

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10063

研究課題名(和文) 穿刺吸引細胞診検体のトランスクリプトーム解析による甲状腺癌術前診断の可能性を探る

研究課題名(英文) Possibility of the preoperative diagnosis thyroid cancer by the transcriptome analysis of fine-needle aspiration cytology specimens

研究代表者

軸 蘭 智雄 (Tomoo, Jukuzono)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・研究員

研究者番号：10465312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：穿刺吸引細胞診は、甲状腺腫の診断において早い段階で行われる診断方法であり、簡便性・安全性・費用対効果の点で重要な検査方法である。

固定液あるいは直接RNA抽出液を用いて、細胞を直接回収する液状検体細胞診は、細胞診検体の回収を容易にする点で都合がよいが、細胞の回収とRNA抽出の難しさが主な理由で、RNA発現診断といった分子診断に適していなかった。

我々は、液状検体を用いた甲状腺腫検体からの細胞回収とRNA抽出の改善を行った。そして、トランスクリプトーム解析によって術前診断でのバイオマーカーを発見する可能性を探った。

研究成果の概要(英文)：Fine-needle aspiration biopsy (FNAB), an important diagnostic tool given its simplicity, safety, and cost-effectiveness, is fast becoming a popular procedure in the diagnosis of thyroid tumors.

Liquid-based cytology (LBC), in which isolated cells are collected in a fixative solution or RNA extraction solution directly, is advantageous in that it facilitates the preparation of homogenous cytological specimens. However, LBC has not been applied to molecular diagnoses, such as RNA expression-based diagnosis, mainly because of difficulties in cell recovery and RNA isolation.

We performed this study to improve cell recovery and RNA extraction from thyroid tumor cell samples processed for LBC, by which the transcriptome analysis-based identification of pre-operative biomarkers is expected.

研究分野：内分泌外科学

キーワード：甲状腺癌 穿刺吸引細胞診 トランスクリプトーム 術前診断 RNA

1. 研究開始当初の背景

【乳頭癌診断の現状】乳頭癌は甲状腺癌の中で一番多く、90%強を占める高分化癌である。一般的に進行は遅くその予後は良好であるが、中には生命予後に影響を与える「高危険度群」が存在する (Sugitani I, et al. Surg 135: 2004)。有意な生命予後不良因子として、遠隔転移、年齢 50 歳以上における高度の多臓器浸潤、3 cm 以上の巨大リンパ節転移が挙げられており、甲状腺腫瘍ガイドライン 2010 年版に乳頭癌のリスク分類法の根拠として挙げられている。このように、癌死につながる予後不良な乳頭癌も存在するが、現状では上記のような臨床背景による因子以外に明確な予後不良因子は無く、乳頭癌の生物学的悪性度の評価を可能にする高感度かつ特異的バイオマーカーの開発が期待されている。

【濾胞癌診断の現状】濾胞癌は甲状腺癌の約 5% を占める高分化癌であり、乳頭癌に次いで 2 番目に多い。一般的にその予後は良好であるが、まれに遠隔転移を認めることがあり、その場合の予後はきわめて不良である。しかし、濾胞癌の術前診断はきわめて難しく、また術後の病理診断においても良・悪性の鑑別さえ不可能なこともあり、術後遠隔転移を認めて初めて初めて臨床的に濾胞癌と判明する場合がある。濾胞癌に対する高感度かつ特異的な診断を可能にするバイオマーカーの開発が期待されている。

2. 研究の目的

甲状腺癌の 90%強を占める乳頭癌、および約 5% を占める濾胞癌は、一般的に予後は良好であるが、中には生命予後に影響を与える危険度の高い群が存在する。しかし、現状では乳頭癌の生物学的悪性度の評価は不可能であり、また濾胞癌では良・悪性の鑑別さえ困難なことも多い。そこで、これらの問題を解決する高感度かつ特異的な診断バイオマーカーの開発が期待されている。本研究では、術前細胞診 (Liquid-based cytology; LBC) で得られた検体に着目し、すべての RNA 分子 (トランスクリプト) を対象とした網羅的トランスクリプトーム解析により、高危険度群症例で発現が顕著に変動しているトランスクリプト (マイクロ RNA 等の非蛋白質コード RNA を含む) の同定を試みる。また、本解析で蛋白質をコードする mRNA が同定された場合には、当該蛋白質の発現変動についても合わせて解析し、細胞診における甲状腺癌の癌死危険度診断マーカーとしての可能

