

血清中のmiRNA単離からqRT-PCRまでの ハイスループット解析ワークフロー

がん研究およびバイオマーカー探索のためのアプリケーション

概要

バイオマーカーを用いたがんの検出は、非常に貴重な臨床研究ツールとなっています。前立腺生検に関連する合併症や罹患率の減少に役立つ、感度と特異性の高い予測因子となるバイオマーカーが早急に必要とされていますが、これには血液中を循環しているmicroRNA (miRNA) がソリューションとなる可能性があります。こうした将来的なゴールを念頭に置き (1) Thermo Scientific™ KingFisher™ シリーズに対応したApplied Biosystems™ MagMAX™ *mirVana*™ Total RNA Isolation Kitを用いた、血清中のトータルRNAの抽出、(2) Applied Biosystems™ TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis KitおよびApplied Biosystems™ TaqMan™ Advanced miRNA Assaysを用いたqRT-PCRによるmiRNAプロファイルのダウストリーム解析を実行するワークフローを開発しました。そこでこのワークフローの有効性を、前立腺がん血清サンプルに由来するmiRNAパネルで、対照群の正常サンプルと比較して解析した結果をご紹介します。血清やその他の体液にも適用できる迅速かつ簡便なこのワークフローを用いることで、疾患特異的なRNAシグネチャーを特定し、バイオマーカーとして利用することができるようになります。

はじめに

理想的なバイオマーカーは、低侵襲性の手法で容易に測定できるものでありながら高い感度と特異性を有するものでなければなりません。数多くのバイオマーカー候補が研究され、論文として提案されていますが、こうしたニーズを満たし、臨床での利用に転換されたものは極めてわずかです。実際のところ、ある種のがんやその他の疾患に関しては、信頼できるバイオマーカーの選択肢が存在していません。このことは、より詳細なバイオマーカー研究や、より大規模なサンプル処理能力に対応した手法の必要性が高まっていることを如実に表しています。

前立腺がんの診断数は、バイオマーカーの1つである前立腺特異抗原 (PSA) の使用によって劇的に増加し、2014年には23万件以上の新症例が発生しました¹。これは感度の高い検査ではあるものの、PSA検査に基づいて前立腺の生検を受けた患者のうち、実際にこの病気が見つかる人は4分の1未満です。より感度の高い特異的なバイオマーカーの同定は、臨床研究および将来の潜在的な臨床的有用性において非常に有益であると考えられます。

循環RNA、特に血清miRNAは、検出感度が高いバイオマーカーとして将来このような空白を埋める可能性があります。より長い分子 (mRNA、lncRNA) と比較して、miRNAは (1) miRNAの数が少ない (2,500以下) ため解析がしやすい、(2) サイズが短い (約16~27 nt) ために安定であり検出が確実である、といった長所があるため、数多くの血清miRNAが前立腺がんの有望なバイオマーカーである可能性が文献にて報告されています²⁻⁴。ここでは、血清などの臨床研究用サンプルを感度および再現性の高い方法で処理してmiRNAバイオマーカーをスクリーニングすることのできる、ハイスループットのワークフローについて説明します。

材料と方法

RNAの単離

前立腺がん患者および健康な個人から得られた100 µLの血清 (それぞれ2サンプルずつ) から、MagMAX *mirVana* Total RNA Isolation KitおよびKingFisherシリーズを用いてトータルRNA (miRNAを含む) を単離しました。

miRNAターゲットの解析

抽出された2 μ LのトータルRNAをTaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis kitを用いてcDNAを作製しました。その後、各3サンプルずつでqPCRを実施しました。qPCRは希釈した2 μ LのcDNA、TaqMan Advanced miRNA Assays、およびApplied Biosystems™ TaqMan™ Fast Advanced Master Mixを使用し、ファーストサイクルで実施しました。

mRNAターゲットの解析

10 μ LのトータルRNAとApplied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kitを用いてcDNAを作製しました。その後、各3サンプルずつでqPCRを実施しました。qPCRには2 μ LのcDNA、リファレンスのmRNAに特異的なApplied Biosystems™ TaqMan™ Assay、およびTaqMan Fast Advanced Master Mixを使用し、Fastサイクルで実施しました。

