

Reduction of systematic bias in transcriptome data from human peripheral blood mononuclear cells for transportation and biobanking

Hideki Ohmomo¹, Tsuyoshi Hachiya^{1,2}, Yu Shiwa², Ryohei Furukawa², Kanako Ono¹, Shigeki Ito³, Yoji Ishida³, Mamoru Satoh^{1,2,4,5}, Jiro Hitomi^{6,7}, Kenji Sobue^{8,9}, Atsushi Shimizu^{1*}

大桃秀樹¹, 八谷剛史^{1,2}, 志波優², 古川亮平², 小野加奈子¹, 伊藤薫樹³, 石田陽治³, 佐藤衛^{1,2,4,5}, 人見次郎^{6,7}, 祖父江憲治^{8,9}, 清水厚志¹

¹岩手医科大学 いわて東北メディカル・メガバンク機構 生体情報解析部門

²岩手医科大学 いわて東北メディカル・メガバンク機構 メガバンク・データ管理部門

³岩手医科大学 医学部 内科学講座 血液・腫瘍内科分野

⁴岩手医科大学 いわて東北メディカル・メガバンク機構 地域連携・医療情報 ICT 部門

⁵岩手医科大学 医歯薬総合研究所 生体情報解析部門

⁶岩手医科大学 いわて東北メディカル・メガバンク機構 副機構長

⁷岩手医科大学 医学部 解剖学講座

⁸岩手医科大学 いわて東北メディカル・メガバンク機構 機構長

⁹岩手医科大学 医歯薬総合研究所 神経科学研究部門

<概要>

いわて東北メディカル・メガバンク機構では岩手県民の皆様に血液を提供いただき、大規模なバイオバンクの構築を行っています。解析研究の1つとして、収集した血液を用いて遺伝子の発現解析*1を行うことを目指しています。しかし、頂いた血液を解析するためには、洋野や久慈、大船渡、釜石などの沿岸部から内陸の矢巾町にある岩手医科大学矢巾キャンパスの研究室に輸送することが必要です。また、遺伝子の発現解析に用いるRNA*2は化学構造的に非常に不安定な物質であるため、研究室へ輸送されるまでに分解してしまうことが考えられます。そこで私達は採血してから研究室へ輸送するまでの間の遺伝子発現変化とRNAの分解を抑える方法を検討しました。

まず、血液の中にある末梢血単核球(PBMC)*3という成分を用いて採血から運搬の間のRNAの分解を防ぐ効果のある各種RNA安定化剤の有効性について調べました。岩手医科大学内で11名のボランティアの方に協力していただき、採血した血液からPBMCを分離して回収しました。市販されている6種類のRNA安定化剤をそれぞれ加えた後、超低温冷凍庫(マイナス80°C)で凍結しました。そして、解凍後、RNAの品質を調べるために、純度や収量、RIN値(RNAの分解の指標となる値)について調べました。次に、遺伝子発現の解析は、11名の中からそれぞれ無作為に7名の検体を選び、定量リアルタイムPCR解析(qRT-PCR)およびRNAシーケンシング解析(RNA-Seq)という2つの方法を用いました。

RNAの品質を調べた結果、RNA安定化剤を加えなかった群(非添加群)において、RIN値の大幅な低下が認められました。これはPBMCを凍結や解凍したことによってRNAが分解してしまったことが示唆されます。また、qRT-PCRの結果から、RNA安定化剤添加

群と比較して非添加群において遺伝子発現の変動が大きいことが確認されました。さらに、RNA-Seqの結果から、非添加群において約40%の転写産物で発現変動が起こっていることがわかりました。以上の結果から、私達が行おうとしている遺伝子の発現解析を目的にした大規模なバイオバンクを構築する際には、遺伝子発現の変動およびRNAの分解を抑えた検体処理方法が必要不可欠であることが示されました。

同様にそれぞれのRNA安定化剤添加群の遺伝子発現を解析したところ、本研究で使用したRNA安定化剤のうち、RNALockおよびRNA/DNA Stabilization Reagent for Blood and Bone marrow、1-Thioglycerol/Homogenization solutionの3種類のいずれかをPBMCに追加することによって、遺伝子発現の変動とRNAの分解を抑えられることが明らかになりました。今回の研究論文では今後のバイオバンクに役立つ具体的な血液処理方法を合わせて報告しました。

今後、私達はこれらの解析結果に基づいて、RNAの遺伝子発現の変動ならびに分解を抑えた輸送を行い、病気と関連のある遺伝子変動ならびに病気の発症前に体の中で進んでいる変化を見つける方法について研究を進めていく予定です。

*1 遺伝子の発現解析

遺伝子の発現解析とは、DNAの転写産物であるRNAの発現を定量的に解析することです。遺伝子の発現は生体内において時々刻々と変化するものですが、病気を発症した際に特定の遺伝子の発現が変化することが知られています。最近ではガン関連遺伝子の発現を解析することでガンのリスクを評価することも可能になっています。

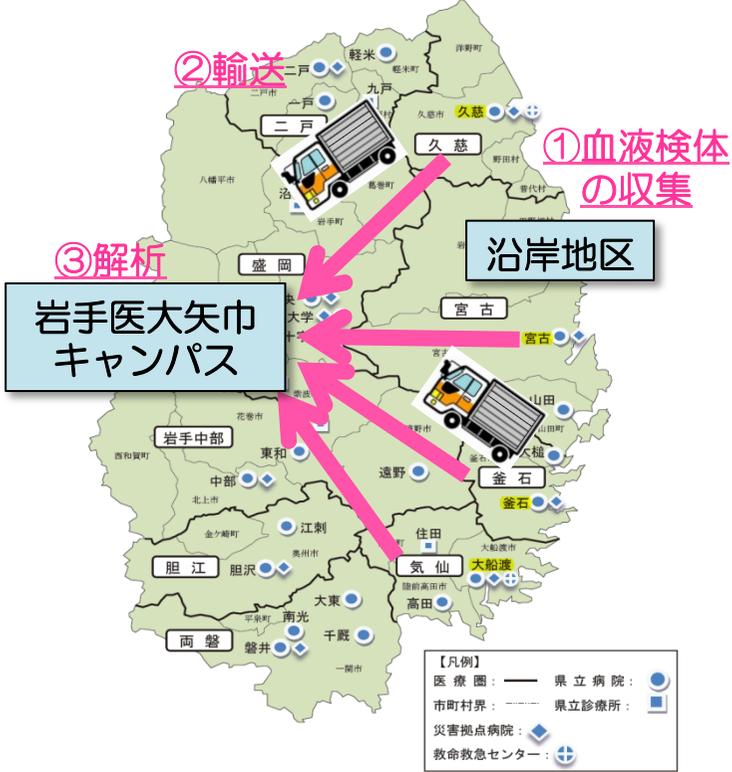
*2 RNA

RNAには様々な種類があり、多様な機能を持っています。最も良く知られているのは、DNAの塩基配列を基にタンパク質を合成する過程に関与するメッセンジャーRNA (mRNA)、トランスファーRNA (tRNA)、リボゾームRNA (rRNA)の3種類です。その他にも、タンパク質のように酵素活性を示すRNAや遺伝子発現に関与するRNAなど多種多様に富んでいます。

*3 末梢血単核球 (PBMC)

末梢血単核球 (PBMC) は、血液の血球成分のうちリンパ球と単球を合わせた総称です。末梢血単核球 (PBMC) は、炎症や免疫に関係しています。

収集された血液のRNAを採血時の品質で保持させる前処理方法 と遠隔地から解析本部までの検体輸送方法の検討



沿岸地区で収集した血液の遺伝子発現解析を行うためには、

- ① 解析本部への検体輸送
 - ② 採血時の品質保持
- が必須

<検討事項>

- 凍結や解凍による検体への影響
- RNA安定化剤の有用性

<解析方法>

- RNAの純度、収量、RIN値の測定
- リアルタイムPCR
- RNAシーケンシング

RNA安定化剤の添加によりPBMCの遺伝子発現の変動やRNAの分解が抑えられることが明らかになった。

遠隔地で収集した血液のRNAの安定性を保持した輸送方法を確立した

～ 今後の展望 ～
病気に関連した遺伝子の探索や病気の発症前に変動する遺伝子を明らかにしたい。