

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：34520

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659277

研究課題名(和文)細胞形態での診断が困難な転移性腫瘍に対する血液での革新的な核酸検査法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel method to detect circulating tumor cells (CTCs) by expression of tissue specific mRNAs in peripheral blood.

研究代表者

巽 圭太 (TATSUMI, Ke-ita)

宝塚大学・看護学部・教授

研究者番号：00222109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：我が国で開発・実用化された遺伝子増幅法であるLAMP法を用いて、末梢血液中で循環している腫瘍細胞(CTC)を早期診断可能な革新的な核酸検査法の確立を目指した。RT-LAMP法で組織腺特異的なmRNAを増幅したところ、白血球で少量ながら有意に発現していることを検出できることを確認した。この結果、現在実用化されているCTC検査法が末梢血液中から選別された上皮細胞において細胞毎の蛋白発現状態で検出しているのに対し、末梢血全体での量的なmRNA発現レベルでも検出できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To detect circulating tumor cells (CTCs) by expression of tissue specific mRNAs in peripheral blood using Loop-mediated isothermal amplification method (LAMP), expression of thyroid specific genes were studied. Low level expression of mRNAs of one thyroid specific gene was detected by LAMP after reverse transcription (RT-LAMP) in total RNAs from leukocytes. Thus measuring expression levels of tissue specific mRNAs in whole peripheral blood using RT-LAMP may be able to detect CTCs in peripheral blood.

研究分野：臨床検査学

キーワード：LAMP CTC

## 1. 研究開始当初の背景

癌腫は病理学的に組織の細胞形態で確定診断されるものが多いが、甲状腺濾胞癌、下垂体癌、副腎癌のように細胞形態では異型がほとんどみられず広範浸潤や遠隔転移で初めて癌と診断されるものがある。これらのうち特に下垂体癌と副腎癌は予後が悪く、広範浸潤や遠隔転移前に早期診断可能な新しい検査診断法が求められている。

私はこれまで下垂体-甲状腺系の先天性疾患をモデルとして遺伝子検査の研究を行い (Tatsumi K et al, Nat Genet 1992 ; Fujiwara H, Tatsumi K et al, Nat Genet 1997) 我が国で開発された遺伝子増幅法である Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法に関しては、P450 CYP2C19 の遺伝子多型(SNP)判定法を企業の研究者と共同開発し製品化した (Iwasaki M, Tatsumi K et al, Genome Letters 2003) 。これらの経験を生かして、本研究を行うものである。

末梢血液中で循環している腫瘍細胞 (CTC : circulating tumor cells) を検出する本研究の先行研究としては、今世紀に入りベリデックス社が開発・実用化した、転移性乳癌、転移性前立腺癌、転移性大腸癌において治療効果判定、予後予測に欧米でのみ認可されている CellSearch System による検出系がある。CellSearch System の方法では、健常人と良性疾患患者での末梢血 7.5ml 中に癌細胞/上皮細胞が 1 個存在する人は 100 人に 1 人以下で、残り 99 人以上は 1 個未満だったと報告されている。従って、末梢血液中に上皮細胞由来の mRNA が一定以上存在すれば癌細胞が強く疑われ、更に組織特異的な転写因子などの遺伝子の発現を複数の組み合わせることにより末梢血液中の癌細胞の由来となる組織と分化レベルを判定できれば癌診断の革新的な方法となる。さらに特に、甲状腺濾胞癌、下垂体癌、副腎癌のように細胞形態では異型がほとんどみられず広範浸潤や遠隔転移で初めて癌と診断される癌腫については唯一の早期診断法となる可能性を秘めている。

末梢血リンパ球での組織特異的遺伝子の発現に関しては、下垂体ホルモンが産生されることは 1980 年代に免疫染色で報告されている。これまで末梢血液中に存在する癌細胞検出の試みは数知れずあったが、末梢血から組織特異的な遺伝子を検出するのに再現性が見られず実用化に至らなかったのは、この末梢血リンパ球での異所性発現が一因である可能性がある。末梢血リンパ球の除去が一つの重要なステップで、CellSearch System では、循環血中癌細胞が上皮細胞であることを利用して磁気ビーズにより標識された抗 EpCAM 抗体を用い循環血中癌細胞(上皮細胞)を末梢血より抽出し、これに蛍光標識された抗サイトケラチン抗体と抗 CD45 抗体の 2 重免疫染色により循環血中癌細胞(上皮細胞)

とリンパ球を判別し、同時に DAPI を用いて有核かどうかを判別する。これらの反応から検出系を自動化して再現性を良くした CellSearch System は前処理部分 (autoprep) と解析部分 (analyzer) とを合わせたシステムの定価が 4200 万円と高額で、国内には 1 システムが検査会社に納入されているだけで、そこで行われている受託検査は一検体 8 万円と高額である。

それに対し、本法では解析部分 (増幅検出系) は等温増幅蛍光測定装置 (定価 200 万円以下) で行え、解析部分は実用的な価格である。将来、実用化するには本研究の成果を元に mRNA 抽出までの検体処理を自動的に行う装置の開発を行うか、循環血漿中の RNA で検出することになるが、CellSearch System の数分の 1 のコストで実用化できれば医療保険財政への負担は限られたものになる。

LAMP 法は我が国で開発・実用化された遺伝子増幅法で PCR より簡便・迅速ながら増幅効率は比肩する。LAMP 法は 4 ないし 6 箇所の塩基配列を認識するので 2 箇所の PCR 法に比べて非特異的な増幅によるバックグラウンドが低いことも利点である。逆転写後 LAMP (RT-LAMP) 法はその発展系で、逆転写酵素を添加することにより 1 つの tube 内で RNA から逆転写、遺伝子増幅までを 1 ステップで行いリアルタイムに定量する。これらの方法により増幅に最も適したプライマーが得られれば検体に 10 コピーの mRNA を 30 から 60 分間で高感度に検出できる。このような高感度で迅速な測定系の存在を前提とすると、組織特異的な転写因子などの従来の測定系では測定感度が不十分であったり腫瘍が悪性かの鑑別診断に役立つとは思われていなかったために計測されていなかった遺伝子の発現レベルが解析可能となるものと考えられる。

## 2. 研究の目的

甲状腺濾胞癌では広範浸潤や遠隔転移で初めて癌と診断されることが多い。本研究では甲状腺濾胞癌をモデルに血液検査で早期診断可能な革新的な核酸検査法の確立を目指す。そのため、甲状腺細胞特異的な mRNA の高感度検出法を開発し、発生頻度が甲状腺濾胞癌の 20 倍頻度が高い甲状腺乳頭癌、甲状腺良性腫瘍、甲状腺腫大、正常甲状腺で有用性を検証する。

対象とする遺伝子としては、甲状腺特異的な転写因子 TTF1 など低発現だが組織特異的な転写因子を中心に解析する。また、組織検体で微量の遺伝子発現を検出する方法の基礎技術も並行して開発する。本研究の成果が末梢循環腫瘍細胞の検出系や末梢循環細胞外核酸の検出系の実用化に繋がると期待する。

### 3. 研究の方法

本研究では、甲状腺濾胞癌をモデルとして、細胞形態では異型がほとんどみられず広範浸潤や遠隔転移で初めて診断される癌の早期診断法の基礎技術を開発する。

(1) 甲状腺特異的に高レベルで発現する遺伝子の抽出

RT-LAMP 法用の高効率増幅系の開発の為に、既にある遺伝子発現データベースで組織特異的遺伝子の発現レベルを調べ、白血球など甲状腺以外の組織に比べ甲状腺で特異的に高レベルで発現する遺伝子を抽出する。

(2) RT-LAMP 法用の高効率増幅系の開発

このような遺伝子の発現を高感度で検出する逆転写後 LAMP (RT-LAMP) 法を開発し、末梢血液と甲状腺での検出レベルを検証する。

(3) in situ RT-LAMP 法の開発

末梢血より抽出した上皮細胞成分や末梢血白血球で微量の遺伝子発現を高感度に検出するために新たな in situ RT-LAMP 法の技術開発を行い、サイトスピンで作成した細胞の単層標本を in situ RT-LAMP 法で評価して細胞様態を明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) 甲状腺特異的に高レベルで発現する遺伝子の抽出

甲状腺特異的に高レベルで発現する遺伝子を抽出するために、expressed sequence tag(EST)のデータベースを活用した。

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer>)

甲状腺で EST 数 100 万中 500 以上検出された高レベルで発現する EST・遺伝子から、甲状腺特異的な EST・遺伝子を血液で EST 数 100 万中検出された数との比(血液/甲状腺 比)を取り、血液/甲状腺 比が低い代表的な遺伝子は以下であった。

・サイログロブリン (Tg)

EST counts 33,982 比 0.00024

・PAX8

EST counts 2,168 比 0

・甲状腺ペルオキシダーゼ(TPO)

EST counts 579 比 0.01382

(2) RT-LAMP 法用の高効率増幅系の開発

前項の結果より、甲状腺特異的に高レベルで発現する遺伝子として、ヒトのサイログロブリン (Tg) 遺伝子から解析を開始することとした。アクチン (ACTB) 遺伝子と TSH 受容体 (TSHR) 遺伝子を対照として、RT-LAMP 法用のプライマーの設計を行い、検証用 cDNA を用いて RT-LAMP 法での高効率増幅系の技術開発を行った。

ヒトの Tg mRNA、TSHR mRNA と ACTB mRNA について、各々 2 箇所、1 箇所、1 箇所を FIP、BIP、F3、B3 の 4 本セットの LAMP 法用のプライマーの設計・合成を行った。これらをヒト甲状腺 total RNA を用いて RT-LAMP 法を行

ったところ、0.25  $\mu$ g では 9-15 分で増幅が検出された。同量のヒト白血球 total RNA を用いたところ、ACTB mRNA はヒト甲状腺 total RNA と同程度の増幅を認め、TSHR mRNA では 30 分間では十分な増幅を認めなかったが Tg mRNA 2 箇所では増幅を認めた。Tg mRNA 2 箇所とも増幅時間が倍で、ヒト白血球中の微量の mRNA の検出が可能であることを確認した。(図 1,2)

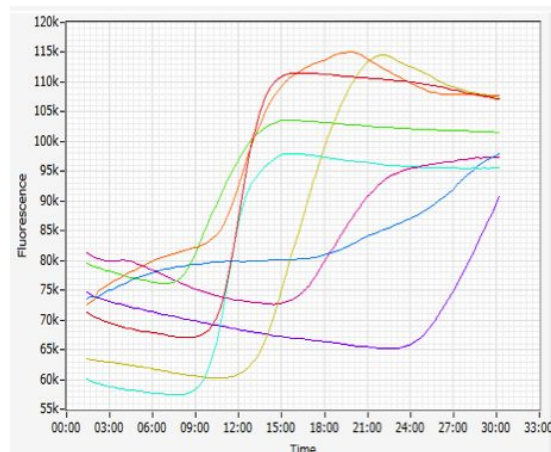


図 1 Tg,ACTB,TSHR mRNA の増幅曲線

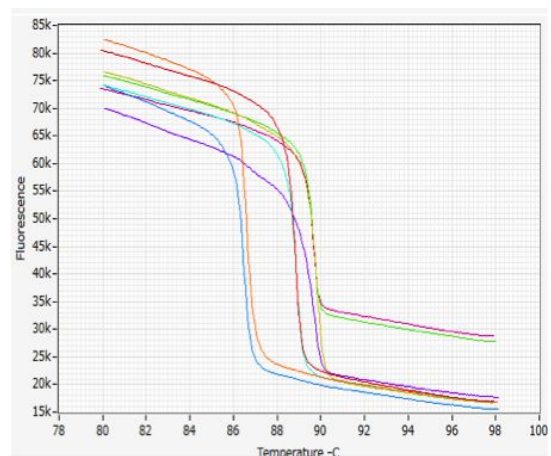


図 2 Tg,ACTB,TSHR mRNA の anneal 曲線

検出感度では、甲状腺 total RNA では、概ね 10,000 希釈までは検出可能、1,000,000 希釈から検出困難で、半定量性を確認した。

以上のように、Tg mRNA については白血球に少量ながら有意に発現していることを確認したので、少なくとも Tg mRNA については当初計画していた細胞毎に遺伝子発現の有無を調べる方法の他、末梢血全体での量的な mRNA 発現レベルでも検出できる可能性が示唆された。

現在実用化されている CTC 検査法が末梢血液中から選別された上皮細胞において細胞毎の蛋白発現状態で検出しているのに対し、本研究の結果、末梢血全体での量的

な mRNA 発現レベルでも検出できる可能性が示唆された。

ただ、同時に末梢血全体で量的な mRNA 発現レベルで区別できる遺伝子は、例えば CTC が 1ml に 10 個であれば、総計が 1ml に存在する白血球 3,000,000 個以上に非特異発現と区別出来ることが必要なので、CTC/白血球 発現比が 300,000 以上必要である。このような発現に差のある遺伝子は EST データベースでの解析結果からは極めて少ない。

今後は、他の遺伝子についても、まず RT-LAMP 法で量的な遺伝子発現レベルの比較方法を確立し、この RT-LAMP 法が増幅産物を反応容器から出さない系で、増幅産物が増幅前の鑄型を初めとする反応系に混入するコンタミネーションの心配が無い系であるので、量的な遺伝子発現レベルで症例間で循環腫瘍細胞に付き比較検討していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Nishiike S, Tatsumi K, Shikina T, Masumura C, Inohara H. Thyroid-stimulating hormone-secreting ectopic pituitary adenoma of the nasopharynx. *Auris Nasus Larynx* 2014; 41:586-588
2. Uebi T, Itoh Y, Hatano O, Kumagai A, Sanosaka M, Sasaki T, Sasagawa S, Doi J, Tatsumi K, Mitamura K, Morii E, Aozasa K, Kawamura T, Okumura M, Nakae J, Takikawa H, Fukusato T, Koura M, Nish M, Hamsten A, Silveira A, Bertorello AM, Kitagawa K, Nagaoka Y, Kawahara H, Tomonaga T, Naka T, Ikegawa S, Tsumaki N, Matsuda J, Takemori H. Involvement of SIK3 in glucose and lipid homeostasis in mice. *PLoS One* 2012; 7:e37803
3. Isojima T, Shimatsu A, Yokoya S, Chihara K, Tanaka T, Hizuka N, Teramoto A, Tatsumi K, Tachibana K, Katsumata N, Horikawa R. Standardized centile curves and reference intervals of serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) levels in a normal Japanese population using the LMS method. *Endocr J* 2012; 59:771-780
4. Morita M, Watanabe M, Inoue N, Inaoka C, Akamizu T, Tatsumi K, Hidaka Y, Iwatani Y. Functional polymorphisms in TBX21 and HLX are associated with development and prognosis of Graves' disease. *Autoimmunity* 2012; 45:129-136
5. 島津 章, 磯島 豪, 横谷 進, 千原 和夫, 田中 敏章, 肥塚 直美, 寺本 明, 巽 圭太, 立花 克彦, 勝又 規行, 堀川 玲子,

公益財団法人成長科学協会専門委員会.  
全年齢にわたる日本人の血中インスリン様成長因子-1(IGF-1)濃度の基準範囲. *臨床病理* 2012; 60:90

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 鶴田 絵里子, 高坂 和芳, 和田 浩志, 永野 浩昭, 光山 俊行, 津田 雅庸, 高野 徹, 下村 伊一郎, 日高 洋, 巽 圭太. PTU 投与後劇症肝炎を生じ当院で肝移植を施行された 1 例と早期発見のための肝機能検査についての検討. 日本甲状腺学会 2012

〔図書〕(計 2 件)

1. その他の甲状腺中毒症. 巽 圭太: 代謝・内分泌疾患診療最新ガイドライン; (編著: 門脇 孝, 下村 伊一郎) p.222-225, 総合医学社, 東京, 2012
2. 高プロラクチン血症(プロラクチノーマを除く). 巽 圭太: 下垂体疾患診療マニュアル; (編著: 平田 結喜緒, 成瀬 光栄, 山田 正三) p.141-142, 診断と治療社, 東京, 2012

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

巽 圭太 (TATSUMI, Ke-ita)  
宝塚大学・看護学部・教授  
研究者番号: 00222109