

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：10107
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2015～2017
 課題番号：15K19302
 研究課題名(和文) 肝癌由来新規ヘプシジンバリアントの担癌鉄代謝関与とバイオマーカーとしての有用性

 研究課題名(英文) Usefulness as the biomarker and effect in the iron metabolism of new splicing variant of hepcidin with liver cancer origin

 研究代表者
 土岐 康通(Toki, Yasumichi)

 旭川医科大学・大学病院・医員

 研究者番号：90596280
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：患者血清exosomeからhepcidin mRNAとexon 2が欠失したhepcidin mRNAのsplicing variantをDigital PCRで検出する測定系を構築した。
 健康人、肝硬変患者、肝癌患者血清で測定し、このsplicing variantは健康人、肝癌の既往のない肝硬変患者では検出されなかったが、肝癌の既往のある肝硬変患者、肝癌患者では検出される症例を認めた。膵癌、胃癌、大腸癌患者ではsplicing variantは検出されなかった。hepcidin mRNAのsplicing variantは肝癌における新規の腫瘍マーカーとして有用である可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：I built the system of measurement to detect hepcidin mRNA and splicing variant of hepcidin mRNA from serum exosome with Digital PCR.
 Splicing variant of hepcidin mRNA was not detected in healthy person and liver cirrhosis patients without the past of the liver cancer, but it was detected in some liver cirrhosis patients with the past of the liver cancer and liver cancer patients. Splicing variant of hepcidin mRNA was not detected in pancreatic cancer, stomach cancer, and colon cancer patients. From these results, splicing variant of hepcidin mRNA was considered as new useful biomarker in the liver cancer.

研究分野：血液学

キーワード：ヘプシジン スプライシングバリアント バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

癌細胞では選択的 RNA splicing に異常が
おこり、機能異常を持ったタンパク質が産生
され、癌細胞の発育・進展に關与するとの報
告がある。さらにこの splicing variant な
いしは異常タンパク質が癌のバイオマー
カーや治療のターゲットとなりうることを示
唆されている。

2. 研究の目的

今回、肝癌細胞株 HLF で、HAMP gene の exon
2 に相当する 60 塩基を欠失した hepcidin
messenger RNA (mRNA) の splicing variant
を発見した。この hepcidin は肝細胞で産生
されることから、hepcidin mRNA の splicing
variant が肝癌のバイオマーカ-となりうる
可能性が考えられ、その検証手段として、(1)
絶対定量法を応用した高感度検出手段の構
築、(2) liquid biopsy としての血清 exosomal
RNAs の精製方法の構築を行い、これらの方法
を利用して(3)各種癌における hepcidin mRNA
の splicing variant の発現量を比較検討す
ることで、当該 variant が肝癌のバイオマー
カーとして有用であるか、検討することを目
的とした。

3. 研究の方法

(1) 絶対定量法を応用した高感度検出手段
の構築する。

検出方法として real time PCR なども考慮
されるが、血清 exosome 中における mRNA は
微量と考えられ、house gene との比較が困難
であることが考えられる。そのため、高感度
で絶対定量も可能である digital PCR を用い
ることとし、hepcidin mRNA の splicing
variant を検出可能か検討する。

(2) liquid biopsy としての血清 exosomal
RNAs の精製方法の構築する。

hepcidin mRNA の splicing variant を検出
するための検体として、肝癌組織では肝生検
や手術などが必要となり、患者への侵襲度
が高くなる。今回用いる血清の exosome は内部
に DNA や RNA などを含有し、細胞から細胞へ
の情報伝達として利用されている。癌細胞か
ら血清中に放出される exosome は癌細胞特異
的な DNA や RNA を含むと考えられている。採
血は一般臨床行われる検査方法であり、侵襲
度もそれ程高くないため、患者血清中の
exosome を利用する。実際に exosome を抽出
し、その内部に hepcidin mRNA の splicing
variant が含有されているかを確認していく。

(3) 各種癌における hepcidin mRNA の
splicing variant の発現量を比較検討するこ
とで、当該 variant が肝癌のバイオマーカ-
として有用であるかを検討する。

血清中の exosome から抽出した hepcidin
mRNA の splicing variant が肝癌患者や健常
人で実際に発現しているかを検討し、既存の

肝癌腫瘍マ-カーである AFP、PIVKA- と比
較していく。また肝癌以外の癌患者での発現
についても検討し、肝癌特異性の腫瘍マ-カ
-であるかを確認する。

4. 研究成果

(1)、(2)：まず血清 exosome 中の mRNA を抽
出するために患者血清 1 ml より Total
Exosome Isolation (from Serum)
(Invitrogen®) を用いて exosome を回収した。
次に Total Exosome RNA and Protein
Isolation Kit (Invitrogen®) を用いて全
RNA を抽出した。Exosome 中の mRNA は微量
であることが考えられたため、遠心濃縮器を
用いて RNA の濃縮操作を加えた。ゲル電気泳
動を施行し、細胞から抽出された時に認める
18S、28S などの高分子の RNA は認めず、低分
子の exosomal RNA が抽出されていることを
確認した(図 1)。