結果

臨床研究用サンプル、特に血清を処理し、さらにqRT-PCR法を用いてmiRNAバイオマーカーを同定することができる、ハイスループットなワークフローの開発に成功しました。この単離法(図1、左)では、有機溶媒を用いない、磁気ビーズベースの精製を行うことでサンプルの迅速処理を可能にし、さらにKingFisherシリーズであれば一度に最大96サンプルを処理できます。回収したRNAをqRT-PCRで解析する場合、TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis KitにおいてユニバーサルなRTプライマーをベースとしたシステムを使用してワークフローを簡素化するとともに、カバーする範囲に柔軟性を持たせています(図1、右)。プリアンプ(miR-Amp)ステップが含まれていることでユニバーサルな増幅が可能となり、低コピー数のターゲットに対する感度が向上します。

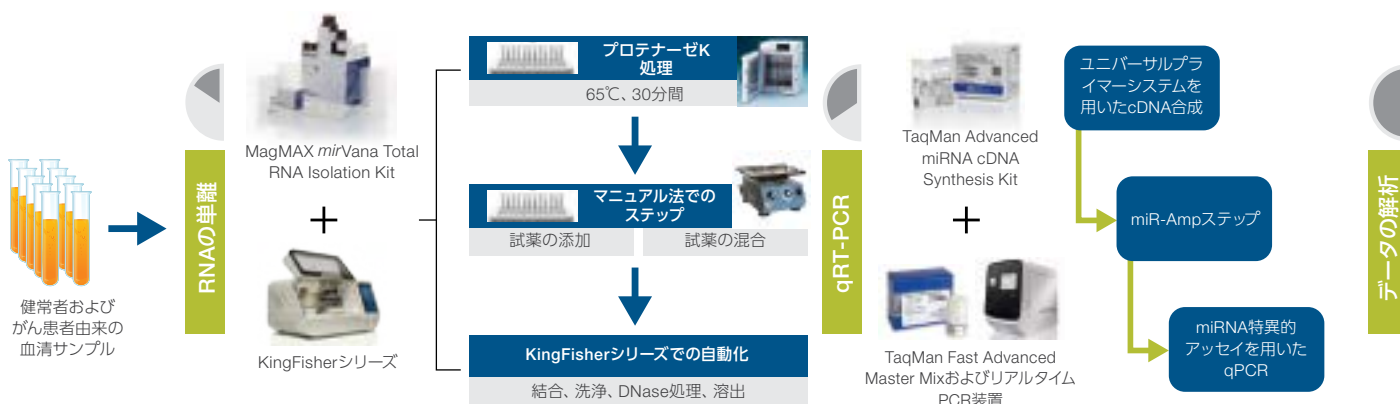


図1. 血清からのRNAの単離およびmiRNAのqRT-PCR解析のためのハイスループットのワークフロー

このRNAの単離法は磁気ビーズベースのケミストリーによってサンプルを迅速に処理できるだけでなく、有機溶媒による抽出ステップを省略できます。TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis KitおよびTaqMan Advanced miRNA Assaysはワークフローを簡素化し、カバーする範囲に柔軟性を持たせます。miR-Ampステップによりユニバーサルな増幅が可能となり、低コピー数のターゲットに対する感度が向上します。

