

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460676

研究課題名(和文)新規臨床検査法、FACS-mQの開発

研究課題名(英文) Establishment of the protocol for mRNA quantification after FACS.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：組織中に少数存在する細胞をその蛋白・遺伝子発現を指標として効率よく分離し、性質を迅速に同定する方法としてFACS-mQのプロトコルの改良に取り組み、固定液にメタノール/PEGの混合物を使用すること、dithiothreitol(DTT)、RNase Inhibitorを適切なタイミングと濃度で使用することにより、検体を-80℃で長期保存することを可能とし、またFACSでの分離後も高品質のRNAの回収を可能とした。この改良法によりT7増幅、Ribo-SPIA増幅等の使用が可能となり、少量の細胞からでも遺伝子発現プロファイルの解析ができるようになった。

研究成果の概要(英文)：In our previous studies, we established a method to analyze cells collected by fluorescence-activated cell sorting (FACS), named mRNA quantification after FACS (FACS-mQ). In FACS-mQ, cells are labeled with a fluorescence dyes, and then cells sorted by FACS are examined by analyzing their gene expression profile. Using the previous FACS-mQ protocol, it was not possible to apply some methods, such as amplification of RNAs using T7 promoter, due to RNA degradation. In this study, we tried to modify the FACS-mQ protocol to prevent RNA degradation during FACS. Addition of RNase inhibitor and DTT to some buffers used in FACS-mQ resulted in a high RNA integrity number after FACS. Furthermore, no significant differences in the images of flow cytometry were observed between specimens with or without RNase inhibitor and DTT. Thus, this modification to the FACS-mQ protocol assured the quality of RNAs in cells recovered by FACS.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：Flow cytometry 癌幹細胞

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ィールを解析する、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ィー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。当研究では臨床現場で 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) 細胞株を使ったトライアル

過去の検討で完成したプロトコルを使用して、目的の細胞分画を採取した後、それらの細胞に発現している mRNA の定量解析が可能かどうか検討した。

(2) RNA 増幅の検討

FACS-mQ を臨床現場で使用するためには、きわめて少数の細胞から採取された mRNA を解析することが必要であり、従って、抽出された RNA を増幅することが必要である。過去のプロトコルで FACS-mQ を実施し、細胞から採取された RNA の安定性を評価し、T7 増幅法等が可能かどうか検討した。

(3) FACS-mQ の過程において RNA の分解を抑えるプロトコルの検討

過去の FACS-mQ のプロトコルでは、検体保存や蛍光染色の過程で、RNA の部分的な分解が起こっていた。これを防止する方法について検討した。

3. 研究の方法

(1) 細胞株を使ったトライアル

甲状腺細胞株 FRTL-5 を使用して、甲状腺特異的蛋白、サイログロブリン(TG)を高発現・低発現している細胞分画を採取し、FACS-mQにて遺伝子発現プロフィールを解析した。また培養条件や増殖の程度との相関を調べた。

(2) RNA 増幅の検討

2-メルカプトエタノール(2-ME)やdithiothreitol(DTT), パラフォルムアルデヒド等を保存液に加えることで、RNAの分解が抑えられるかどうか検討した。また少数の細胞を採取して複数の方法で解析し、どの方法でRNAを増幅・定量するのが好ましいか検討した。

(3) FACS-mQの過程においてRNAの分解を抑えるプロトコールの検討

過去のFACS-mQのプロトコールでは、検体保存や蛍光染色の過程で、RNAの部分的な分解が起こっていた。細胞を凍結保存する時、抗体と反応させる時、FACSにかける前の溶液にDTTとRNase Inhibitorを加えることでRNAの分解を防げるかどうか検討した。

4. 研究成果

(1) 細胞株を使ったトライアル

甲状腺細胞株 FRTL-5 を使用して、甲状腺特異的蛋白 TG と TTF-1 の 2 重蛍光染色を行い、TG 蛋白を高発現・低発現している細胞分画を採取し、RNA を抽出し RT-PCR にて解析した。その結果、予想通りに TG 蛋白を高発現している分画で TG mRNA が増加していることが確認できた。また幹細胞マーカーである ABCG2, GATA4 は TG 低発現の分画で発現が増加していた。また Ki-67 による染色では TG 低発現の分画で増殖が減量していることが示唆された。増殖が活発な分画では TG の発現が亢進し、幹細胞マーカーの発現が減少していることがわかった。

(2) RNA 増幅の検討

蛍光標識終了後の細胞は 40mMDTT を加えた溶液中で RT-PCR による定量解析の結果の変動をきたすことなく 4℃ で少なくとも 48 時間は保存可能であり、FACS 後の回収率も良好であった。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)、T7 増幅法の 4 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、T7 増幅法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。ただし、T7 増幅法では一部の遺伝子は増幅できず、FACS-mQ によって RNA が部分分解を受けている可能性が示唆された。電気泳動にて RIN 値を定量した結果、予想通り、RNA の断片化が起こっていることが分かった。

(3) FACS-mQ の過程において RNA の分解を抑えるプロトコールの検討

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 を加えた。細胞の凍結保存後、蛍光免疫染色後、FACS での回収後に RNA を抽出し、電気泳動像を解析した。その結果、DTT と RNase inhibitor を加えた検体では 28S, 18S のバンドがはっきりと確認でき、RIN 値も 4 以上を維持していた。DTT と RNase inhibitor を加えても、flow cytometry の像に変化を認めなかった。DTT と RNase inhibitor を加えた検体から抽出した RNA は T7 増幅にて良好な増幅を示した。これらの結果からこのプロトコールの改良によって臨床検体等、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 FCS-mQ を実施することが可能となったと考えている。

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 10 件)

Takano, T. Natural history of thyroid cancer. Endocr J 査読有 64: 237-244, 2017. DOI: 10.1507/endocrj.EJ17-0026

Yasuda, K., Miyoshi, Y., Tachibana, M., Namba, N., Miki, K., Nakata, Y., Takano, T., Ozono, K. Relationship between dose of antithyroid drugs and adverse events in pediatric patients with Graves' disease. Clin Pediatr Endocrinol 査読有 26: 1-7, 2017. DOI: 10.1297/cpe.26.1

Maeda, T., Date, A., Watanabe, M., Hidaka, Y., Iwatani, Y., Takano, T. Optimization of recovery and analysis of RNA in sorted cells in mRNA quantification after fluorescence-activated cell sorting. Ann Clin Lab Science 査読有 46: 571-577, 2016.

Kakudo, K., Kameyama, K. and Takano, T. Indeterminate thyroid cytology. J Basic Clin Med 査読有 4: 40-41, 2015.

Takano, T. Molecular classification of thyroid tumor: A proposal based on fetal cell carcinogenesis hypothesis. J Basic Clin Med 査読有 4: 81-86, 2015.

Kakudo, K., Kameyama, K. and Takano, T. Thyroid fine needle aspiration cytology: Current and future proposal of a new diagnostic system for reporting thyroid cytology. J Basic Clin Med 査読有 4: 110-114, 2015.

Shimasue, A., Maeda, T., Watanabe, M., Hidaka, Y., Iwatani, Y., Takano, T. Expression analysis of stemness genes in a rat thyroid cell line FRTL5. Exp Clin Endocrinol Diabetes 査読有 123: 48-54,

2015. DIO: 10.1055/s-0034-1389924

Takano, T. The basic theory of fetal cell carcinogenesis of the thyroid. J Basic Clin Med 査読有 3: 6-11, 2014.

Takano, T. Fetal cell carcinogenesis of the thyroid: A modified theory based on recent evidence [My Opinion]. Endocr J 査読有 61: 311-320, 2014. DOI: 10.1507/endocrj.EJ13-0517

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 56: 591-598, 2014. DOI: 10.1007/s12033-014-9733-5

[学会発表](計 7 件)

高野 徹

芽細胞発癌：日本から、甲状腺から始まった癌診療の大転換(特別講演)
第 28 回 日本内分泌外科学会総会
2016 年 5 月 26 日 横浜

高野 徹

芽細胞発癌説で見た甲状腺癌 発生母地による腫瘍の新たな分類(シンポジウム)
第 54 回 日本臨床細胞学会秋期大会
2015 年 11 月 22 日 名古屋市

高野 徹

新規胎児性細胞解析法, FACS-mQ による甲状腺胎児性細胞の同定と甲状腺疾患の病態解析(コスミック研究創成賞受賞講演)

第 58 回 日本甲状腺学会学術集会
2015 年 11 月 6 日 福島市

Takano, T.

Fetal cell carcinogenesis of the thyroid (Symposium: Invited speaker).
2015 Annual Autumn Meeting of Korean

Endocrine Society
October 30, 2015. Busan, Korea

高野 徹

新規胎児性細胞解析法, FACS-mQ による
甲状腺胎児性細胞の同定と甲状腺疾患の
病態解析 (コスミック研究創成賞候補者
講演)

第 57 回 日本甲状腺学会学術集会
2014 年 11 月 14 日大阪

Takano, T.

Fetal cell carcinogenesis: present status and
future prospect (Symposium: Invited
speaker).

The 21st International Symposium on
Molecular Thyroidology

Nov 13, 2014. Osaka, Japan

高野 徹

基礎からわかる芽細胞発癌 (シンポジウ
ム)

第 18 回内分泌病理学会
2014 年 11 月 2 日 東京

〔図書〕(計 1 件)

Takano, T.

Pitfalls in molecular-based diagnosis using
thyroid aspirates. *In* Kakudo, K., Liu, Z.,
Hirokawa, M. (eds): Thyroid FNA cytology:
Differential diagnoses & pitfalls. Himeji,
Japan, Kakudo Medical Education,
pp.237-242, 2016.

〔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 :