

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09011

研究課題名(和文)新規幹細胞解析法、FACS-mQの臨床応用

研究課題名(英文)FACS-based analysis of gene expression profile

研究代表者

高野 徹 (Takano, Toru)

大阪大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号：00263236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺組織内の幹細胞・癌幹細胞を解析する方法として、甲状腺組織を単一細胞レベルまで分散した後細胞内のRNAを保持した状態で固定し、蛍光標識抗体で標識した後でFACSで目的の細胞を採取し、RNAを回収して遺伝子発現プロファイルを解析するFACS-mQと呼ぶ方法の開発を目指した。ヒト甲状腺手術標本、ラット甲状腺組織を使用してFACS-mQを実施した。甲状腺乳頭癌組織では一部の検体に2つの特徴的な分画があることが判明した。ラット甲状腺組織では3つの分画を確認したが、遺伝子発現プロファイル解析ではそのうち1つの分画は甲状腺濾胞上皮細胞の特徴を示していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幹細胞や癌幹細胞はその強力な増殖能から組織の再生に関与し、多くの疾患の経過に影響を与えている。しかし、これらは組織内に少数しか存在しないため同定や解析は極めて困難である。我々は、組織を単一細胞レベルまで分散し、RNAを保存した状態で固定し、蛍光標識抗体でラベルした後でFACSで目的の細胞を回収し、RNAを抽出・遺伝子発現プロファイルを解析することでそれらの性質を同定するFACS-mQという新しい方法を開発した。この方法を使用してラット・ヒト甲状腺組織を解析したところ、それぞれ特徴的な細胞分画の同定に成功した。当方法を用いることで疾患の新たな診断法が開発できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：A single cell analysis using flow cytometry or fluorescence-activated cell sorting (FACS) is a useful tool to investigate thyroid tissues. In this study, we selected early and mature thyroid markers, thyroid transcription factor 1 (TTF-1), thyroglobulin (TG), and sodium/iodine symporter (NIS), as well as N-cadherin as targets. Rat thyroid tissues and human thyroid cancer tissues were subjected for the following analysis. After 4-color analysis with FACS, gene expression profiles in FACS-purified cells were determined with microarrays. In rat thyroid tissues, three distinct cell populations showing different gene expression profiles were identified. Three of 28 human thyroid cancer tissues showed clear heterogeneity in flow cytometry. In these samples, TG and NIS protein expression did not differ among cells, whereas TTF-1 and N-cadherin proteins exhibited heterogeneity. Using the present method, we identified distinct cell populations in both rat and human thyroid tissues.

研究分野：甲状腺疾患

キーワード：FACS がん幹細胞 遺伝子発現プロファイル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生医学と癌幹細胞研究は今後最も発展の期待できる医療分野であり、それに対応する臨床検査法の開発は急務である。しかし、幹細胞や癌幹細胞は組織中に極めて少数しか存在せず、それらの性質については明らかでない点が多く、臨床現場で活用できるような検査法は存在しない。従って、組織や血液など臨床検体に少数含まれる幹細胞・癌幹細胞等を限られた情報で効率よく検出・解析する技術の開発が新たな臨床検査法開発のための必須条件となると考えられる。

そのような技術に近いものとしては FACS (fluorescence activated cell sorting) が知られているが、FACS には下記の 2 つの欠点がある。1) 細胞を分離するためには目的とする細胞に特異的な表面抗原が存在することが必要であり、実際に応用できる細胞の種類は極めて限られる。2) 分離した後の細胞の性質の解析は原則的に細胞を生きた状態で分離した後、培養することによるが、臨床現場でそのような操作を実現するのは困難である。我々はこれらの問題を解決するため、1) 組織または血液検体から採取された細胞を適当な条件で固定・保存 2) RNA が分解しない条件で目的の細胞が発現する 1 種類または 2 種類以上の細胞内抗原または特異的 RNA を蛍光色素で標識 3) FACS で目的の細胞を分離 4) 回収された細胞より mRNA を抽出して遺伝子発現プロファイルを解析する、という一連の操作で、種々の臨床検体中に存在する少数の細胞を任意の遺伝子の発現をマーカーとして分離し、回収された細胞の性質を解析するという、より汎用性のある技術の開発を開始し、当方法を FACS-mQ (mRNA quantification after FACS) と名づけた。我々は FACS-mQ の改良を続け、検体を固定して -80 に保存する時の凍結保存液、抗体と反応させるときの緩衝液、FACS にかける前の保存液のそれぞれに 2mM DTT と 0.1U/μl human recombinant RNase inhibitor を加えることで RNA の保存状態がさらに改善することを確認した。これらの結果から臨床検体等、多数の細胞を FACS で回収することが期待できない検体からも FACS-mQ を実施することが可能となった。

2. 研究の目的

甲状腺組織を単一細胞レベルまで分散し、甲状腺特異的抗原を使用して FACS-mQ を実施することで組織内に存在する特定の細胞分画を採取し、その細胞分画から RNA を回収、遺伝子発現プロファイルを解析することより採取された細胞の性質を同定する。

3. 研究の方法

(1) 研究材料

a) 細胞

下記の細胞株をコントロール検体として使用した。ヒト未分化癌由来の細胞株 8305C (N-カドヘリンを発現)、ヒト肺癌由来の細胞株 PC3 (TTF1 を発現)、ラット甲状腺由来の細胞株 FRTL-5 (サイログロブリン、TTF1 を発現)、これらの細胞株は subconfluent になるまで培養したのち、トリプシンあるいはディスパーゼで分散して単一細胞とし、既報の UM-Fix (メタノールと PEG を含む固定液、Yamada H, Maruo R, Watanabe M, Hidaka Y, Iwatani Y, Takano T, et al. Messenger RNA quantification after fluorescence-activated cell sorting using in situ hybridization. Cytometry A. 2010; 77:1032-7) にて固定後 -80 で使用まで保存した。

b) 患者検体

バセドウ病の患者、および甲状腺癌の患者の手術時に採取された甲状腺組織の、病理診断に

使用した余剰分 1g を採取して実験に使用した。摘出された組織は直ちに ThelioKeep™にて冷蔵保存した。実験のプロトコールは大阪大学の倫理委員会で承認されている。

c) ラット甲状腺の採取

4 週齢の雄ウイスターラットより麻酔科で甲状腺を摘出した。実験のプロトコールは大阪大学の動物実験倫理委員会で承認されている。

d) 組織分散

採取された組織は、既報に従って単一細胞にまで分散した (Matsumoto C, Ito M, Yamada H, Yoshida H, Watanabe M, Takano T, et al. Preparation of thyroid follicular cells for mRNA quantification after fluorescence-activated cell sorting. *Scand J Clin Lab Invest.* 2013;73:245-52)。組織をメスで細切れにした後、コラゲナーゼを含む培地で 37 °C で約 2 時間振蕩培養した。溶血操作をしたのち、ディスペーゼ、DNase I を含む培地で 37 °C でさらに培養した。得られた単一細胞はフィルター濾過によって回収し、UM-Fix にて固定後、-80°C にて保存した。

e) 抗体の標識

抗サイログロブリン抗体を FITC で、抗 NIS 抗体を PE で、抗 TTF 1 抗体を APC で標識した。抗 N カドヘリン抗体は 2 次抗体として PE-Cy7 標識抗体を使用することで検出した。

d) FACS

採取された細胞は融解後、蛍光標識抗体と反応させた。抗体反応液には DTT と RNase Inhibitor を加え、反応中の RNA の分解を抑えた。標識された細胞を FACS Aria™ IIIu flow cytometer (BD Biosciences) で解析した。データは FACSDiva™ (BD Biosciences) と FlowJo (Tree Star, Inc.) で解析した。特定の細胞分画が見つかった場合は分画を採取した。

f) RNA の抽出

細胞は ISOGEN-LS (NIPPON GENE) 内に回収し、RNA を抽出した。

g) マイクロアレイ解析

抽出した RNA は GeneChip Pico Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific) で増幅、標識し、Clariom S Assays (Thermo Fisher Scientific) にて遺伝子発現プロファイルを解析した。

4. 研究成果

コントロールの細胞を用いた Flow Cytometry ではそれぞれ予想される位置に各細胞が配置され、各標識抗体が正しく反応していることが確認できた。

ラット甲状腺細胞を用いた検討では Flow Cytometry で P1, P2, P3 の 3 つの細胞分画が確認できた。これらの細胞分画から RNA を回収し、マイクロアレイ解析に供した。P2 分画では *Tg*, *Pax8*, *Tpo*, and *Foxe1* 等の甲状腺特異的遺伝子が発現しており、甲状腺濾胞上皮細胞であることが示唆された。P1 分画では間質細胞由来の遺伝子の発現が多く認められた。

ヒト甲状腺細胞を用いた検討では、Flow Cytometry で 28 例の甲状腺乳頭癌のうち 3 例で特徴的な細胞分画を認めた。この細胞分画では TTF1 と N カドヘリンの発現は低下し

ていたが、サイログロブリンとNISの発現は変化していなかった。この細胞分画を回収してRNAを抽出したが、細胞数が少なかったこととRNAの分解が進んでいたことからマイクロアレイ解析を行うことはできなかった。

今回、ヒト組織ではマイクロアレイを用いた解析まで到達できなかったが、ラットでは詳細な解析ができているため、手術時の検体採取にさらに工夫を加えることで、RNAの品質保持と回収細胞数の増加を可能とすれば、ヒト臨床検体でもFACS-mQの解析が可能になると考えられた。今回、ヒト乳頭癌で検出された細胞分画の詳細な性質は明らかではないが、甲状腺乳頭癌は一般的には予後良好とされているが、一部に予後の非常に悪いものがあり、その生物学的な違いは明らかにされていない。その原因が組織内に混在する少数のがん幹細胞であれば、当方法を用いることで明らかにすることができるのではないかと予想される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Takano T | 4. 巻 印刷中 |
| 2. 論文標題 Overdiagnosis of juvenile thyroid cancer | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Eur Thyroid J | 6. 最初と最後の頁 印刷中 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000503323 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Takano T | 4. 巻 143 |
| 2. 論文標題 Overdiagnosis of thyroid cancer: the children in Fukushima are in danger. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Arch Pathol Lab Med | 6. 最初と最後の頁 660-661 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5858/arpa.2018-0586-LE | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Fukano H, Takano T, Fujimoto Y, Nakatani R, Watanabe M, Hidaka Y, Shimomura I. | 4. 巻 95 |
| 2. 論文標題 In tube immunocytochemistry for fluorescence-activated cell sorting that prevents RNA degradation in sorted cells. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biotech Histochem | 6. 最初と最後の頁 1-7 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10520295.2019.1632485 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Takano T | 4. 巻 印刷中 |
| 2. 論文標題 Overdiagnosis of juvenile thyroid cancer: Time to consider self-limiting cancer. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 J Adolescent Young Adult Oncol | 6. 最初と最後の頁 印刷中 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/jayao.2019.0098 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Takano T | 4. 巻 125 |
| 2. 論文標題 Natural history of thyroid cancer suggests beginning of the overdiagnosis of juvenile thyroid cancer in the United State. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Cancer | 6. 最初と最後の頁 4107-4108 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1002/cncr.32424 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------|
| 1. 著者名 Takano T | 4. 巻 印刷中 |
| 2. 論文標題 In reply: An accurate picture of Fukushima's Thyroid Ultrasound Examination Program. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Arch Pathol Lab Med | 6. 最初と最後の頁 印刷中 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 高野 徹 | 4. 巻 別冊 |
| 2. 論文標題 甲状腺癌のあらたな発がん理論、芽細胞発癌説と分子診断法の開発状況 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 別冊・医学のあゆみ | 6. 最初と最後の頁 79-84 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 高野 徹 |
| 2. 発表標題 芽細胞発がんー日本から、甲状腺から始まったがん診療革命 |
| 3. 学会等名 日本臨床化学会第58回年次学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 高野 徹 |
| 2. 発表標題 福島の甲状腺癌の過剰診断：なぜ発生し、なぜ拡大したか |
| 3. 学会等名 日本リスク研究学会年次大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Toru Takano, et al. | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 SpringerNature Sigapore Pte Ltd. | 5. 総ページ数 577 |
| 3. 書名 Thyroid FNA cytology second edition. | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| <p>大阪大学大学院医学系研究科甲状腺腫瘍研究チーム http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/labo/www/CRT/CRT%20Home.html</p> |
|---|

| | | |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織 | | |
| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |