

次世代シーケンス(NGS)に関するお役立ち情報をお届けします。

今号のポイント:「SMARTer® Stranded Total RNA-Seq Kit v2 - Pico Input Mammalian」を使うことで、微量生体液サンプルから再現性の高いtotal RNA-Seqが可能になりました。

【キーワード】 total RNA-Seq、生体液サンプル(血漿、尿)、細胞外小胞

ヒト生体液サンプルおよび細胞外小胞からのtotal RNA-Seq

■ 未だ実現されていないcell-free RNA解析の可能性

RNAプロファイリングは、ヒト生体液中におけるバイオマーカーの潜在性を調べる最も有効な手法です。リキッドバイオプシーにおいては、循環DNAの解析が最も一般的ですが、血漿や尿中の細胞外RNA、細胞外小胞(EV)からも病態に関する貴重な情報を得ることができます。しかし、生体液を用いたRNA-Seqは技術的に難しい部分があります。例えばサンプルが微量であること、ダイナミックレンジが大きいこと、そしてRNAが分解されていることなどが挙げられ、これらはすべてRNA-Seqを行う際の妨げとなります。さらに現在行われているcell-freeサンプルを用いたRNA-Seqは、「フラグメントが短い」や「検出可能な遺伝子数が少ない」、「リボソームRNAの混入」などによって制限されてしまうため、網羅的な解析を行うことが困難です。ベルギーのCenter for Medical Genetics at the Ghent University and Biogazelleのチームが行った最近の研究では、さまざまな生体液やEVを用いたRNA-Seqを行うためのstrand-specificなtotal RNAライブラリー調製キット「SMARTer® Stranded Total RNA-Seq Kit v2 - Pico Input Mammalian (Pico v2)」について評価しています。彼らは、Pico v2を用いることでヒト生体液中のRNA発現量を正確で高感度に解析できることを実証しました。



■ Pico v2の評価結果 ※データは次ページ以降を参照

ーサンプルタイプとリード分布ー

2人のドナーから、EDTA採血管を用いて多血小板血漿(ePRP)と無血小板血漿(ePFP)を調製し、RNA-Seqを行いました。ePRPのユニークリードのうち、75%以上がミトコンドリアRNA(mtRNA)にマッピングされました。一方、ePFPではmtRNAのリードの割合がePRPの1/3程度となり、マッピングリードのほとんどが核RNAでした。マッピングされなかったリード数とマルチマッピングされたリード数は、血小板の有無に関わらず同程度でしたが、エクソンリード、イントロンリード、遺伝子間リードの分布は多血小板血漿と無血小板血漿で異なることが示されました(図1)。

◆ 微量分解RNAサンプルからでもRNA-Seqが可能なライブラリー調製キット

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
SMARTer® Stranded Total RNA-Seq Kit v2 - Pico Input Mammalian	12回	634411	¥198,000



中面につづく ➡

さらに、以下のサンプルについてシーケンス解析しました。1つ目は乳がん細胞を培養した培地 (CM)、2つ目は健常ドナーからクエン酸ナトリウム採血管を用いて調製された無血小板血漿 (cPFP)、3つ目は前立腺がん患者の尿、そしてCM、cPFP、尿の各サンプルのEVです。その結果、生体液サンプルとそのEVのマッピング率は大きく異なることがわかりました。cPFP由来のEVのユニークリードの割合は7.69%に対し、培地由来のEVでは90.2%でした (図1. パネルA)。そして、ほとんどのサンプルのユニークリードは核RNAにマッピングされましたが (図1. パネルB)、無血小板血漿 (cPFP) については、25.8%がmtRNAにマッピングされました。これは前実験の健常ドナー (ePFP) の割合と同等でした。また、核RNAにマッピングされたリードのほとんどはエキソンにマッピングされましたが、cPFP EVだけはイントロンと遺伝子間領域に多くマッピングされました (図1. パネルC)。

Pico v2を用いることで、すべての生体液サンプルから70~400 bpのstrand-specificなライブラリーが得られます。血漿サンプルのピークは約90 bp、その他のサンプルのピークは180~190 bpです (血漿サンプルとそのEVは最短のフラグメントサイズを示す)。生体液 1 mlあたりの相対RNA量も算出したところ、ePFPとcPFPは、ePRPや尿、培地よりも17倍RNA量が少ないことがわかりました。また、生体液由来のEVはRNA量が著しく少なく、培地中のEVは元の培地よりも2,763倍、尿中のEVは元の尿より7.6倍もRNA量が少ないことがわかりました。クエン酸ナトリウム採血管で調製された無血小板血漿 (cPFP) の遺伝子同定数は、EDTA採血管で調製された無血小板血漿 (ePFP) よりも多い結果となり、血漿サンプルを調製する方法は細心の注意と最適化が必要であることがわかりました。

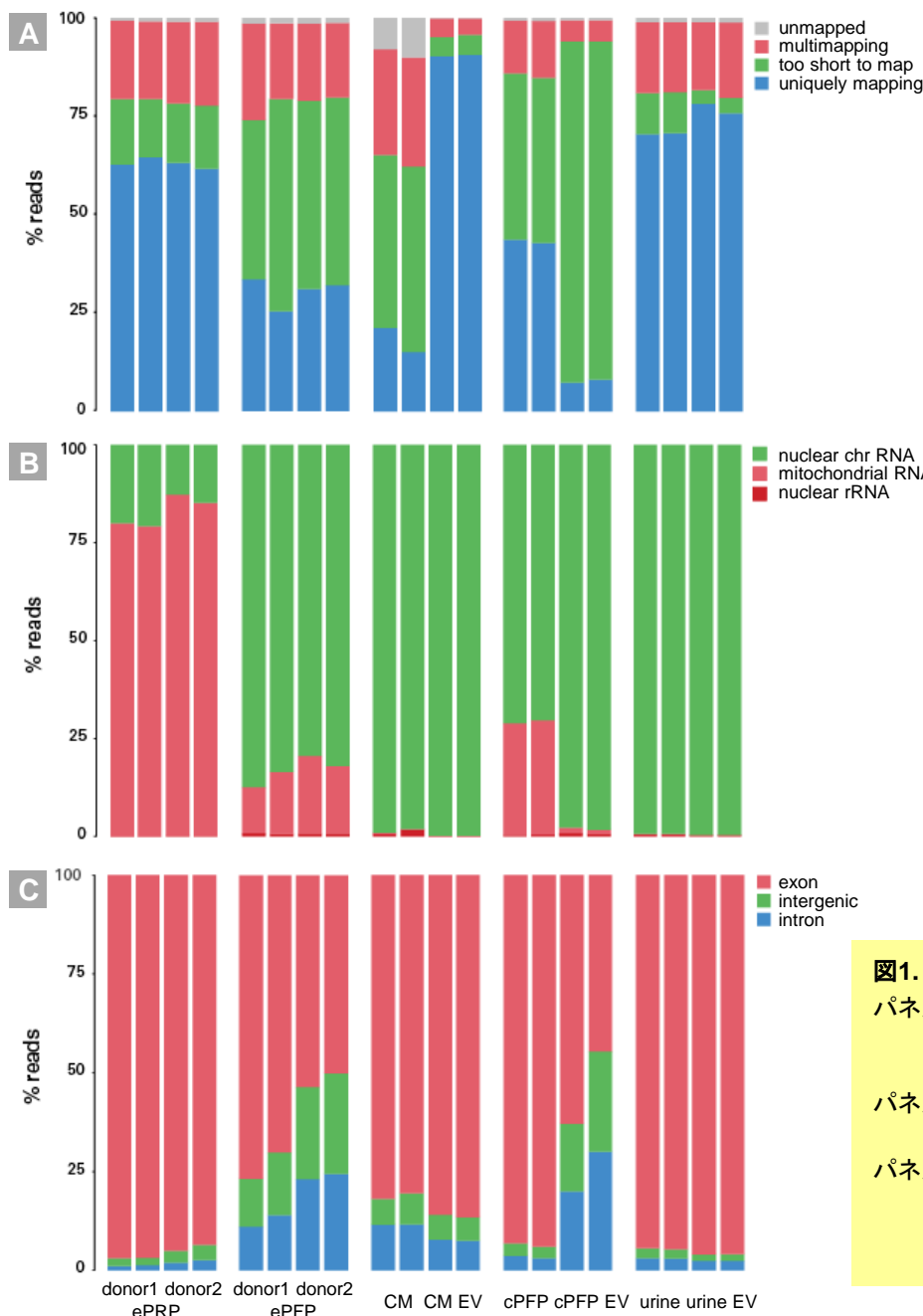


図1. サンプルごとのリード分布

パネルA. unmapped、multi-mapping、too short to map、uniquely mappingのリードの割合
 パネルB. 核RNA、ミトコンドリアRNA、リボソームRNAのリードの割合
 パネルC. 核RNAにマッピングされたリードの内、エキソン、イントロン、遺伝子間領域にマッピングされた割合

SMARTer® Stranded Total RNA-Seq v2 - Pico Input Mammalianは様々なヒト生体液やそのEVから、full-lengthのRNA-Seq用ライブラリー調製が可能です。また、このキットはRNA抽出とライブラリー調製の両方において、テクニカルレプリケートの再現性の高い結果が得られます。

—再現性—

RNA抽出時のテクニカルレプリケートしたePRPとePFPのリードカウントから散布図を作成しました。いずれの血漿サンプルにおいても、再現性の高い結果が示されました(図2)。また、レプリケートをRNA抽出時ではなくライブラリー調製時に行うと、さらに再現性が高くなることが累積分布プロットから明らかになりました。

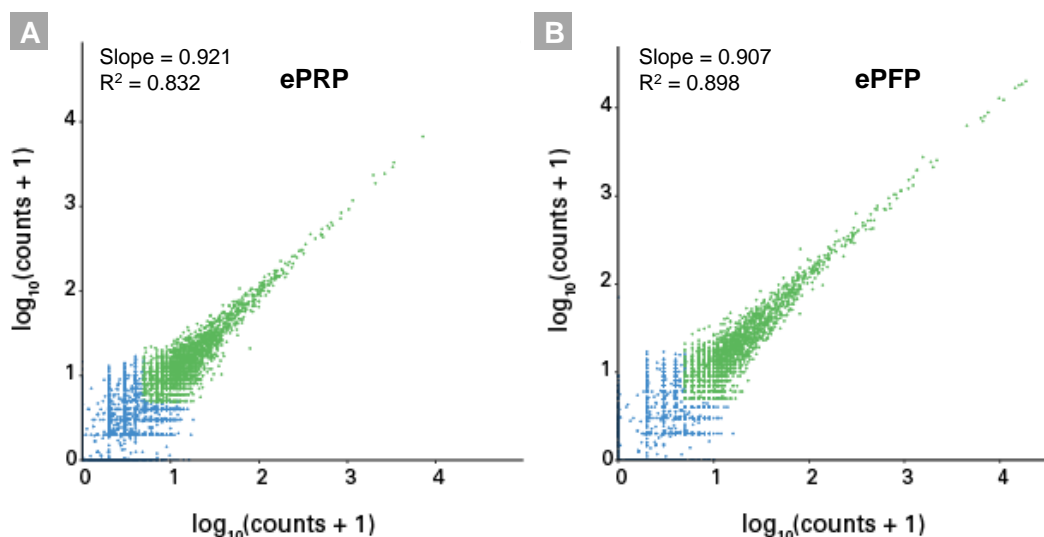


図2. ePRPとePFPの各サンプル間における遺伝子発現量の相関性

ePRP(パネルA)とePFP(パネルB)においてフィルタリングされた遺伝子($\text{counts} < 4$: 青)と保持された遺伝子($\text{counts} \geq 4$: 緑)を示す。ピアソン相関係数はそれぞれ0.912、0.948と高い相関性を示した。

検出された遺伝子を5つのタイプに分類しました(タンパク質コード遺伝子、ロングノンコーディングRNA(lncRNA)遺伝子、miscRNA遺伝子、偽遺伝子、その他の遺伝子)。検出された各遺伝子群の割合は、生体液間で異なっていました。例えば、ePRPはミトコンドリア遺伝子の割合が多いため偽遺伝子のリードを多く含んでいますが、ePFPは主にタンパク質コード遺伝子のリードの割合が多く検出されました。遺伝子タイプごとに検出遺伝子数を算出したところ、各サンプルごとに異なる遺伝子を検出できることを示しました(下記参照)。

- 約3,000ものlncRNA遺伝子が尿中のEVから検出されました。また、ePFPでは約1,500のlncRNAを検出しましたが、そのEVではlncRNAはほとんど検出されませんでした。さらに、ePFPではePRPよりも多くのlncRNAを検出しました。
- ePFPと尿中のEVは他のサンプルよりも環状RNAが非常に多く検出されました。環状RNAはリニアRNAに比べて安定的で分解されにくいと言われているため、がんのバイオマーカー探索研究に適していると考えられています。

—生体液間での検出遺伝子の違い—

発現解析の結果から、EVとその元の生体液で共通して発現している遺伝子数を示しました(図3)。尿と尿中のEVは10,000以上の遺伝子が共通して検出されましたが、cPFPとそのEVは共通して検出される遺伝子数が非常に少ない結果となりました。このように、各々の生体液内で多くのサンプル(EVあり/なし)を解析することで、細胞外小胞を介して輸送される/輸送されないRNA分子を特定することができ、新たな見識を得ることができます。

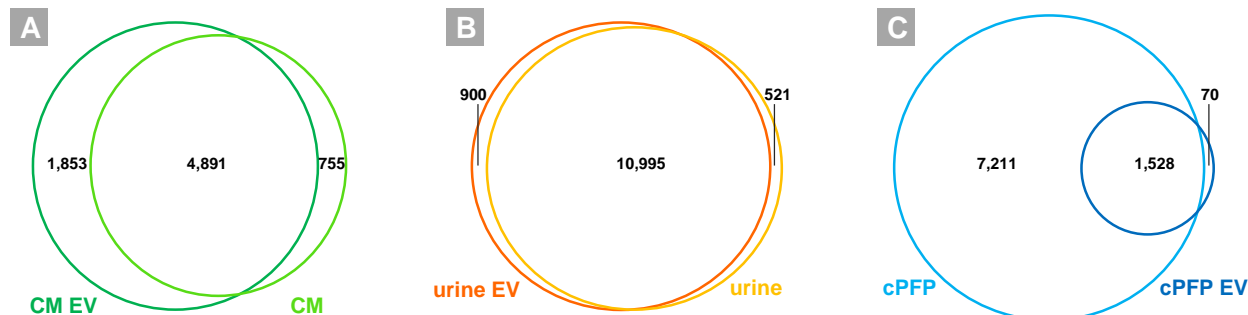


図3. 検出遺伝子のオーバーラップ 各生体液とそのEVにおけるオーバーラップ遺伝子数をベン図で示す。

- パネルA. 培地と培地中のEV
- パネルB. 尿と尿中のEV
- パネルC. cPFPとcPFP中のEV

■ まとめ

様々な生体液とそのEVに含まれる核酸は、病気の診断、予後、治療反応性、疾患モニタリングのためのバイオマーカーになり得ます。生体液サンプルのtotal RNA-Seqは転写後調節の研究に役立ち、より網羅的なトランスクリプトーム解析が可能になります。また、特定のRNAあるいはpolyA RNA以外にも、環状RNAやヒストンRNA、lncRNAなど、様々なRNAを検出することが可能です。SMARTer® Stranded Total RNA-Seq Kit v2 - Pico Input Mammalianを使用することで、微量インプットサンプルからでもRNA-Seqが可能になりました。

SMARTer® Stranded Total RNA-Seq Kit v2 - Pico Input Mammalianの利点は、微量インプットサンプルからでもライブラリーを作製できることです。実際、サンプルの採取は基礎研究、(前)臨床研究、トランスレーショナル研究においてボトルネックになることがあります。しかし、わずか200 µl (あるいはそれ以下)のサンプルから大量の情報を得ることができるようになると、それは研究の進展に大きな影響を与えることができます。

◆ 参考文献

Everaert, C. *et al.* Performance assessment of total RNA sequencing of human biofluids and extracellular vesicles. *Sci. Reps.* **9**, 17574 (2019).

・本パンフレットで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
・ライセンスなどに関する最新の情報は弊社ウェブサイトをご覧ください。
・本パンフレットに記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。
・本パンフレット記載の価格は2020年2月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

2020年2月作成G

タカラバイオ株式会社

東京支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282

関西支店 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995

テクニカルサポートライン

TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995

Website <http://www.takara-bio.co.jp>

Facebook <http://www.facebook.com/takarabio.jp>

取扱店