

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	土岐 康通
<p>学位論文題目</p> <p>肝がん患者血清エキソソーム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</p> <p>北海道医学雑誌 第90巻第1号 平成27年5月 掲載予定</p> <p>研究目的</p> <p>ヒト・ゲノムではアミノ酸をコードするエクソンが非コード領域のイントロンによって分断されている。成熟型mRNAが構成されるために、mRNA前駆体からイントロンを除去するスプライシング機構が存在する。そのため、一つの遺伝子からスプライシング様式の異なる複数のmRNAを生成し、機能や局在性が異なる複数の蛋白質を合成することができる。近年、がん細胞でこの選択的RNA スプライシングに異常がおこり、機能不全あるいは、活性亢進した蛋白質が産生されることが報告され、がん細胞の発育・進展に関与するのではないかと注目されている。</p> <p>本研究では、肝細胞で産生され、鉄代謝を制御する分子であるヘプシジンに着目した。このヘプシジンは3つのエクソンから構成されたHAMP遺伝子に由来する[1]。2009年、教室のHosokiらは、各種肝がん細胞株を用い、ヘプシジンmRNA発現量をRT-PCR法で解析したところ、その発現が細胞株で大きく異なることを報告した。一方、肝細胞がん患者(以下HCC)の肝生検・手術組織において、ヘプシジンmRNAレベルが低下していることが報告されている。これらの報告はHCCで、HAMP遺伝子が転写される過程で、何らかの異常が起きることを示唆している。</p> <p>今回、各種肝がん細胞株を用い、ヘプシジンmRNA発現を解析する過程で、肝がん細胞株HLFに、より低分子のmRNAが存在し、HAMP geneのエクソン2に相当する60塩基を欠失したtruncated formであることを見出した。そこで、本研究では、肝がん細胞株でこの選択的スプライシングの生成が広く起こる現象なのか否かを検討することとした。次に、この現象がHCC患者血清中で検出できるか否か、血清からエキソソームを抽出し、digital PCRをベースとして新たに開発した二段階増幅法でコピー数を定量、その臨床的意義も検討することとした。</p> <p>材料・方法</p> <p>1. 細胞株 肝がん細胞株であるHepG2, Hep3B, HuH7, HLE, HLF, WRL68, SK-HEP-1 を用いた。</p> <p>2. 細胞質RNA抽出 各種細胞株5×10^6個からReliaPrep™ RNA cell miniprep system(Promega, Madison, WI)を用いて細胞内のtotal RNAを抽出した。RNA濃度の算出にはNanoDrop分光光度計を使用した。</p>			

した。

3. cDNA合成とポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)

Total RNA 1 μ gを用いて、PrimeScript RT-PCR Kit(タカラバイオ)を使用し、cDNAを作成し、ヒト・ヘプシジンmRNA上の開始コドンから終止コドンの255塩基をカバーするプライマー・セットでPCRを施行した。2%アガロースゲルを用いた電気泳動を行い、泳動後のゲルをSYBR Green I で染色した。

4. シーケンシング

電気泳動後のPCR産物をアガロースゲルから切り出し、Geneclean® キット(MP-Biomedicals, Santa Ana, CA)を用いて精製し、pGEM®-T Easy クローニング・ベクター(Promega)に回収した。BigDye® terminator v3.1サイクル・シーケンス・キット(Applied Biosystems, Foster City, CA)およびpUC/M13フォワード・シーケンス・プライマー、pUC/M13リバース・シーケンス・プライマーを用いて二重鎖DNAのセンス鎖、アンチセンス鎖をそれぞれ増幅した後、自動シーケンサー 3500Genetic Analyzer(Applied Biosystems)で塩基配列を解読した。

5. 対象患者および血清分離

旭川医科大学倫理委員会の承認の後、インフォームド・コンセントを取得したHCC患者群20例、慢性肝疾患患者17例、そのうちHCC既往歴が有る患者群7例、HCC既往歴の無い患者群10例、健常人のボランティア群30例の4群に分けた。末梢血を採取し、1,750 \times g, 10分間、4°Cで遠心処理した。分離した血清は-30°Cで保存した。

6. 血清エクソソーム分離およびエクソソームRNA抽出

血清1 mlからTotal Exosome Isolation(from serum)(Invitrogen®, Thermo Scientific)を用いてエクソソームを回収し、次に、Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit(Invitrogen®, Thermo Scientific)を用いてRNAを抽出した。

7. mRNAの絶対定量法

PrimeScript cDNA synthesize Kit(タカラバイオ)を用いてcDNAを作成した。野生型および変異型ヘプシジンmRNAを増幅するため、それぞれのプライマーを作製し、PCR増幅を行った。次に、PCR増幅後の反応液3 μ lと上記のプライマー・セットに加え、特異的プローブを追加しQuantStudio™ 3D Digital PCR System(Applied Biosystems®)にアプライした。

8. 統計学的解析

多重比較検定にはDunnnettテストを採用し、 $p < 0.05$ をもって統計学的有意差有りとは判断した。二群間の相関係数はPearson積率相関関係で表記した。

成 績

1. 変異型ヘプシジンmRNAの同定

ヒト肝がん細胞株でヘプシジンmRNA発現を検出するためにRT-PCR・アガロース電気泳動を実施したところ、Hep3Bを除いた6種類の細胞株、HepG2, HuH7, HLE, HLF, WRL68, SK-HEP-1で255 bpに相当するバンドを検出した。このバンドの塩基配列は、野生型ヘプシジンに一致した。一方、HLF細胞株では、255 bpのバンドに加えて、よりサイズの小さいバンドが検出された。このバンドは、HAMP geneのエクソン2が欠失した変異型ヘプシジンmRNAの増幅産物であった。

2. 高感度検出方法を用いた変異型ヘプシジンmRNAの発現定量

肝がん細胞株HLF以外の細胞株でもこの変異型mRNAが、微量でも出現している可能性を考え、高感度で特異性の高いTaqManプローブを用いたQuantStudio 3D digital PCR systemを採用した。その結果、変異型ヘプシジンmRNAは、Hep3Bを除いた6種類の細胞株、HepG2, HuH7, HLE, HLF, WRL68およびSK-HEP-1で検出された。一方、野生型ヘプシジンmRNAは全細胞株で陽性であった。

3. HCC患者血清エクソソームを用いた変異型ヘプシジンmRNAの検出

抽出した血清エクソソームRNAを、上記結果2で示した高感度検出方法を用いてヘプシジンmRNAの検出を試みたが、検出することができなかった。そこで、標的mRNAを事前に増幅し、QuantStudio 3D digital PCR systemによって定量する、新たな2段階PCR増幅システムを構築した。その結果、血清エクソソームRNA中のヘプシジン

mRNAを捉えることができた。

HCC患者20例，慢性肝疾患患者17例，うちHCC既往歴が有る患者7例，HCC既往歴の無い患者10例，健常人のボランティア30例の4群に分けた．変異型ヘプシジンmRNAの発現量の平均値はそれぞれ1212.4 copies/ μ l，200.4 copies/ μ l，1.9 copies/ μ lおよび2.0 copies/ μ lであった．HCC患者群とHCC既往歴の無い慢性肝疾患患者群，および健常人群との間に，統計学的有意差を認めた．一方，上記4群の野生型ヘプシジンmRNAの発現量はそれぞれ4.4 copies/ μ l，8.9 copies/ μ l，7.1 copies/ μ lおよび14.5 copies/ μ lであり，各々の群間における有意差は認めなかった．

4. 血清AFPおよび血清PIVKA-IIとの相関

HCC患者群において，変異型ヘプシジンmRNA量と血清AFP値 および血清PIVKA-II値との間の相関はそれぞれ $r=0.39$ および $r=0.19$ と，いずれも高い相関は示さなかった．

考 案

本研究では，肝がん細胞株で鉄代謝制御の中心的分子であるヘプシジンをコードする遺伝子 *HAMP* が成熟したmRNAとなる過程で選択的スプライシング異常が起きること，この変異が血清エクソソームで確認できることを初めて明らかにした．

今回，見出した *HAMP* gene のエクソン2を欠失した変異型ヘプシジンmRNAは6種類の肝がん細胞株で検出された．このことは，肝がんでこのヘプシジンの選択的スプライシング・バリエーションが広く起こる現象であることを強く示唆するものである．

近年，がん細胞では，特異的なlose of function や dominant negative inhibitorsとして機能するmRNAの選択的スプライシングが注目されており，一般的に，この現象は癌細胞に有利な状況を形成させる方向に働いている[2]．さらに，このスプライシング・バリエーションが，ヘプシジンという鉄代謝を制御する中心的分子のそれであることを考慮に入れると，この変異型ヘプシジンmRNAが，鉄代謝制御のバランスを崩し，HCCなどを含めた癌の発生と増悪に関与する可能性があり，今後の検討が期待される．

次に，この現象がHCC患者で検出できるか否かを検討するため，digital PCRをベースとした二段階増幅法を新たに開発した．これまで，RNAを検出するための材料の多くは侵襲性の高い生検材料に依存するところが多かった．そこで，非侵襲的でかつ日常診療で収集可能な血清，特にエクソソームに注目した．エクソソームは各種細胞から分泌され，標的とする細胞間との情報伝達機能を担っていることが示唆されており，エクソソーム中に包含される物質は分泌する細胞の特徴を表わすものと考えられる[3]．そこで，HCC患者血清中エクソソームを用いた変異型ヘプシジンmRNAの検出および有用性について検討することとした．本研究で採用した2段階PCR増幅・検出システムを用いることで，血清エクソソーム中にヘプシジンmRNAの野生型および変異型のスプライシング・バリエーションを検出することに成功した．そこで，HCC患者，慢性肝疾患患者および健常人の血清エクソソーム中の野生型および変異型ヘプシジンmRNAの発現を比較検討した．その結果，HCC既往歴の無い慢性肝疾患群および健常人群と比較してHCC患者群で有意に高値を示した．一方で，HCC患者群の変異型ヘプシジンmRNAと腫瘍マーカーとして用いたAFPおよびPIVKA-IIとの間で強い相関を示さなかったことから，変異型ヘプシジンmRNAは，HCC診断の独立したマーカーとしての可能性が示された．今回は，ヘプシジンの主たる産生細胞が肝細胞であることから，HCCに絞ったが，今後，他の悪性腫瘍における異常型ヘプシジンmRNAの発現の有無，HCC患者の治療経過に伴う異常型ヘプシジンmRNAの変化など，詳細な検討を進めていく必要がある．

結 論

肝がん細胞株およびHCC患者血清エクソソーム中にヘプシジンmRNAの異常型スプライシング・バリエーションが存在すること明らかにした．このエクソソームを用いた異常型ヘプシジンmRNAの定量は非侵襲的液体生検による肝がんの新しいバイオマーカーとしての開発が期待される．




引 用 文 献

- 1 . Krause A, Neitz S, Mägert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, Adermann K. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. FEBS Lett 2000; 480: 147-150.
- 2 . Berasain C, Goñi S, Castillo J, Latasa MU, Prieto J, Avila MA. Impairment of pre-mRNA splicing in liver disease: mechanisms and consequences. World J Gastroenterol 2010; 16: 3091-3102.
- 3 . Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and micro RNA is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol 2007; 9: 654-659.

参 考 论 文

- 1 . Satoshi I, Katsuya I, Daisuke K, Kotoe S, Noriyasu N, Hiroki T, Lynda A, Yasumichi T, Mayumi H, Junko I, Motohiro S, Katsunori S, Naomi I, Mikihiro F, Yoshihiro T, Yutaka K. Non-transferrin-bound iron assay system utilizing a conventional automated analyzer. Clinica Chimica Acta 2014; 437: 129-135.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	土岐 康通
審査委員長 <u>若宮 伸隆</u> 			
審査委員 <u>吉川 博之</u> 			
審査委員 <u>藤井 聡</u> 			
学 位 論 文 題 目			
肝がん患者血清エクソソーム中に同定したヘプシジン mRNA の選択的 スプライシング・バリエントに関する研究			
<p>ヒトゲノムでは、アミノ酸をコードする、エクソンと非エクソン部分であるイントロンがあり、成熟型 mRNA は、イントロンから構成される。しかし、一つの遺伝子から、成熟型 mRNA とは、異なるパターンのスプライシングが起こり、複数の mRNA が産生され、その結果、複数のタンパク質が合成されるメカニズムが明らかになっている。近年、がん細胞やがん組織で、この選択的なスプライシングの異常により、異常たんぱく質が産生される報告がなされ、がん発生にこの選択的スプライシングが関与する可能性が注目されている。</p> <p>申請者の所属する研究室の Hosoki らは、肝細胞で合成される鉄代謝を制御するヘプシジンに着目し、複数の肝がん細胞株で、ヘプシジン mRNA を定量し、その発現が大きく異なることを報告している。また、別のグループから、肝がん組織で、ヘプシジン mRNA が低下する報告もされている。</p> <p>今回、申請者は、各種肝がん細胞や肝がん患者血清において、ヘプシジン mRNA を解析し、ヘプシジン mRNA の選択的スプライシングについての研究を行った。方法としては、各種肝細胞がん細胞株で、ヘプシジン mRNA を解析し、mRNA の発現定量を行った。次に、肝がん患者血清において、ヘプシジン mRNA の正常解析を行い、さらに、野生型 mRNA と異常 mRNA の定量により、肝がん患者、慢性肝疾患患者、健常ボランティアの間で、これらの比較検討を行った。最後に、現在、肝がんマ-</p>			

カーと考えられている、血清 AFP、PIVKA-II と変異型ヘプシジン mRNA との間に、相関性があるか否かを解析した。

結果としては、肝がん細胞で、*HAMP* 遺伝子エクソン 2 が欠損した、変異型ヘプシジン mRNA の存在することを初めて明らかにした。この変異型 mRNA は、1 つの例外を除き、すべての肝がん細胞株でその存在が認められた。また、実際のヒト血清においても、高感度測定系を樹立し、血清エキソソーム RNA 中に、このヘプシジン mRNA を検出できた。また、肝がん患者、慢性肝疾患患者、健常人の比較では、変異型ヘプシジン mRNA は、1212.4 copy/ μ l, 200.4 copy/ μ l, 1.9 copy/ μ l と有意にがん患者に、変異ヘプシジン mRNA の高値を検出した。しかしながら、従来の肝がんマーカーである血清 AFP と PIVKA-II とは、変異型ヘプシジン mRNA は、高い相関性を示さなかった。

以上のことから、肝がん細胞株で、鉄代謝制御に関与するヘプシジンの成熟型でない変異型の mRNA を検出し、肝がん患者血清中にも、同じ変異型ヘプシジン mRNA が存在することを明らかにした。この結果は、肝がん組織においても、肝がん細胞株の細胞レベルと同じように、ヘプシジンの選択的スプライシングが起こることを示し、変異型ヘプシジン mRNA が、鉄代謝制御のバランスを乱し、癌の発生と増悪に関与する可能性を明らかにした。さらに、この変異型ヘプシジン mRNA が、肝がん患者血清では、慢性肝疾患よりも有意に高値である実験結果は、変異型ヘプシジン mRNA が、肝がんの新しいマーカーになり得ることを示した。

本研究は、肝がん細胞株および肝がん患者血清エキソソーム中に、ヘプシジン mRNA 異常スプライシング・バリエントが存在することを明らかにしたものである。このエキソソームを用いた異常型ヘプシジン mRNA の定量は、非侵襲性肝がん生検として、新しいバイオマーカーの開発に役立つ可能性があり臨床的にも意義深いと考えられた。

また、論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。

以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。