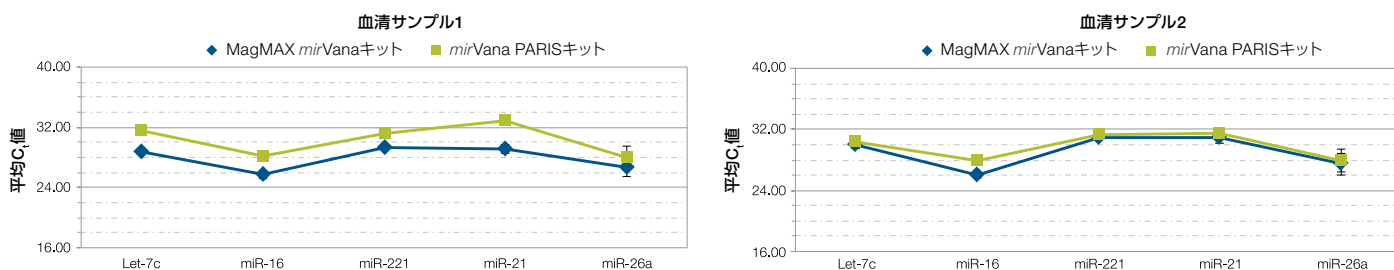


図2. MagMAX mirVanaキットは広く用いられているmirVana PARISキットよりも優れたパフォーマンスとハイスループットを実現

健康者2名の血清からRNAを単離し、5種類のmiRNAの濃度をqRT-PCRで測定しました。MagMAX mirVanaキットで単離したRNAを用いた場合、各ターゲットについてより高い感度が認められました。

磁気ビーズベースのMagMAX mirVana Total RNA Isolation Kitは、RNA精製ステップに関して優れたパフォーマンスとハイスループットを実現します。図2は、MagMAX mirVanaキットとInvitrogen™ Ambion™ mirVana™ PARIS™ Kitの性能を比較したものです。後者はフィルターベースで有機溶媒抽出法を採用しており、血清からのトータルRNA (miRNAを含む) の単離に広く用いられています。この実験では健常者2名の血清からRNAを単離し、さらにTaqMan Advanced miRNA Assaysを用いたqRT-PCRで5種類のmiRNAの発現量を測定しました。

MagMAX mirVanaキットは、臨床研究に不可欠な優れたパフォーマンスとハイスループットを有することを実証しています。

TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis KitおよびTaqMan Advanced miRNA Assaysは、血清その他の体液から単離されたmiRNAのダウンストリームqRT-PCR解析において優れたパフォーマンスと感度を示します。図3は、合成テンプレートを用いてインプットの範囲を60~6,000万コピーとした場合の増幅プロットと、6 logの範囲で線形のダイナミックレンジを示す標準曲線を示しています。テンプレートなしの反応においてバックグラウンドシグナルは観察されませんでした。

上述のワークフローを用いて前立腺がんの血中miRNAバイオマーカーの同定を行いました。前立腺がん血清サンプル10例 (PSA値は5~100 ng/mL) および健常サンプル10例からトータルRNAを単離しました。

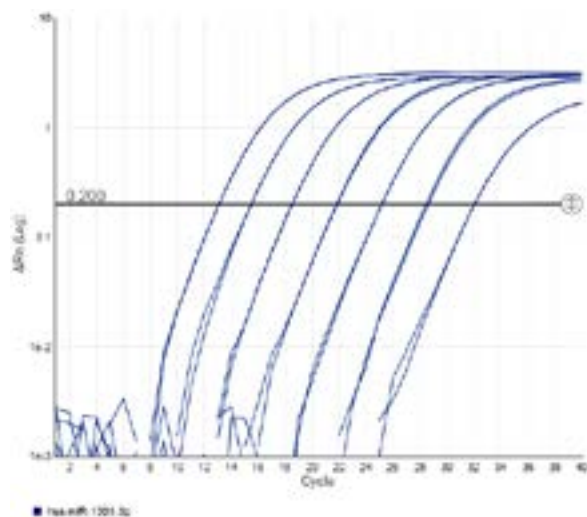


図3. ダイナミックレンジと感度

増幅プロットおよび標準曲線は、60~6,000万コピーのターゲットに対して6 logの範囲で線形のダイナミックレンジを示します。

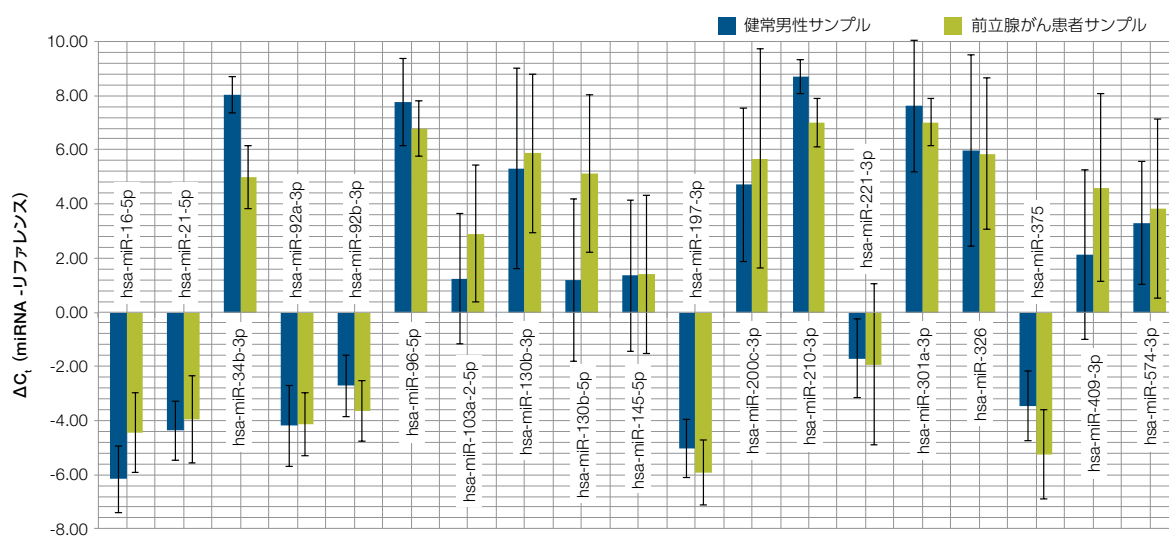


図4. 前立腺がんmiRNAバイオマーカー候補の同定

MagMax mirVana Total RNA Isolation Kitを用いて、前立腺がん患者10名および健常者10名の血清からトータルRNAを単離しました。TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis KitおよびTaqMan Advanced miRNA Assaysを用いて、19種のmiRNAの発現レベルをqRT-PCRによって測定しました。y軸は各miRNAの ΔC_t 値 (リファレンスmRNAに対して正規化) を示しています。

文献²⁻⁴および過去の社内研究によって、前立腺がん血清バイオマーカーの候補として19種類のmiRNAパネルを選定しました。この19種のmiRNAの濃度を両試験群の血清由来RNAにおいて測定しました(図4)。hsamiR-210-3p ($P<0.0001$)、hsamiR-34b-3p ($P<0.0001$)、hsamiR-375 ($P=0.0277$) の3種のmiRNAが前立腺がん患者の血清において有意に高濃度で存在しました。これらのmiRNAは発現に差が認められるバイオマーカーのセットであり、前立腺がんの臨床研究に有用である可能性があります。

ここに示した試験では、各miRNAの ΔC_t 値の正規化にリファレンスmRNAを使用しています。しかし、血清やその他の体液からのmiRNA qRT-PCRデータの正規化には、外標準(スパイクインコントロール)を用いる正規化方法が広く受け入れられつつあります。別の試験では、血清サンプルにスパイクインコントロールとして cel-miR-54を使用した場合についても実証しました(図5)。

結論

血液サンプルからの循環miRNAの回収と解析を目的とした試薬・ツール式を用いたワークフローを開発しました。このワークフローには、血清中のトータルRNAのハイスループットな単離、およびmiRNAの高感度で再現性の高いqRT-PCRによるダウンストリーム解析が含まれます。このワークフローを用いて19種のmiRNAをスクリーニングし、前立腺がんの血清バイオマーカーの候補を同定しました。健常群のサンプルと比較して、前立腺がんサンプルでは3種のmiRNAの発現レベルが有意に高くなっていました。この結果は、血清サンプルにおける新規miRNAバイオマーカーの検討に際し、このワークフローが使用可能であることを示しています。適切なTaqManアッセイを使用することで、このワークフローを拡張し、がん研究において他のRNAバイオマーカー候補の解析にも応用できると考えられます。

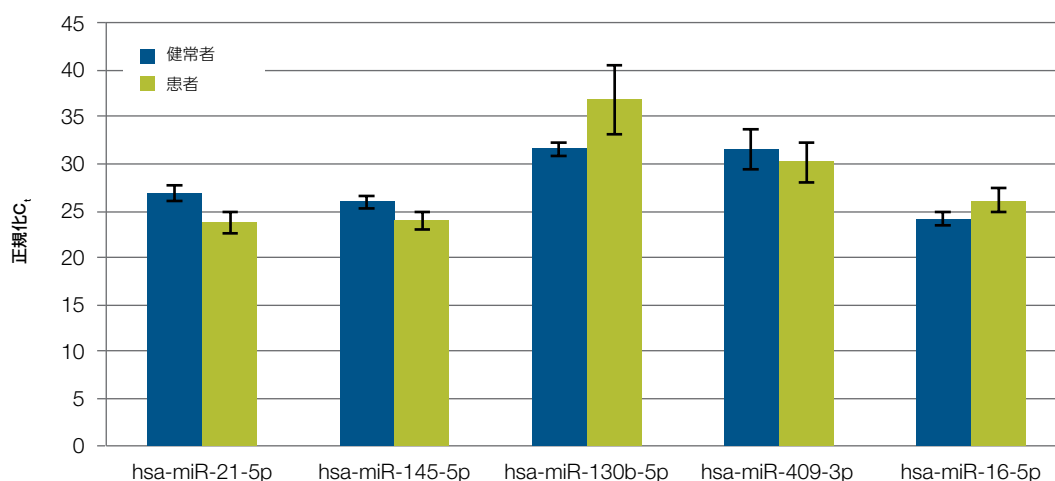


図5. 血清由来miRNAに関する信頼性の高い正規化ツールとしての合成スパイクインコントロール(外標準)

C_t 値はcel-miR-54に対して中央値で正規化しています⁵。

謝辞

本研究への貢献について、Alex J. Ra氏 (Department of Pathology and Cell Biology and Center for Advanced Laboratory Medicine at Columbia University Medical Center and New York Presbyterian Hospital) 、およびJoel DeCastro氏 (Department of Urology at Columbia University Medical Center and New York Presbyterian Hospital) に感謝の意を表します。

Ordering information

製品名	製品番号
TaqMan Advanced miRNA Assays	A25576
TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit	A28007
MagMax <i>mirVana</i> Total RNA Isolation Kit	A27828
TaqMan Fast Advanced Master Mix	4444557
KingFisher Apex 96Combiプレートヘッド ヒートブロック含む	5400920
KingFisher Flex 96DWプレートヘッド ヒートブロック含む	5400630
KingFisher Duo Prime	5400110

参考文献

1. National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. Statistics available at <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html>
2. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM et al. (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:10513–10518.
3. Bryant RJ, Pawlowski T, Catto JW et al. (2012) Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *Br J Cancer* 106:768–774.
4. Cheng HH, Mitchell PS, Kroh EM et al. (2013) Circulating microRNA profiling identifies a subset of metastatic prostate cancer patients with evidence of cancer-associated hypoxia. *PLOS ONE* 8:e69239.
5. Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M (2010) Analysis of circulating microRNA bi-omarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* 50:298–301.

詳細はこちらをご覧ください thermofisher.com/mirna

研究用にも使用できます。診断用には使用いただけません。

© 2022 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

TaqMan is a trademark of Roche Molecular Systems, Inc., used under permission and license.

実際の価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。

価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。

標準販売条件はこちらをご覧ください。 thermofisher.com/jp-tc SPA042-A22080B

販売店

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

TEL: 0120-753-670 FAX: 0120-753-671

support.jp@thermofisher.com

facebook.com/ThermoFisherJapan

@ThermoFisherJP

thermofisher.com

applied biosystems