性を追求する。

3. 研究の方法

(1) ガラス繊維フィルターを用いることによる検体からの細胞回収と RNA 抽出

ヒト甲状腺乳頭癌細胞株 K-1 を培養し、一定数の細胞を固定保存液サイトリッチレッド (CR-Red) もしくはサイトリッチブルー (CR-Blue) (ベクトンディッキンソン) 中に懸濁した。これを 4℃ にて一晚静置し、ガラス繊維フィルター GF/C (GE ヘルスケア) に通すことにより細胞をトラップした。フィルターを PBS にて洗浄した後、Proteinase K (ProK) を含む溶解液中に浸漬し、55℃ にて 0~3 時間インキュベートした。この液を回収後 RNAiso-Blood (タカラバイオ) を用いて RNA を抽出した。

(2) ProK 処理が LBC 検体の細胞からの RNA 抽出に及ぼす効果についての検討

ホルマリン固定パラフィン包埋サンプルからの RNA 抽出において有効である Proteinase K (ProK) 処理が、液状化検体細胞診 (Liquid based cytology; LBC) 検体に対して RNA 抽出効率に及ぼす効果について検討した。ヒト甲状腺乳頭癌細胞株 K-1 を培養し、一定数の細胞を固定しない群と CR-Red もしくは CR-Blue にて固定した群に分けた。各群のフィルターを、ProK を含む溶解液中に 0 時間、1 時間、および 3 時間浸漬した。

(3) 抽出した RNA の品質評価

甲状腺乳頭癌と病理診断された患者 5 例のサンプルを使用した。穿刺した針はスライドガラスに吹き付けた後に、針に残った余剰検体をサイトリッチレッド保存液に入れて保存、この保存液を用いたサンプルから RNA 抽出を行った。この際、ProK 処理した群としない群とで RNA 抽出の比較を行った。

(4) 次世代アレイによる網羅的解析

術後遠隔転移を認めた、「明らかに」濾胞癌である 6 サンプル (3 症例、各々癌部と非癌部) の FFPE 由来 RNA におけるトランスクリプト (非蛋白質コード RNA を含む) の発現変動について、次世代型アレイである Affymetrix 社 Clariom D を用いて網羅的に解析した。

(5) 穿刺吸引細胞診における RNA 抽出法

申請者らが確立したプロトコルによって穿刺吸引細胞診検体からの RNA 抽出は可能であるが、概してその収量は少なく、不純物も少なくない。そこで、核酸定量法として一般的な紫外吸光測定に加えて、RNA 特異的蛍光色素を利用する QuantiFluor RNA System (Promega) により濃度測定を実施した上で、Agilent 2100 BioAnalyzer にて RNA の品質の客観的評価である RNA Integrity Number (RIN)を測定することで評価する方法を試みた。

4. 研究成果

(1) ガラス繊維フィルターを用いることによる検体中の細胞回収効率の評価

細胞診検査においては、一般的に病変部より採取した細胞を直接スライドグラスに塗抹して標本とするが、細胞の採取や塗抹の手法によって標本の質に差が生じ、それが診断結果に影響を及ぼしうるといった問題がある。一方、採取した細胞を固定溶液中に回収して用いる液状化検体細胞診 (Liquid based cytology; LBC) では、従来法に比して標本の均質化が可能であり、普及が進んでいる。しかし、採取された細胞の純度や回収効率が安定しないことや、固定された細胞からの RNA 抽出に困難を伴うことから、遺伝子発現を指標とした診断への応用は進んでいない。そこで本研究では、LBC 検体のマイクロ RNA 解析による甲状腺癌術前診断技術開発の予備実験として、甲状腺癌細胞検体からの細胞回収時にガラス繊維フィルターを用いたトラップ法を採用することにより回収効率の改善を試みた。その結果、フィルターを用いることにより検体中のほぼすべての細胞を回収することが可能であった。また、このことに伴い、RNA 収量が増加した。

(2) ProK 処理が LBC 検体の細胞からの RNA 抽出に及ぼす効果についての検討

CR-Red 固定細胞については、ProK 非処理群では RNA がほとんど得られなかったが、ProK 処理により劇的な収量の改善が認められ、また RIN 値も 9 以上であったことから質的にも良好と判断された (下図)。一方、CR-Blue 固定細胞においても ProK 処理は RNA 収量を増加させたが、CR-Red の場合と異なり ProK 非処理群からもある程度の RNA は得られた。しかし、ProK 非処理群の RNA の RIN 値は低く、対照的に ProK 処理群の RNA の RIN 値は 9 以上であった。また、この結果を反映して、一定量の RNA 中の U6 は ProK 処理群においてより高レベルで検出された。ProK 処理を行うことにより、固定したヒト甲状腺由来細胞から得られる RNA の収量および質が改善した。