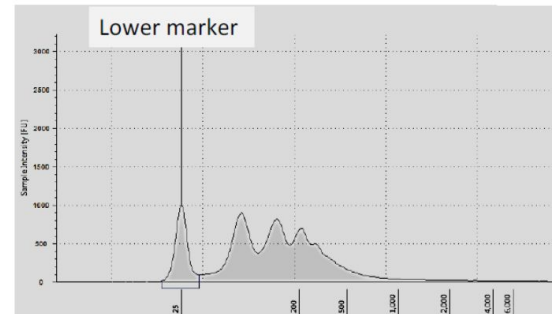


図 1. 血清 exosome から抽出した RNA の電気
泳動パターン

この exosome から抽出した RNA 中の hepcidin
mRNA を検出するために、通常の hepcidin
mRNA および hepcidin mRNA の splicing
variant に特異的なプライマーと TaqMan プロ
-ブ(表 1)を用いて、Digital PCR (Applied
Biosystems®) で検出を試みたが、検出でき
なかった。

	hepcidin mRNA	
	通常型	splicing variant
Forward Primer	exon 1	exon 1
Reverse Primer	exon 2	exon 3
Probe	exon 1 と exon 2 の 接合部	exon 1 と exon 3 の 接合部

表 1. 検出 primer と probe の位置

検出する hepcidin mRNA の splicing variant
が微量であるために検出ができないか、それ
とも exosome 中に hepcidin mRNA の splicing
variant が含まれていないかを検討した。肝
癌細胞株から直接抽出した RNA ではこれまで
に行っていた検討通り hepcidin mRNA の
splicing variant を検出することは可能であ

った。一方、患者血清中の exosome と同条件に近づけるために、肝癌細胞株培養上清中に分泌された exosome を用いた検討では hepcidin mRNA の splicing variant を digital PCR で直接検出することはできなかった。hepcidin mRNA の splicing variant の量が微量であることを考え digital PCR で測定する前に、通常の PCR で hepcidin mRNA の splicing variant を増幅させる過程を加えたことで検出は可能になった。このことから血清 exosome から抽出してきた hepcidin mRNA の splicing variant が微量である可能性を考え、digital PCR で測定する前に、通常の PCR で mRNA を増幅する工程を加えると検出が可能となった。これにより、患者血清に含まれている exosome 中の hepcidin mRNA の精製方法および検出方法を構築できた (図 2)。

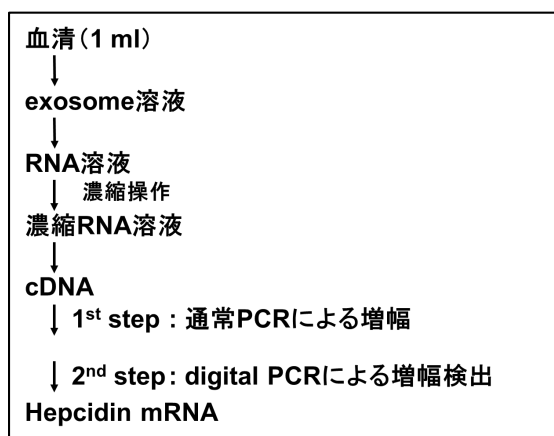


図 2. 血清 exosome 中の hepcidin mRNA 精製方法および検出方法

(3) ; 肝癌患者における検討

次に肝癌患者において上記で構築した方法を用いて hepcidin mRNA 通常型およびその splicing variant の検出を試みた。肝癌患者 25 症例、肝癌の既往のある肝疾患患者 8 症例、肝癌の既往のない肝疾患患者 14 症例、健常人 30 症例で測定を行った。肝癌患者では 25 症例中 13 症例で、肝癌の既往のある肝疾患患者では 8 症例中 2 症例で hepcidin mRNA の splicing variant が検出された。特に肝癌群では高値で検出される症例が多い傾向があった。一方、肝癌の既往のない肝疾患患者および健常人では hepcidin mRNA の splicing variant は検出されなかった。hepcidin mRNA の splicing variant が検出された 15 症例について癌の大きさ、個数、転移、HBV、HCV などの感染症、肝予備能力について検討したが、明らかな傾向は認めなかった。悪性黒色腫では exosome を介して遠隔転移に関与すると言われている。今回の検討では肝以外に多数の遠隔転移を認める症例で hepcidin mRNA の splicing variant を認めない症例がある一方、肝内に単発で限局している症例で hepcidin mRNA の splicing variant を認める症例があるなど、hepcidin mRNA の splicing variant の臨床的意義については現時点では不明で

ある。今後の経過および症例の積み重ねが重要であると考えられた。また、過去に肝癌を認め治療により画像や採血上、癌を認めない状態になっている患者で検出されたことは非常に興味深い結果である。もちろんこの 2 症例は AFP や PIVKA-Ⅱ の肝癌腫瘍マーカーは陰性であるため、今後経過観察していく中で肝癌再発を認めるのであれば、hepcidin mRNA の splicing variant が再発を示唆する鋭敏なマーカーとなると考えられた。

通常型の hepcidin mRNA については各患者群ともに肝癌患者で 8 症例、肝癌既往のある肝疾患患者で 4 症例、肝癌既往のない肝疾患患者で 1 症例、健常人で 3 症例検出された。どの症例も明らかな特徴を認めなかった。

また肝癌患者において現在肝癌の腫瘍マーカーとして一般的に使用されている AFP、PIVKA-Ⅱ とこの hepcidin mRNA の splicing variant が関連しているかを検討したが、それぞれ明らかな相関は認めなかった。AFP、あるいは PIVKA-Ⅱ が陰性で hepcidin mRNA の splicing variant が検出された症例も少数ながら認めていた。

hepcidin mRNA の splicing variant は肝癌患者および肝癌の既往のある患者で認める症例がある一方、肝癌の既往のない患者や健常人では認めなく、現在使用している肝癌腫瘍マーカーとも相関しないことから、新規の肝癌腫瘍マーカーとして有用である可能性が示唆される結果となった。

次に血清中の hepcidin 蛋白と血清 exosome 中から抽出した通常型の hepcidin mRNA を比較検討した。血清中の hepcidin 蛋白は Human Hepcidin Quantikine ELISA (R&D systems®) を用いて測定した。血清中の hepcidin 蛋白濃度は健常人と比べて肝癌患者で有意に高値を示していた。一方、血清 exosome 中から抽出した通常型 hepcidin mRNA では有意差を認めなかった。各症例毎に血清中の hepcidin 蛋白と血清 exosome 中から抽出した hepcidin mRNA を比較していったが、明らかな相関を認めなかった。このことから血清中と exosome 中では環境が異なることが示唆された。Hepcidin mRNA の splicing variant については蛋白に翻訳されるかが不明であること、また測定する既存の方法がないため、比較検討できなかった。mRNA は血清中では不安定と考えられ、本研究では exosome 中の mRNA を検出する手法を取っているが、翻訳された血清中の蛋白を測定することの方が簡便に測定できる。しかし、hepcidin の splicing variant から翻訳される蛋白が測定可能であっても、血清中の蛋白量と exosome 中の mRNA に相関がなかったため、双方測定し検討することが必要であると示唆された。

(3) ; 各種癌患者における検討

肝癌患者では hepcidin mRNA の splicing variant を検出できる症例を認めたが、肝癌患者で特異的に検出できるマーカーである

か確認するために、他の癌患者で検出が可能かどうかを検討した。膵癌患者5症例、大腸癌患者2症例、胃癌患者1症例の8症例で検討を行った。hepcidin mRNA の splicing variant は全ての症例で検出されなかった。他の癌患者の血清からは hepcidin mRNA の splicing variant が検出されなかったことから、肝癌に特異的である可能性が示唆される結果となった。しかし、少数例での検討であるため、患者数を多くし、様々な病期での検討および日本で罹患数の最も多い肺癌を始めとする他の癌腫での検討も必要であると考えられた。

血清中の exosome から抽出した hepcidin mRNA の splicing variant は肝癌および肝癌の既往のある患者で検出される症例を認めしたが、健常人や他の癌患者からは検出されなかった。また現在、肝癌腫瘍マーカーとして一般的に使用されている AFP, PIVKA-Ⅱとも明らかな相関を認めないことから、新規の肝癌のバイオマーカーとして有用であることが示唆された。

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1件)

Toki Y, Sasaki K, Tanaka H, Yamamoto M, Hatayama M, Ito S, Ikuta K, Shindo M, Hasebe T, Nakajima S, Sawada K, Fujiya M, Torimoto Y, Ohtake T, Kohgo Y.

A selective splicing variant of hepcidin mRNA in hepatocellular carcinoma cell lines. 査読あり, Biochem Biophys Res Commun. 2016 Aug 5;476(4):501-507

〔学会発表〕(計1件)

土岐 康通

肝がん患者血清 exosome 中に同定したヘプシジン mRNA の選択的スプライシング・バリエーションに関する研究, 2017年5月27日, 第115回北海道癌談話会, 北海道大学(北海道)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

土岐 康通 (TOKI, Yasumichi)
旭川医科大学・大学病院・医員
研究者番号: 90596280