はまだ存在しない。本研究では、先行研究で取得した血清 miRNA プロファイル情報を解析し、認知症の層別化ならびにがんの早期発見に寄与するバイオマーカーを探索する。

研究2：エクソソーム研究

血中の miRNA の多くは、エクソソームという細胞外小胞にパッケージングされ、一定期間体内を循環していると考えられている。このエクソソームを捕捉し、格納されている miRNA の種類と量を測定することで、がんや認知症の新たな疾患マーカーの探索につながる。その基盤研究として、本研究では、そのエクソソームを血液中から抽出するまでの過程と純度などを検証し、がんや認知症の診断におけるハイスループットな解析ツールを確立する。認知症においては、患者血液中のエクソソームにアミロイドベータ 40/42 が存在し、新たなバイオマーカーとなりうる基礎データを持っていることから、最終的にはエクソソームを用いた認知症の総合的な診断方法のツールとなることを期待している。

研究3:miRNA の eQTL データベース構築

近年、遺伝子上の SNP 情報と遺伝子発現情報を統合した量的形質解析 (expression-Quantitative Trait Loci : 以下 eQTL) の有用性が示されている。NCGG バイオバンクには、先行研究で取得した miRNA データと同一人物の全ゲノムジェノタイピングデータを保有している。そこで両者を統合した miRNA の eQTL データベースを構築する。

B. 研究方法

研究1：認知症とがんのスクリーニングマーカーの同定

認知症の病型を判別する miRNA バイオマーカー探索を実施した。アルツハイマー病 (AD)、血管性認知症 (VaD)、レビー小体型認知症 (DLB)、正常圧水頭症 (NPH) などの認知症タイプの鑑別診断に寄与するマーカー同定を目指し、1,348 名の認知症患者 (AD、VaD、DLB、NPH) と 246 名の認知機能正常高齢者の血清 miRNA マイクロアレイデータを用いて解析を行った。認知症タイプの予測には、L1、L2 の正則化を用いたロジスティック回帰に基づく多クラス分類モデルを適用した。初めに、学習群データにおけるクロスバリデーションにより最適な miRNA 数 n と最適な正則化パラメータ α を決定した。ついで、全学習群データを用いて最終モデルを構築した。

研究2：エクソソーム研究

認知症およびがんの患者血液中のエクソソームを簡便な方法で、捕捉回収する技術の候補として、AGC 社の開発中のガラス多孔質のフィルターを用いたスピнкаラム (以下、AGC カラムと称する) を検討する。検体は、市販のヒト血清を購入し用いる (全てインフォーム

ドコンセントが取れた検体で、市販品である)。方法としては、まず健康成人の血清を10検体用意し、AGC カラムによって細胞外小胞(EV) (この場合、エクソソームと称される small EV) を精製するプロセスの決定の条件を、アプライする血清量、遠心速度、PBS(-)での洗浄工程を含め、検討した。精製されたエクソソームは、CD9, CD63 などの汎マーカーで検証した。

研究3：miRNA の eQTL データベース構築

NCGG バイオバンクが保有する miRNA データと同一人物の genotyping データを統合し、eQTL データベースの構築を開始。同時に、データベースを活用するためのプログラム、インターフェイス等の作成を行う (図1)。

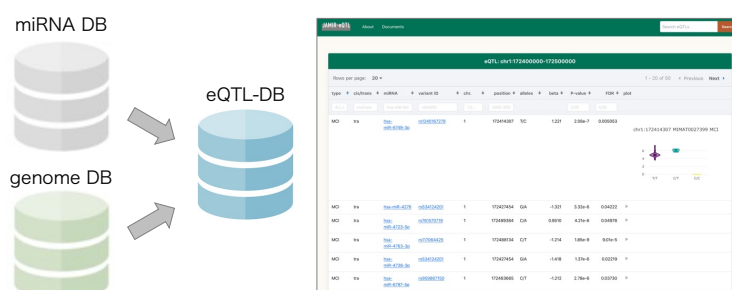


図1 eQTL DB (JAMIR-eQTL) の公開用インターフェイス

(倫理面への配慮)

バイオバンクの管理する試料と情報を用いる研究は、倫理委員会の承認を前提とし、厚生労働省の倫理規定 (「臨床研究に関する倫理指針 (H20 年度改定版)」及び「疫学研究に関する倫理指針 (H20 年度改定版)」) を遵守する。本研究では、全て購入した血清試料 (インフォームドコンセントが取れた市販品) を使うため、倫理的な問題は生じない。

C. 研究結果

研究1：認知症とがんのスクリーニングマーカーの同定

モデルの判別性能を検証群データで評価した結果、7割程度の正解率で認知症病型を判別した。さらに、モデル構築の際、学習群データ内の認知症病型間のサンプル数に偏りがあると、比較的少ないサンプル数で学習した病型の判別正解率が低くなる点を考慮した。その結果、病型間で判別性能の偏りを抑えた判別モデルを得た。このモデルに使用した miRNA がターゲットとする遺伝子群についてネットワーク解析を行った結果、AD の判別モデルに使用された miRNA の標的遺伝子群において、AD 発症との関連が報告されている *SRC* 遺伝子、*CHD3* 遺伝子がネットワークの主要なハブ遺伝子として見出された (図2)。これは、本モデルにおいて認知症判別に適切な miRNA が用いられていることを示唆している。

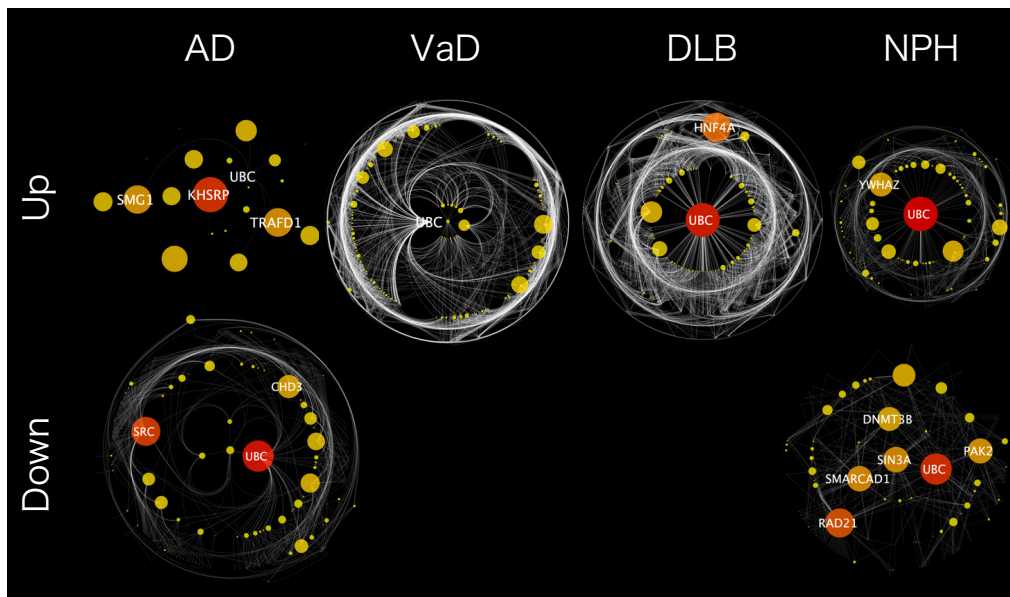


図2 モデルに使用した miRNA がターゲットとする遺伝子群についての PPI ネットワーク解析

がんのバイオマーカー探索では、注目した miRNA の血中量を肺がん、胃がん、前立腺がん、健常人でそれぞれ比較したところ、各がん患者血清において血中濃度が上昇していた。つまり、新規のバイオマーカーとなりうる可能性があり、またこの miRNA は特定のがん種で上昇するのではなく、多くのがん種で上昇する可能性を示すデータがある。

研究2：エクソソーム研究

AGC カラムを用いた血液中エクソソームの捕捉に関する基礎データが得られた。まず血清量は 350ul、これをエッペンドルフチューブに装填されたカラム内に添加、6,00g にて 5min 遠心後、300ul の PBS(-)で同様に遠心、洗浄する。その後、このフィルターに捕捉されたエクソソームを回収し、CD9, CD63 のタンパク質定量を行なった。その結果、超遠心による従来の操作と同等のエクソソームが簡便な操作で回収されていると判断できた。またこのエクソソーム回収後に、RNA を回収し、miRNA を解析した結果、435 種類の miRNA を同定可能であり、その数は、超遠心法でのエクソソーム回収の場合の 354 種類よりも多いことがわかった。

研究3：miRNA の eQTL DB 構築

本研究で構築したデータベースを Japanese miRNA-eQTL Database (JAMIR-eQTL、URL: <https://www.jamir-eqtl.org/jamir/>) として公開した。

D. 考察と結論

研究1：認知症とがんのスクリーニングマーカーの同定

認知症病型の判別において、血清 miRNA プロファイル情報に基づく多クラス分類モデルが有効であることが示唆された。ただし、本研究で得られたモデルの性能は臨床へ適用するには不十分であり、より大規模なサンプルサイズを用いることで予測精度を向上する必要がある。現在、本研究の成果は論文投稿中（under review）である。

研究2：エクソソーム研究

多孔質のガラスフィルターを用いることで、短時間かつ簡便にエクソソームを血液から回収することができることが明らかとなった。この手法によるエクソソームの回収効率やマイクロ RNA の検出は、従来の超遠心法と比較しても優位であり、ハイスループット性が求められる診断現場では重要なシステムを提供するものと考えられた。

研究3：miRNA の eQTL DB 構築

本研究で構築した miRNA-eQTL データベースは、単に miRNA 研究のみならず、ヒトの生理的、病的分子ネットワーク解析の研究などに利活用できる新たな研究ツールとなる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 重水 大智, 新飯田俊平: 血中マイクロ RNA の現状 (2021). Geriat Med, 59(2): 163-167.

2. 学会発表

- 1) 「体液マイクロ RNA 診断によるがんの早期発見」 Expert Forum in Nephrology and Urology. web (2020.8.26 東京)
- 2) 「リキッドバイオプシーの現状と課題」 東北がんネットワーク総会 web (2020.9.5 仙台)
- 3) 「血中エクソソームによる早期および再発膀胱がんのバイオマーカー開発」 第 79 回 日本癌学会学術総会 (2020.10.1-3 広島)
- 4) 「リキッドバイオプシーによる早期診断」 BioJapan2020 主催者セミナー (2020.10.16)

東京)

- 5) 「血中エクソソームを標的とした膵臓がんの早期診断 および再発バイオマーカーの開発」第7回日本細胞外小胞学会 web (2020.10.27 東京)
- 6) 「Role of Extracellular Vesicles in Cancer: Possible Diagnostic and Therapeutic Applications.」 Japan Association for Animal Cell Technology 2020 web (2020.11.18 東京)
- 7) 「リキッドバイオプシーによる未病社会の実現」日本化学会第101春季年会 web (2021.3.22)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし