

学位論文

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・バリエーションに関する研究

旭川医科大学大学院医学系研究科博士課程医学専攻

土岐 康通

博士学位論文

表題：

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・バリエーションに関する研究

短縮題名：ヘプシジン選択的スプライシングバリエーション

著者：土岐 康通

所属機関：

旭川医科大学内科学講座 消化器・血液腫瘍制御内科学分野

主任教授：高後 裕

原稿総頁数：17

図および表の総数：7

連絡者氏名宛先：旭川市緑が丘東 2 条 1 丁目 1-1 旭川医科大学内科
学講座 消化器・血液腫瘍制御内科学分野 土岐 康通

電話番号：0166-68-2462

FAX：0166-68-2469

E-mail：toki@asahikawa-med.ac.jp

緒言

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おり，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 [1]．更に，ある特定のエクソンを除去する選択的スプライシング機構が存在し，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 [2][3]．この選択的スプライシングは細胞の種類や発生段階の違いにより，そこで必要とする機能を有した蛋白質を翻訳するための mRNA を産生する機構と考えられている [4-6]．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，機能不全のタンパク質，あるいは，必要以上に活性亢進したタンパク質が産生されることが報告されるようになり，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 [7-10]．

本研究では，肝細胞で産生され，鉄代謝を制御する中心的分子であるヘプシジンに着目した．生体内の鉄が欠乏すると，肝臓でのヘプシジン産生が低下し消化管での鉄吸収の増加と網内系鉄再利用の亢進が起こり，反対に鉄が増加するとヘプシジン産生が上昇し消化管からの鉄吸収の低下と網内系細胞における老廃赤血球からの鉄の再利用が抑制される [11-13]．このヘプシジンをコードする遺伝子は *HAMP* とよばれ，三つのエクソンから構成され，スプライシングによりイントロンが除去され，成熟した mRNA となる [14][15]．2009 年，教室の Hosoki ら [16] は，各種肝がん細胞株を用い，成熟 mRNA に対するプローブを用いてヘプシジン 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，肝細胞がん患者における解析では，2008 年に Kijima ら [17]，2009 年に Tseng ら [18] は，手術除去腫瘍部位でヘプシジン mRNA の発現が低下していることを，同年 Elmonem ら [19] は，肝臓生検サンプルのヘプシジン mRNA レベルが低下していることを報告した．これらの報告は肝細胞がんで，*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．

今回、各種肝がん細胞株を用い、ヘプシジン mRNA 発現を解析している過程で、そのうちの一つの細胞株 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。これまでに、肝がんでは *ENPP7* や *BHMT* 遺伝子の異常な選択的スプライシングにより loss or reduction of function が報告されている [20][21] が、肝がんとヘプシジン mRNA のスプライシング・バリエーションとの関係についての報告はない。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。しかし、肝がん細胞でのスプライシング・バリエーションの検出には従来の定量的 PCR 法では感度が不十分だったため、まず高感度の digital PCR 測定法を導入して検討した。次に、この現象が肝細胞癌(以下、HCC と略す)患者血清中で検出できるか否か、血清からエクソソームを抽出し、その中のヘプシジン mRNA の選択的スプライシング・バリエーション発現を、digital PCR をベースとした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。

材料と方法

1. 細胞株

肝がん由来細胞株である HepG2, Hep3B, HuH7, WRL68, SK-HEP-1 (DS ファーマバイオメディカル, 大阪), HLE, HLF (ヒューマンサイエンス研究資源バンク HSRRB, 大阪) を用いた。培養液は高グルコース Dulbecco's modified eagle medium (和光純薬工業, 大阪) を用い、10% 非働化 HyClone New Zealand fetal bovine serum (Perbio Science, Helsinborg, Sweden), 100 U/ml ペニシリン, 100 µg/ml ストレプトマイシン (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を添加した。各種細胞株を 100 mm \emptyset 細胞培養用ディッシュ (Corning Life Sciences, Manassas, VA) に播種し、5%CO₂, 37°C の湿潤条件下で培養し、70%コンフレンシーを基準に継代培養した。

2. 細胞質 RNA 抽出

各種細胞株 5×10^6 個からメンブレン状の結合マトリクスを配したスピン・カラム精製法に基づく 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 (ND-1000, Thermo Fisher Scientific, San Diego, CA) を使用した.

3. cDNA 合成とポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

Total RNA 1 μ g に対し, 2.5 μ M オリゴ(dT)₁₂₋₁₈ プライマー, 500 μ M dNTP 混合液, 20 U RNase 阻害剤および 200 U PrimeScript™ 逆転写酵素 (タカラバイオ, 大津) を用いて 42°C, 30 分間逆転写反応を行い, cDNA を調製した (RT). ヒト・ヘプシジン mRNA に対応するプライマー・セットとして, 開始コドンから終始コドンまでの全長 255 塩基を増幅するフォワード・プライマー (5' -ATGGCACTGAGCTCCCAGAT-3', 太文字は開始コドンを示す) およびリバーズ・プライマー (5' -CTACGTCTTGCAGCACATCC-3', 太文字は終始コドンを示す) を作製した [8]. ポリメラーゼ連鎖反応液として, RT 反応液 2 μ l, 200 nM フォワード・プライマー, 200 nM リバーズ・プライマー, 400 μ M dNTP 混合液, 2.5 U TaKaRa Ex Taq® ポリメラーゼ (タカラバイオ) の混合液を調製した. 増幅条件は, 94°C / 10 秒間の熱変性, 50°C / 5 秒間のアニーリング, 72°C / 20 秒間の cDNA 複製反応を 40 回繰り返した (PCR). PCR 反応液 5 μ l を 2% アガロースゲル (NuSieve 3:1™ アガロース, Lonza, Rockland, ME) にアプライし, トリス-酢酸-EDTA 緩衝液にて室温下で 30 分間電気泳動を行った. DNA サイズマーカーとして 100 bp DNA Ladder (タカラバイオ) を同時に泳動した. 泳動後のゲルを, 10,000 倍希釈した SYBR Green I 核酸染色液 (Lonza) に浸し, 30 分間静かに攪拌し染色を行った.

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・プライマーないしは pUC/M13 リバーズ・シーケンス・プライマーを用いて二重鎖 DNA のセンス鎖ないしはアンチセンス鎖をそれぞれシーケンスした. BigDye® X Terminator™ 精製キット (Applied Biosystems) を用いて未反応の Dye terminator を除去した後, 自動シーケンサー 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にて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 20 例 (男性 14 名, 女性 6 名, 年齢 56-83 歳, 平均 70.2 歳), 慢性肝疾患患者 17 例 (男性 9 名, 女性 8 名, 年齢 38-80 歳, 平均 67.4 歳) およびボランティア健常人 30 例 (男性 18 名, 女性 12 名, 年齢 23-50 歳, 平均 34.1 歳) から末梢血を採取し, $1,750 \times g$, 10 分間, $4^{\circ}C$ で遠心処理した. 分離した血清は $-30^{\circ}C$ 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

保存血清を解凍した後, $2,000 \times g$, 30 分間, $4^{\circ}C$ で遠心処理し, 不溶性・凝集性物質を除去した. 遠心処理後の上清をポアサイズ $0.22 \mu m$ の親水性 PVDF 膜 (Millex-GV, EMD Millipore, Billerica, MA) を用いて濾過処理した. 濾過液中に含まれるエクソソームを抽出するため, 濾過液 1 ml から Total Exosome Isolation (from serum) (Invitrogen®, Thermo Scientific) を用いてエクソソームを沈澱回収した. 最終段階のエクソソームを含むペレットを $100 \mu l$ の D-PBS(-) (和光純薬工業) で懸濁した. 次に, エクソソーム

中の RNA を抽出するため, Total ExosomeRNA and Protein Isolation Kit (Invitrogen®, Thermo Scientific) を使用した. 添付マニュアルに従い, nuclease-free water 100 μ l で RNA を抽出した. 抽出した RNA 溶液 (1.5-mL サンプル・チューブ) を遠心濃縮機にセットし, 減圧下で 2 時間処理し, RNA をドライアップした. 遠心濃縮後, RNA ペレットを nuclease-free water 10 μ l で再溶解した. RNA の品質評価ならびに濃度算出には, Agilent 2200 TapeStation および High sensitivity RNA ScreenTape を用いて電気泳動を行い, Agilent 2200 TapeStation Analysis software A01.04 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) にて解析した. 組織由来 RNA として, ヒト肝臓から抽出した total RNA (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) を用いた.

7. mRNA の絶対定量法

cDNA 合成は上記材料と方法の「3. cDNA 合成とポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)」に従った. 野生型ヘプシジン mRNA を増幅するため, 以下に示すフォワード・プライマーおよびリバーズ・プライマーを用いた. フォワード・プライマー; 5' -TGACCAGTGGCTCTGTTTTCC-3', リバーズ・プライマー; 5' -TGGCTCCAGCTCTGTCCTG-3'. 変異型ヘプシジン mRNA 増幅用に以下のフォワード・プライマー/リバーズ・プライマセットを用いた. フォワード・プライマー; 5' -TGACCAGTGGCTCTGTTTTCC-3', リバーズ・プライマー; 5' -GTGGGTGTCTCGCCTCCTT-3'. QuantStudio™ 3D Digital PCR Master Mix (Applied Biosystems®, Thermo Scientific) を用いて反応液 (50 μ l) を調製し, 以下の条件で PCR 増幅を行った. サイクル 1, 96°C/10 分間のテンプレート熱変性および酵素活性化; サイクル 2-20, 60°C/2 分間のアニーリングおよび複製, 98°C/30 秒間の熱変性; 最終サイクル, 60°C/2 分間のアニーリングおよび複製, 10°C/保存. 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, 以下に

示す特異的プローブを追加した増幅検出液を QuantStudio™ 3D Digital PCR System (Applied Biosystems®) にアプライした。野生型ヘプシジン mRNA 検出用特異的プローブとして, exon 1 と exon 2 のジャンクション部位にアニールする配列, 5' FAM-CACAACAGACGGGACAA-NFQ-MGB を選択した。一方, 変異型ヘプシジン mRNA 検出用特異的プローブとして, exon 1 と exon 3 のジャンクション部位にアニールする配列, 5' FAM-CAGCCCATGTTCCAG-NFQ-MGB を選択した。PCR 増幅ならびに検出条件は, サイクル 1, 96°C/10 分; サイクル 2-40, 60°C/2 分, 98°C/30 秒; 最終サイクル, 60°C/2 分, 10°C/保存とした。

8. 統計学的解析

統計学的処理にはウィンドウズ用 GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) を用いた。多重比較検定には Dunnett テストを採用し, $p < 0.05$ をもって統計学的有意差ありと判断した。二群間の相関係数は Pearson 積率相関関係で表記した。

結果

1. 変異型ヘプシジン mRNA の同定

ヒト肝がん細胞株のヘプシジン mRNA 発現をスクリーニングする目的で, 開始コドンを含むフォワード・プライマーおよび終始コドンを含むリバーズ・プライマーを用いて RT-PCR を実施した。7 種類の細胞株のうち, Hep3B を除いた 6 種類の細胞株, HepG2, HuH7, HLE, HLF, WRL68 および SK-HEP-1 で 255bp に相当するバンドを検出した (図 1A 太矢印)。このバンドは, サンガー・シーケンスでその塩基配列を確認したところ, NCBI GenBank に登録の AJ277280, liver-expressed antimicrobial peptide (leap-1, hepcidin) に一致した。一方, HLF 細胞株で, 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 (図 1A 細矢印)。このバンドは同じヘプシジン mRNA であったが, initial ATG から数

えて 91 番目の塩基から 150 番目の塩基の 60 塩基が欠失した変異型で、報告されていないものであった (図 1B). この 91-150 番目の 60 塩基は *HAMP* gene の exon 2 に相当することから、exon 2 をスキップし、新たに exon 1 と exon 3 とが結合した変異型ヘプシジン mRNA の増幅産物であることが判明した (図 1C).

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

目的の mRNA 検出方法として RT-PCR 後、アガロースゲル電気泳動にて増幅産物を展開したこれまでの手法では、6 種類の肝がん細胞株の中で 1 種類にのみ変異型 mRNA が得られたが、他の細胞株でもこの変異型 mRNA が出現している可能性があるのではないかと考え、その検出のために、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 (図 2). このシステムを用いて各種肝がん細胞株におけるヘプシジン mRNA の発現パターンと発現量を比較検討した. 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 (図 3A). 一方、野生型ヘプシジン mRNA は 7 種類の全細胞株で陽性であった (図 3B). このように肝がん細胞株の cellular RNA 中に変異型ヘプシジン mRNA の存在を確認することができたことから、HCC 患者においても変異型ヘプシジン mRNA の存在が予想される. そこで、HCC 患者を対象としたヘプシジン mRNA の発現について検討することとした.

