

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590670

研究課題名(和文) 次世代臨床検査法としての新規幹細胞・癌幹細胞検出技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of FACS-mQ as a tool for detecting stem cells or cancer stem cells

研究代表者

高野 徹 (Takano, Toru)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00263236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：次世代臨床検査法の核となると考えられる幹細胞・癌幹細胞の新たな検出法であるFACS-mQ (quantification of mRNA after FACS)の基礎技術の確立に取り組んだ。FACS-mQではRNAを分解させることなしに細胞を蛍光標識することで、その後のFACSによる細胞の分取と遺伝子発現プロファイル解析による細胞の解析を可能とする。本研究の主な成果として1)血液・組織検体からの単一細胞調整法・保存法の確立、2)高感度の細胞蛍光標識法の確立、3)細胞分取後のRNA回収と解析法の確立が挙げられる。

研究成果の概要(英文)：The basic protocols of FACS-mQ(mRNA quantification after FACS) were established. In FACS-mQ, intracellular RNAs are preserved without degradation after immunolabeling with a fluorophore, then we can analyze gene expression profiles of sorted cells after FACS. We established the following three protocols: 1)preparation of single cells from blood or tissue samples without RNA degradation, 2)high sensitive immunolabeling of the targeted cells, and 3) recovery and analysis of a small amount of RNAs from sorted cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：FACS-mQ flow cytometry 幹細胞 癌幹細胞 RNA 遺伝子発現プロファイル

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 4) FACS で目的の細胞を分離 5) 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。

FACS-mQ が確立すれば、限られた遺伝子発現の情報だけで少数含まれる幹細胞・癌幹細胞の分離が可能になるだけでなく、分離した後遺伝子発現プロファイルを解析することで、

分離に使用できる新たなマーカーが同定されさらに分離が容易になるという解析の正のループを形成することができ、幹細胞・癌幹細胞の研究を飛躍的に進展させることになる。我々は 1) 使用するすべての試薬を DEPC で処理し、界面活性剤を加える 2) 新しい固定液を使用する、等の数々の工夫により、蛍光標識抗体、cRNA プローブ、locked nucleic acid (LNA) プローブを使用した FACS-mQ の確立に世界で初めて成功した (Yamada H et al. Cytometry A in press, Yamada H et al. BBRC 397:425-428, 2010)。

2. 研究の目的

FACS-mQ は開発されたばかりの技術であり、臨床検査として成立させるためにはまだ改善の必要な点が多くある。当研究では FACS-mQ を効率的に実施するための基幹となるプロトコルを確立することを目指した。具体的には下記の項目を検討した。

1) 増感法の確立

発現量の少ない抗原、mRNA で細胞の分別が可能のように蛍光強度を強める方法を確立し、より汎用性を高める。

2) 臨床検体の保存法・前処理法の確立

臨床検体を使用しての FACS-mQ の実施は未経験であり、最適な検体の保存法・前処理法について検討・確立する。

3) RNA 解析法の確立

蛍光標識後、FACS にて採取した少数の細胞より RNA を回収し、遺伝子発現プロファイルを正確に計測する技術を確立する。

3. 研究の方法

1) 増感法の確立

mRNA を対象とした標識

mRNA を標識することを目的としたプロトコルにおいて、ハイブリダイゼーションの時間の延長による感度の変化を検討した。

細胞内抗原を対象とした標識

使用する抗体の種類、濃度、反応時間、抗体希釈液の変更、TSA を使用した場合の増感の効果を検討した。

2) 臨床検体の保存法・前処理法の確立

甲状腺の手術摘出標本を使用して、新しい組織保存液である TheLioKeep を使用した検体の保存、運搬を検討した。また、組織から単一細胞を採取するための酵素処理法について検討した。採取された単一細胞の保存条件について検討した。

3) RNA 解析法の確立

蛍光染色した後、FACS で解析するまでの細胞の保存条件について検討した。また FACS で採取された少数の細胞から効率よく遺伝子発現プロフィールを解析する方法について検討した。

4. 研究成果

1) 増感法の確立

RNA を対象とした標識

ハイブリダイゼーションの時間を 16 時間まで延長することにより、mRNA のさらなる分解を引き起こすことなく、FACS におけるシグナル/ノイズ比を向上させることが可能であった。この結果は文献 に記載している。

細胞内抗原を対象とした標識

適切なモノクローナル抗体の使用、抗体濃度と反応時間の適正化、抗体希釈液の変更、2 次抗体の使用によって、mRNA のさらなる分解を引き起こすことなく、FACS におけるシグナル/ノイズ比の格段の改善を認めた。この結果は文献 に記載している。TSA の使用はシグナル/ノイズ比の改善に役立たなかった。

2) 臨床検体の保存法・前処理法の確立

TheLioKeep を使用することにより、手術で摘出された甲状腺組織を最長 48 時間まで保存可能であった。またコラゲナーゼ・ディスペラーゼ・トリプシンを組み合わせることで甲状腺組織から単一細胞を効率よく回収することができた。これらの細胞は

DMSO を主成分とした細胞保存液で-80C で保存されたが、細胞内 mRNA は長期にわたって安定であった。また、保存してある細胞の凍結融解を繰り返しても mRNA の分解は認めなかったが、Flow Cytometry における感度は若干低下した。これらの結果は文献 に記載している。

3) RNA 解析法の確立

蛍光標識終了後の細胞は 40mMDTT を加えた溶液中で mRNA の分解をきたすことなく 4C で少なくとも 48 時間は保存可能であり、FACS 後の mRNA の回収率も良好であった。ただし、長時間の保存では Flow Cytometry における感度の若干の低下を認めた。

細胞採取後の遺伝子発現プロフィール解析において、従来法の定量 RT-PCR、最初に非特異的プライマーで増幅をかけてその後遺伝子特異的プライマーで定量する 2 段階定量 RT-PCR、Whole Transcriptome Amplification(WTA)の 3 種類を検討した。細胞数の少ない場合の低コピーの遺伝子の発現量の定量において、定量 RT-PCR、2 段階定量 RT-PCR はほぼ同等の検出感度であり、WTA はこれら 2 つに劣った結果であった。2 段階定量 RT-PCR は多数の遺伝子の発現を複数回検討できるため、この方法が細胞採取後の解析に最も有用であると考えられた。

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 7 件)

Date, A., Maeda, T., Watanabe, M., Hidaka, Y., Iwatani, Y., Takano, T. An improved protocol for mRNA quantification after fluorescence activated cell sorting with an increased signal to noise ratio in flow cytometry. Mol Biotechnol 査読有(in press)
DOI: 10.1007/s12033-014-9733-5

Takano, T. Fetal cell carcinogenesis of the thyroid: A modified theory based on recent

evidence. *Endocr J* 査読有 61: 311-320, 2014.

DOI:DN/JST.JSTAGE/endoerj/EJ13-0517

[pii]

Matsumoto, C., Ito, M., Yamada, H., Yamakawa, N., Yoshida, H., Date, A., Watanabe, M., Hidaka, Y., Iwatani, Y., Miyauchi, A., Takano, T. Genes that characterize T3-predominant Graves' thyroid tissues. *Eur J Endocrinol* 査読有 168:137-144, 2013.

DOI:10.1530/EJE-12-0507

Matsumoto, C., Ito, M., Yamada, H., Yoshida, H., Watanabe, M., Hidaka, Y., Iwatani, Y., Miyauchi, A., Takano, T. Preparation of thyroid follicular cells for mRNA quantification after fluorescence-activated cell sorting. *Scand J Clin Lab Invest* 査読有 173:245-252, 2013.

DOI:10.3109/00365513.2013.769624

Yamada, H., Yamakawa, N., Watanabe, M., Hidaka, Y., Iwatani, Y., Takano, T. Prolonged hybridization with a cRNA probe improves the signal to noise ratio for in-tube in situ hybridization for quantification of mRNA after fluorescence-activated cell sorting. *Biotech Histochem* 査読有 87: 366-371, 2012.

DOI:10.3109/10520295.2012.672650

Yamada, H., Takano, T., Kihara, M., Hirokaw,a M., Yoshida, H., Watanabe, M., Iwatani, Y., Hidaka, Y., .Miyauchi, A. Measurement of TFF3 mRNA in aspirates from thyroid nodules using mesh filtration: The first clinical trial in 130 cases. *Endocr J* 査読有 59: 621-630, 2012.

DOI:JST.JSTAGE/endoerj/EJ12-0077 [pii]

Maruo, R., Yamada, H., Watanabe, M., Hidaka, Y., Iwatani, Y., and Takano, T. mRNA quantification after fluorescence

activated cell sorting using locked nucleic Acid probes. *Mol Biotechnol* 査読有 49: 42-47, 2011.

DOI:10.1007/s12033-011-9375-9

〔学会発表〕(計5件)

Takano, T. Preoperative molecular diagnosis of thyroid nodule (Invited speaker)

Takano, T. The 2nd Asian Masterclass of Thyroid Cancer, 2013年5月25日、Soul, South Korea

高野 徹、甲状腺濾胞癌の分子診断 第53回日本臨床細胞学会総会、2012年6月2日、千葉

高野 徹、新規幹細胞解析法、FACS-mQによる甲状腺幹細胞・癌幹細胞の同定・解析 高野 徹 第54回日本甲状腺学会 2011年11月22日、大阪

高野 徹、日高 洋、岩谷 良則、新規臨床検査法、FACS-mQの開発 第58回日本臨床検査医学会学術集会 2011年11月18日、岡山

高野 徹、甲状腺腫瘍に対する穿刺吸引核酸診断法の開発 第54回日本臨床検査医学会近畿支部総会 2011年10月29日、滋賀

〔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
[http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/labo/w
ww/CRT/CRT%20Home.html](http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/labo/www/CRT/CRT%20Home.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 徹 (TAKANO, Toru)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：00263236

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：