

血中マイクロ RNA 情報を用いた認知症とがんのバイオマーカー探索研究 (21-22)

主任研究者 新飯田俊平 国立長寿医療研究センター研究所 (所長)

研究要旨

本研究では、疾患群と非疾患群の血液 microRNA (以下 miRNA) プロファイリングデータ (miRNome データ) を用いて、①認知症の層別化バイオマーカーの同定、② miRNome データと同一被験者のジェノタイピングデータを統合した expression-Quantitative Trait Loci (eQTL) データベース構築、ならびに③ miRNA マーカーの実用性向上に向け、miRNA の主要運搬装置エクソソームの分離ハイスループット化について研究開発を行なった。その結果、①46 種類の miRNA を用いる判別マーカーの同定、② miRNA-eQTL データベース構築と公開、③多孔質ガラスフィルターを用いた効率的エクソソーム分離法の確立、が成果として得られた。

主任研究者

新飯田 俊平 国立長寿医療研究センター 研究所 (所長)

分担研究者

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 (特任講師)

浅海 裕也 国立長寿医療研究センター研究所 メディカルゲノムセンター (研究員)

A. 研究目的

① 認知症の層別化に役立つバイオマーカーセットの探索

認知症の臨床、創薬研究においては、症候の基礎疾患を判別するバイオマーカーの必要性が指摘されている。本研究では、先行研究*で解析され、バイオバンクに保存されている血清 miRNome データを活用して、認知症の層別化や早期発見に資するバイオマーカーの探索・同定を目的とした。なお本研究では、先行研究で取得したがんの miRNome データを用いたがんマーカーについて検討予定であったが、すでに同定済みとなったため目標から除外した。(* 先行研究 = 「体液中マイクロ RNA 測定技術基盤開発」2014~18, NEDO/AMED)

② microRNA の eQTL DB 構築

近年、SNP 情報が関連する遺伝子発現情報を検索する量的形質解析 (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、miRNome データと同一人物の SNP ジェノタイピングデータが登録されている。そこでまだ世界に類を見ない miRNA 発現に焦点を当てた eQTL データベースの構築を目指した。

③ 効率的に血中エクソソームを分離する方法の開発

血液 miRNA を疾患バイオマーカーとして実用化するには、同定作業で実施してきたような miRNA 回収法では効率が悪い。本研究では、血清からの miRNA 抽出の迅速性、効率性向上に資する回収方法の研究開発を目的とした。こうした問題は疾患バイオマーカーの実用化を検討する際の共通する課題である。

B. 研究方法

① 認知症の層別化に役立つバイオマーカーセットの探索

本研究で用いた血清 miRNome データは NCGG バイオバンクのデータベースからダウンロードした。対象とした認知症例は、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) の 4 病型とした。データ数は、疾患群 4 病型合計で 1,348 例。対照群とした認知機能正常者は 246 例であった。データ解析はメディカルゲノムセンターのスーパーコンピューターを用いた。

病型予測には、前年度と同じ 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。まず、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。次に、全学習群データを用いて数理モデルの構築を行なった。

② miRNA の eQTL データベース構築

eQTL データベースに格納するデータ群はバイオバンク管理のデータベースからダウンロードした。miRNome データと SNP ジェノタイピングデータの統合解析、データベース構築はメディカルゲノムセンターにて行った。構築した eQTL データベースは同センター内のサーバーに格納し、テスト運用を行った。公開用のデータサーバーは外部のクラウドサーバー事業者へ委託した。eQTL データベースが表示する統合データ解析については研究開発課題 21-24 (主任 重水大智) で実施され、最終的に両者を合体させる形での構築となった。

③ 効率的に血中エクソソームを分離する方法の開発

血液バイオマーカーとなる miRNA はエクソソーム内に包埋されている。miRNA を効率よく回収するためには、まず血清検体から効率よくエクソソームを回収することが必要である。本研究開発においては、従来の超遠心による方法と、エクソソーム回収用が開発され

た多孔質ガラスフィルターシステム、AGC カラムを用いた方法を用い、どちらが効率よくかつ簡便に処理できるか検討を行った。材料は健常人の血清を用いた。出発材料は、血清 500 マイクロリットルとし、それぞれのエクソソーム回収操作後に、一般的な試薬で miRNA を精製し、その回収率を比較した。また、バイオアナライザーを用い、純度が高品質であるかどうか、検討を行った。さらに、両者を NGS 法にて比較して、得られる miRNA の種類の総数の比較を行った。

(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（審査は新指針適用前に実施された）。本研究で使用する全てのデータは研究倫理承認された先行研究において実施され、二次利用可能なバイオバンク保存されたものである。また課題③で試験された血清は市販されているもので、研究倫理的な問題はない。

C. 研究結果

① 認知症の層別化に役立つバイオマーカーセットの探索

学習群データ内の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の学習となり、病型の判別正解率が低くなる傾向にある。この点を考慮した上で、全学習群データでのモデル構築を行なった。その結果、前年と同じ 46 種の miRNAs が抽出された。このことから前年度に構築したモデルの再現性が確認された。したがって、これらを用いることで病型間で生じる判別性能の偏りを抑えたモデルを得ることができた（図 1）。



図 1. 46 種の miRNA マーカーによる認知症病型判別モデル

前年度、これらの miRNA についてターゲット遺伝子群の protein-protein ネットワーク解析を行い、ネットワークのハブ遺伝子として *SRC* 遺伝子、*CHD3* 遺伝子を検出している（AD 発症との関連が報告されている）。当該年度は、ターゲット遺伝子が関わる生物学的な機能やイベントを調べるための GSE Analysis（遺伝子セットエンリッチメント解析）を実施した。その結果、VaD 症例で強発現する miRNA のターゲット遺伝子として Ras シグナル伝達経路（hsa04014）が同定された（表 1）。Ras の発現は、ヒト AD 脳における Aβ 産生と関連するとの報告がある。また、AD と DLB で発現が上昇した miRNA のターゲッ

ト遺伝子として統計学的に有意な 4 つの遺伝子オントロジー (GO) タームが同定された。以上の成果は論文にまとめ、*Scientific Reports* 誌に発表した。

表1 miRNA の標的遺伝子を用いた遺伝子セットエンリッチメント解析

遺伝子セット	認知症病型	パスウェイ / GO ターム	p 値	FDR [†] 補正 p 値
KEGG パスウェイ	VaD	Ras signaling pathway (KEGG: hsa04014)	2.6×10 ⁻⁵	0.0083
		Nucleobase-containing compound transport (GO:0015931)	3.5×10 ⁻⁵	0.029
遺伝子 オントロジー (GO)	AD	RNA export from nucleus (GO:0006405)	1.1×10 ⁻⁴	0.046
		DLB	Homophilic cell adhesion (GO:0007156)	6.5×10 ⁻⁸
		Cell-cell adhesion (GO:0098609)	1.6×10 ⁻⁶	6.6×10 ⁻⁴

† FDR: false discovery rate

② miRNA の eQTL データベース構築

構築した miRNA の eQTL データベースには、SNP ごとに血中で検出される miRNA の発現量が検索でき、関連性の程度を示す FDR 値が提示されるビューアを搭載させた。これら機能は認知症の病型検索にも応用できる点において前例がないシステムとなった。この統合データベースには「JAMIR-eQTL」という名称を付し、Web 上に公開した (図2)。内外の研究者が利用できるようにした。すでに海外からのアクセスも確認されている。JAMIR-eQTL データベースの内容については論文にまとめ *DATABASE* 誌 (Oxford Academic Journals) に発表した。

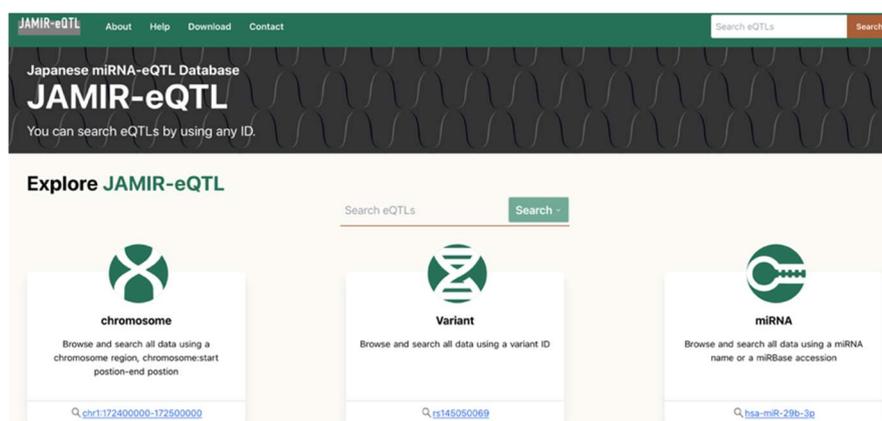


図2. 一般公開している血中 miRNA の eQTL データベース (トップページ画面)

(URL: <https://www.jamir-eqtl.org/jamir/>)

③ 血中エクソソーム分離の効率化に関する研究開発

血中 miRNA の主要運搬体であるエクソソームは、多孔質のガラスフィルター (AGC カ

ラム) を装填したエッペンドルフチューブを用いることで、回収効果が向上することが確認された。前年度からの継続研究であるが、AGC カラムを装填したエッペンドルフチューブに血清 (350 μ l) を注入し、6,00g にて 5min 遠心後、300ul の PBS(-) で同様に遠心、洗浄する方法を考案した。効果検証として、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結果、従来の超遠心法と同等のエクソソームが回収されていた。さらに、エクソソーム回収後に total RNA を回収し、miRNA を解析した結果、435 種類の miRNA が同定された。その数は、従来の超遠心法によるエクソソーム回収の場合 (354 種) より 20% 以上効率が良いことが示された。

D. 考察と結論

① 認知症の層別化に役立つバイオマーカーセットの探索

認知症の病型判別において、血清 miRNA プロファイル情報に基づく多クラス分類モデルは有効に機能することが示唆された。また、本モデルに用いた miRNA は、GSE Analysis の結果から医生物学的にも認知症と関連があることが示唆され、バイオマーカーとしての意義付けに寄与すると考えられた。しかしながら、本モデルの性能は臨床現場に適用するにはまだ不十分である。解析した認知症例は、AD 以外登録数がまだまだ少ない。今後より大規模なサンプルサイズを用いた解析を実施することで予測精度が向上する可能性がある。

② miRNA の eQTL データベース構築

本データベースは、血中の網羅的な miRNA 発現に焦点を当てた eQTL データベースであり、調べた限りでは Web 公開されたものは見当たらない。このデータベースは、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にも応用可能な新たな研究ツールであり、今後徐々にアクセス数が増えると期待している。なお、本データベースは異なる研究開発課題 21-24 (主任 重水大智) と連携して構築するという研究体制で行われた。データを扱う研究に特異的かもしれないが、今後のイン・ハウス研究の活性化の前例になることを期待している。

③ 効率的に血中エクソソームを分離する方法の開発

AGC カラムを用いる手法によるエクソソーム回収効率とその後の miRNA の検出は、従来法と比較して短時間かつ簡便で、実用性において優位であった。検査のハイスループット性が求められる診断現場では本法は重要なシステムとして活用可能と考えられた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kadota T, Fujita Y, Araya J, Watanabe N, Fujimoto S, Kawamoto H, Minagawa S, Hara H, Ohtsuka T, Yamamoto Y, Kuwano K, Ochiya T. Human bronchial epithelial cell-derived extracellular vesicle therapy for pulmonary fibrosis via inhibition of TGF- β -WNT crosstalk. *J Extracell Vesicles* 10(10):e12124, 2021 doi: 10.1002/jev2.12124
- 2) Abe S, Matsuzaki J, Sudo K, Oda I, Katai H, Kato K, Takizawa S, Sakamoto H, Takeshita F, Niida S, Saito Y, Ochiya T. A novel combination of serum microRNAs for the detection of early gastric cancer. *Gastric Cancer* 24(4):835-843, 2021.
- 3) Asanomi Y, Shigemizu D, Akiyama S, Sakurai T, Ozaki K, Ochiya T, Niida S. Dementia subtype prediction models constructed by penalized regression methods for multiclass classification using serum microRNA expression data. *Sci Rep* 11:20947, 2021.
- 4) Akiyama S, Higaki S, Ochiya T, Ozaki K, Niida S, Shigemizu D. JAMIR-eQTL: Japanese genome-wide identification of microRNA expression quantitative trait loci across dementia types. *Database (Oxford)* 2021:baab072, 2021.
- 5) Torii C, Maishi N, Kawamoto T, Morimoto M, Akiyama K, Yoshioka Y, Minami T, Tsumita T, Alam MT, Ochiya T, Hida Y, Hida K. miRNA-1246 in extracellular vesicles secreted from metastatic tumor induces drug resistance in tumor endothelial cells. *Sci Rep* 11(1):13502, 2021.
- 6) Fujita Y, Hoshina T, Matsuzaki J, Yoshioka Y, Kadota T, Hosaka Y, Fujimoto S, Kawamoto H, Watanabe N, Sawaki K, Sakamoto Y, Miyajima M, Lee K, Nakaharai K, Horino T, Nakagawa R, Araya J, Miyato M, Yoshida M, Kuwano K, Ochiya T. Early prediction of COVID-19 severity using extracellular vesicle COPB2. *J Extracell Vesicles* 10(8):e12092, 2021.
- 7) Prieto-Vila M, Yoshioka Y, Ochiya T. Biological functions driven by mRNAs carried by extracellular vesicles in cancer. *Front Cell Dev Biol* 9:620498, 2021.

2. 学会発表

- 1) 落谷孝広：リキッドバイオプシー. 第107回日本消化器病学会総会、国内 Web、口頭 (2021/4/18)
- 2) 落谷孝広：エクソソームの診断と治療. 第85回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、国内 Web、口頭 (2021/5/22)

- 3) 落谷孝広:エクソソーム, 日本消化器病学会第2回再生医療セミナー、国内 Web、口頭 (2021/7/1)
- 4) 吉岡祐亮:エクソソームを標的としたリキッドバイオプシーと新規治療戦略の開発. 第15回日本臨床ストレス応答学会、大阪(ハイブリッド)、口頭(2021/11/19)
- 5) 落谷孝広:マイクロ RNA を用いた次世代型がん検診. 第62回日本肺癌学会学術集会、国内 Web、口頭 (2021/11/26)
- 6) 落谷孝広:細胞外小胞を介した機能性 RNA による生体の恒常性維持と破綻. 第44回日本分子生物学会年会、国内 Web、口頭 (2021/12/3)
- 7) 落谷孝広:エクソソームによる生活習慣病の診断と治療. 第55回成人病(生活習慣病)学会、東京、口頭 (2022/1/16)

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