(3) 抽出した RNA の品質評価

サイトリッチ固定 K1 細胞と実際の臨床サンプルである穿刺吸引細胞診の余剰検体か

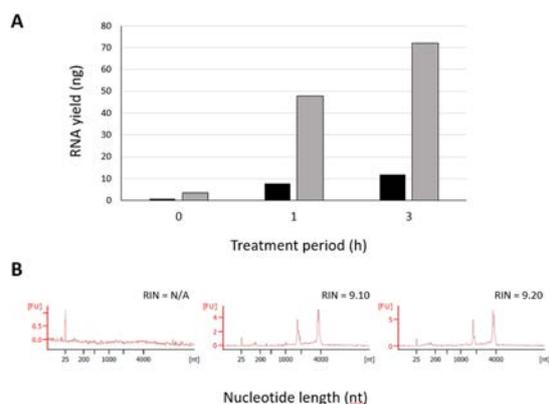


図 サイトリッチ固定細胞からの RNA 抽出における Proteinase K の効果

(A) CR-Red 固定した 20,000 個 (黒) および 100,000 個 (灰色) の K1 細胞からの RNA の収量 (B) 100,000 個 (灰色) の K1 細胞から抽出された RNA の RIN 値。ProK 処理は左から順に 0、1、3 時間。

ら RNA を抽出し、RNA 発現解析が可能かどうかを検証したところ、ProK 処理した群において U6 small nuclear RNA (U6) や miR-221 の発現を確認することができた。

(4) 次世代アレイによる網羅的解析

癌部・非癌部間の発現強度が有意に異なる 685 種類のトランスクリプトがリストアップされ、その上位にはいくつかのマイクロ RNA も含まれていた。また、有意な発現低下を示すトランスクリプトの中には、濾胞線種 (良性) と比較して濾胞癌で発現が低下することが報告されている TFF3 (Takano T *et al.* Endocr J. 56; 2009) も含まれており、本解析結果の妥当性を示すものと考えている。

(5) 穿刺吸引細胞診における RNA 抽出法

甲状腺に加えて同じ体表臓器である乳房で先行実施したが、RIN が 7 以上の分解の少ない RNA を得ることが出来た (第 60 回日本甲状腺学会学術集会およびコスミック研究奨励賞受賞講演)。また、甲状腺においても同様の結果を得ることが出来た。このことにより、比較的鎖長の長い mRNA や長鎖 noncoding RNA も研究解析対象となることを確認した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 9 件)

- ① 軸 蘭 智 雄 細胞検査士要望教育シンポジウム「甲状腺腫瘍の miRNA」第 56 回日本臨床細胞学会秋期大会 (招待講演) 2017 年 11 月 福岡 (福岡)
- ② 軸 蘭 智 雄 「甲状腺細胞診における液状検体を用いた RNA 解析と術前診断マーカーの開発」第 60 回日本甲状腺学会

学術集会（招待講演）2017年10月 大分（別府）

- ③ 軸藺 智雄、石橋 宰、杉谷 巖 シンポジウム「RNA解析と甲状腺癌」第50回日本甲状腺外科学会（招待講演）2017年10月 福島（福島）
- ④ 軸藺 智雄、石橋 宰、杉谷 巖 「LBC固定液の違いによる甲状腺癌培養細胞からのRNA抽出条件の比較検討」第29回日本内分泌外科学会 2017年5月 兵庫（神戸）
- ⑤ 軸藺 智雄 ワークショップ「LBC検体を用いたANCILLARY TECHNIQUES RNAの抽出とその応用」第55回日本臨床細胞学会秋季大会（招待講演）2016年11月 大分（別府）
- ⑥ 軸藺 智雄 コスミック研究創成賞「甲状腺細胞診における液状検体を用いたRNA解析と術前診断マーカーの開発」第59回日本甲状腺学会 2016年11月 東京（虎ノ門）
- ⑦ 軸藺 智雄、石橋 宰、杉谷 巖 「固定保存液を用いた甲状腺乳頭癌細胞診からのRNA解析について」第49回日本甲状腺外科学会学術集会 2016年10月 山梨（甲府）
- ⑧ 軸藺 智雄、石橋 宰、杉谷 巖 「Liquid based cytology(LBC)を用いた甲状腺細胞診における遺伝子発現解析の可能性」第57回日本人間ドック学会学術大会 2016年7月 山梨（松本）
- ⑨ 石橋 宰、軸藺 智雄、杉谷 巖 甲状腺細胞診液状化検体からの細胞回収とRNA抽出の改善 第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学会合同大会 2015年12月 兵庫（神戸）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
- (1)研究代表者
軸藺 智雄 (JIKUZONO TOMOO)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・研究員
研究者番号：10465312
 - (2)研究分担者
杉谷 巖 (SUGITANI IWAO)
日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授
研究者番号：50465936

石橋 宰 (ISHIBASHI OSAMU)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：70293214
 - (3)連携研究者
()

研究者番号：
 - (4)研究協力者
廣川 満良 (HIROKAWA MITSUYOSHI)
隈病院病理科長