3. 血清エキソソーム RNA の品質

これまでの肝生検や手術材料による試料収集に代わり、非侵襲的にかつ診療時に採取可能な血清を選択した. この血清中には細胞から分泌された膜状粒子、エキソソームが存在し、このエキソソーム中には多くの核酸分子が含まれている. そこで、本研究では血清エキソソームを用いたヘプシジン mRNA の検出を試みた. はじめに、血清エキソソームより抽出した RNA の品質をアガロースゲル電気

泳動にて評価した. 血清エクソソーム RNA は不均一な低分子サイズを示し, 18S/28S の ribosomal RNA はほとんど含まれていなかった (図 4A). 一方, 肝臓組織から抽出した total RNA は, その主組成が 18S/28S の ribosomal RNA であった (図 4B). このことは, 今回抽出した血清エクソソーム RNA には, ribosome RNA が主体の細胞/組織由来 RNA の混入がないことを裏付けた. RNA の平均収量は 19.5 ng (1.6-115.6 ng) であった.

4. 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 を基に, 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 の検出を試みたところ, 野生型/変異型ヘプシジン mRNA のいずれも検出することができなかった. その原因として, 血清エクソソームから回収した RNA の量が極めて低いことに起因するものと考えられた. そこで, QuantStudio 3D digital PCR system による検出工程の前に, 標的 mRNA を事前に増幅するステップを組み込み, 2 段階 PCR 増幅システムを構築した. 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 者 20 例, 慢性肝疾患 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 群に分けて, 変異型および野生型ヘプシジン mRNA の発現量を算出した. 結果, 変異型ヘプシジン mRNA の発現量はそれぞれ 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. このうち, HCC 患者群の変異型ヘプシジン mRNA 量と HCC 既往歴の無い慢性肝疾患患者群の変異型ヘプシジン mRNA 量との間に統計学的有意差 ($p < 0.05$) を認めた. さらに, HCC 患者群の変異型ヘプシジン mRNA 量と健常人群の変異型ヘプシジン mRNA 量との間にも統計学的有意差 ($p < 0.01$) を認めた (図 5A). 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 (図 5B) .

さらに、健常人の血清エキソソーム中にも、少ないながら変異型ヘプシジン mRNA を 0 から 19.7 copies/ μ l の範囲で検出した。今後、健常人における変異型ヘプシジン mRNA 値の評価が重要になるが、今回対象とした健常人 30 例の変異型ヘプシジン mRNA 測定結果からもっとも高い数値を示した健常人の値である 19.7 copies/ μ l をカットオフ値とし、それより高値を示した患者の割合を表 1 にまとめた。HCC 患者群では 20 例中 12 例、HCC 既往歴の有る慢性肝疾患患者群では 7 例中 2 例であった。

5. 血清 AFP および血清 PIVKA-II との相関

変異型ヘプシジン mRNA が高値を示した HCC 患者群において、肝臓癌の腫瘍マーカーとして用いられる AFP および PIVKA-II との相関について検討した。HCC 患者の変異型ヘプシジン 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 $r=0.39$ (図 6A) および $r=0.19$ (図 6B) と、いずれも高い相関は示さなかった。

考察

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、この変異が血清エキソソームで確認できることを初めて明らかにした。

7 種の肝がん細胞株を用い、ヘプシジン mRNA 発現を解析したところ、すべての細胞株で 255 bp に相当する野生型 mRNA が見出されたのに対し、そのうちのひとつ、HLF 細胞株には低分子 mRNA のバンドが存在し、*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。肝がんでは、これまでに報告されている *ENPP7* や *BHMT* 遺伝子のスプライシング異常 [20][21] と同様、ヘプシジン mRNA でも選択的スプライシング・バリエントが存在する可能性が示された。しかし、HLF を除く他の細胞株ではこの現象は見いだされなかった。

め、従来の RT-PCR 法では感度が不十分だった可能性を考え、高感度の digital PCR 測定法を導入した [22][23]. その結果、野生型ヘプシジン mRNA は 7 種類の全細胞株で陽性であったのに対し、変異型ヘプシジン mRNA の発現も、Hep3B を除いた 6 種類の細胞株, HepG2, HuH7, HLE, HLF, WRL68 および SK-HEP-1 で有意に検出された. 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・バリエント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いる [24-26]. 一般的に、この現象は、本来正常な細胞では精密に制御されるべき選択的スプライシングが、癌特異的な異常が誘導されることで癌細胞に有利な状況を形成させる方向に働いていることを説明できよう [27-29]. さらに、このスプライシング・バリエントが、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、がん細胞と担がん生体両者の鉄代謝に影響を与える可能性があり、その意義は大きいと考えられた. すなわち、このヘプシジン mRNA バリエントの出現が、鉄代謝制御のバランスを崩し、鉄の異常な吸収・蓄積が、HCC などを含めたがん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.

今回のスプライシング様式は in frame で、翻訳産物としてはプレプロヘプシジン 84 アミノ酸中 20 アミノ酸が欠失したポリ・ペプチドと推測される. このスプライシング・バリエントでは、エクソン 2 に相当する部分が欠損しており、*HAMP* gene の loss or reduction of function の可能性が強い.

次に、この現象が HCC 患者血清中で検出できるか否かが問題となる. 血清からエキソソームを抽出し、その中のヘプシジン mRNA のスプライシング・バリエント発現を、digital PCR をベースとした二段階増幅法を新たに開発し、その臨床的意義も検討することとした. 一方で、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 [17-19]. そこで、非侵襲的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[30]．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，このことは，エクソソーム中に包含される物質はエクソソームを分泌する細胞の特徴を表現すものと考えられることができる[31][32]．すなわち，がん細胞の分泌するエクソソームの構成成分は正常細胞のそれと異なることが予想される[33][34]．そこで，HCC患者血清中エクソソームを用いたヘプシジン mRNA バリエントの検出およびその有用性について検討することとした．しかし，エクソソーム中の成分として 76.20%が microRNA で占められており，fragment of coding sequence はわずか 1.36%であるとする報告があり[35]，実際にヘプシジン mRNA を検出するためにはより高感度な検出手段の構築が不可欠であると考えた．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 の野生型はもとより異常型のスプライシング・バリエントを検出することが出来た．

更に，本システムを用いて，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 HCC の腫瘍マーカーとして用いた AFP および PIVKA-II との間で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存在する可能性が示された．今回は，ヘプシジン主たる産生細胞が肝細胞であることから，HCC とその基礎疾患に絞ったが，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．

結語

肝癌細胞株および 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・バリエントが存在すること明らかにした．こ

の HCC 患者群の異常型ヘプシジン mRNA の定量は非侵襲的液体生検による HCC の新しいバイオマーカーとしての開発が期待される。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて下さり、終始御指導を賜りました旭川医科大学内科学講座消化器・血液腫瘍制御内科学分野 高後 裕教授に深謝しますとともに、実験に関する御助言を頂きました消化管再生修復医学講座 佐々木 勝則特任教授に感謝します。

論文

- 1 Warf MB, Berglund JA. Role of RNA structure in regulating pre-mRNA splicing. *Trends BiochemSci* 2010; **35**: 169-178.
- 2 Modrek B, Lee C. A genomic view of alternative splicing. *Nat Genet* 2002; **30**: 13-19.
- 3 Hallegger M, Llorian M, Smith CW. Alternative splicing: global insights. *FEBS J* 2010; **277**: 856-866.
- 4 Das D, Clark TA, Schweitzer A, Yamamoto M, Marr H, Arribere J, Minovitsky S, Poliakov A, Dubchak I, Blume JE, Conboy JG. A correlation with exon expression approach to identify cis-regulatory elements for tissue-specific alternative splicing. *Nucleic Acids Res* 2007; **35**: 4845-4857.
- 5 Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, Mayr C, Kingsmore SF, Schroth GP, Burge CB. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 2008; **456**: 470-476.
- 6 Martins R, Silva B, Proenca D, Faustino P. Differential HFE gene expression is regulated by alternative splicing in human tissues. *PLoS One* 2011; **6**: e17542.
- 7 Germann S, Gratadou L, Dutertre M, Auboeuf D. Splicing programs and cancer. *J Nucleic Acids* 2012; **Article ID 269570**, 9 pages.

- 8 Yam JW, Ko FC, Chan CY, Yau TO, Tung EK, Leung TH, Jin DY, Ng IO. Tensin2 variant 3 is associated with aggressive tumor behavior in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2006; **44**: 881-890.
- 9 Peng H, Dara L, Li TW, Zheng Y, Yang H, Tomasi ML, Tomasi I, Giordano P, Mato JM, Lu SC. MAT2B-GIT1 interplay activates MEK1/ERK 1 and 2 to induce growth in human liver and colon cancer. *Hepatology* 2013; **57**: 2299-2313.
- 10 Herraes E, Lozano E, Macias RI, Vaquero J, Bujanda L, Banales JM, Marin JJ, Briz O. Expression of SLC22A1 variants may affect the response of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma to sorafenib. *Hepatology* 2013; **58**: 1065-1073.
- 11 Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X Devaux I, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 2002; **110**: 1037-1044.
- 12 Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Gantz T, Kaplan J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004; **306**: 2090-2093.
- 13 Ganz T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood* 2011; **117**: 4425-4433.
- 14 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.
- 15 Park CH, Valore EV, Waring AJ, Gantz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001; **276**: 7806-7810.

- 16 Hosoki T, Ikuta K, Shimonaka Y, Sasaki Y, Yasuno H, Sato K, Ohtake T, Sasaki K, Torimoto Y, Saito K, Kohgo Y. Heterogeneous expressions of hepcidin isoforms in hepatoma-derived cells detected using simultaneous LC-MS/MS. *Proteomics Clin Appl* 2009; **3**: 1256-1264.
- 17 Kijima H, Sawada T, Tomosugi N, Kubota K. Expression of hepcidin mRNA is uniformly suppressed in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2008; **8**: 167.
- 18 Tseng HH, Chang JG, Hwang YH, Yeh KT, Chen YL, Yu HS. Expression of hepcidin and other iron-regulatory genes in human hepatocellular carcinoma and its clinical implications. *J Cancer Res ClinOncol* 2009; **135**: 1413-1420.
- 19 Abdelmonem E, Tharwa el-S, Farag MA, Fawzy A, El Shinnawy SF, Suliman S. Hepcidin mRNA level as a parameter of disease progression in chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *J Egypt Natl Cancer Inst* 2009; **4**: 333-342.
- 20 Cheng Y, Wu J, Hertervig E, Lindgren S, Duan D, Nilsson A, Duan RD. Identification of aberrant forms of alkaline sphingomyelinase (NPP7) associated with human liver tumorigenesis. *Br J Cancer* 2007; **97**: 1441-1448.
- 21 Pellanda H, Namour F, Fofou-Caillierez M, Bressenot A, Alberto JM, Chéry C, Ayav A, Bronowicki JP, Guéant JL, Forges T. A splicing variant leads to complete loss of function of betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) gene in hepatocellular carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; **44**: 385-392.
- 22 Baker M. Digital PCR hits its stride. *Nature Methods* 2012; **9**: 541-544.
- 23 Milavec M, Dobnik D, Yang L, Zhang D, Gruden K, Zel J. GMO quantification: valuable experience and insights for the

- future. *Anal Bioanal Chem* 2014; **406**: 6486-6497.
- 24 Takashima H, Nakajima T, Moriguchi M, Sekoguchi S, Nishikawa T, Watanabe T, Katagishi T, Kimura H, Minami M, Itoh Y, Kagawa K, Okanou T. In vivo expression patterns of surviving and its aplicing variants in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2005; **25**: 77-84.
- 25 Yes S, Narla G, Zhao X, Garg R, Tal-Kremer S, Hod E, Villanueva A, Loke J, Tarocchi M, Akita K, Shirasawa S, Sasazuki T, Martignetti JA, Llovet JM, Friedman SL. Ras promotes growth by alternative splicing-mediated inactivation of the KLF6 tumor suppressor in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008; **134**: 1521-1531.
- 26 Castillo J, Goñi S, Latasa MU, Perugorría MJ, Calvo A, Muntané J, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Prieto J, Avila MA, Berasain C. Amphiregulin induces the alternative splicing of p73 into its oncogenic isoform DeltaEx2p73 I human hepatocellular tumors. *Gastroenterology* 2009; **137**: 1805-1815.
- 27 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.
- 28 Shkreta L, Bell B, Revil T, Venables JP, Prinos P, Elela SA, Chabot B. Cancer-associated perturbations in alternative pre-messenger RNA splicing. *Cancer Treat Res* 2013; **158**: 41-94.
- 29 Chen GL, Miller GM. Extensive alternative splicing of the repressor element silencing transcription factor linked to cancer. *PLoS One* 2013; **8**: e62217.
- 30 Gailhouste L, Gomez-Santos L, Ochiya T. Potential applications of miRNAs as diagnostic and prognostic markers in liver cancer. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2013; **18**: 199-223.
- 31 Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostransd M, Lee JJ, Lotvall

- J0. Exosome-mediated transfer of mRNAs and micro RNA is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; **9**: 654-659.
- 32 Charrier A, Chen R, Chen L, Kemper S, Hattori T, Takigawa M, Brigstock DR. Exosomes mediate intercellular transfer of pro-fibrogenic connective tissue growth factor (CCN2) between hepatic stellate cells, the principal fibrotic cells in the liver. *Surgery* 2014; **156**: 548-555.
- 33 Henderson MC, Azorsa DO. The genomic and proteomic content of cancer cell-derived exosomes. *Front Oncol* 2012; **2**: 38
- 34 Takahashi K, Yan IK, Kogure T, Haga H, Patel T. Extracellular vesicle-mediate transfer of long non-coding RNA ROR modulates chemosensitivity in human hepatocellular cancer. *FEBS Open Bio* 2014; **4**: 458-467.
- 35 Huang X, Yuan T, Tschannen M, Sun Z, Jacob H, Du M, Liang M, Dittmar RL, Liu Y, Liang M, Kohli M, Thibodeau SN, Boardman L, Wang L. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics* 2013; **14**: 319.

図の説明

図 1 RT-PCR 法による異常型ヘプシジン mRNA の同定. A はヒト肝がん細胞株のヘプシジン mRNA 発現をスクリーニングするため, 開始コドンを含むフォワード・プライマーおよび終始コドンを含むリバース・プライマーを用いて RT-PCR を実施し, 2%アガロースゲル電気泳動で確認した結果であり, 7 種類の細胞株のうち, Hep3B を除いた HepG2, HuH7, HLE, HLF, WRL68 および SK-HEP-1 で 255 bp に相当するバンドを検出した (太矢印). さらに, HLF で 255 bp 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 (細矢印). DNA サイズ・マーカースとして 100 bp ラダーを同時に泳動した. B は HLF の 2 種類の増幅バンドのシーケンス結果であり, 大きいサイズのバンドは野生型ヘプシジン mRNA であったのに対して, サイズの小さいバンドは 60 塩基が欠失した異常型ヘプシジン mRNA であった. 60 塩基が欠失し, 新たに生じた exon 1 と exon 3 の結合領域のエレクトロフェログラムを示した. C はヒト *HAMP* 遺伝子の模式図であり, 3 つのエクソンと 2 つのイントロンから構成されており, 異常型ヘプシジン mRNA はエクソン 2 をスキップしたスプライシング異常であった.

図 2 高感度検出法による異常型ヘプシジン mRNA の定量. 従来の RT-PCR 法による検出方法と比較して, 高感度検出方法は, 野生型/異常型ヘプシジン mRNA それぞれに特異的な蛍光標識プローブを用い, mRNA のコピー数を絶対定量する digital PCR 法である.

図 3 肝細胞株におけるヘプシジン mRNA の発現解析. A は異常型ヘプシジン mRNA の発現量を細胞質 RNA 1 μ g に対するコピー数で表現したもので, 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. B は野生型ヘプシジン mRNA の発現量を表したもので, 7 種類の全細胞株で陽性であった.

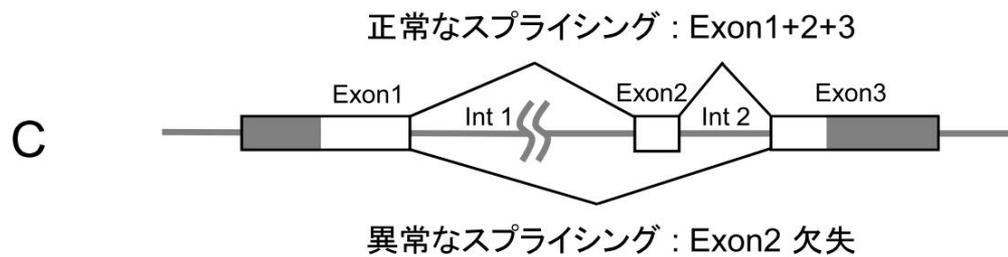
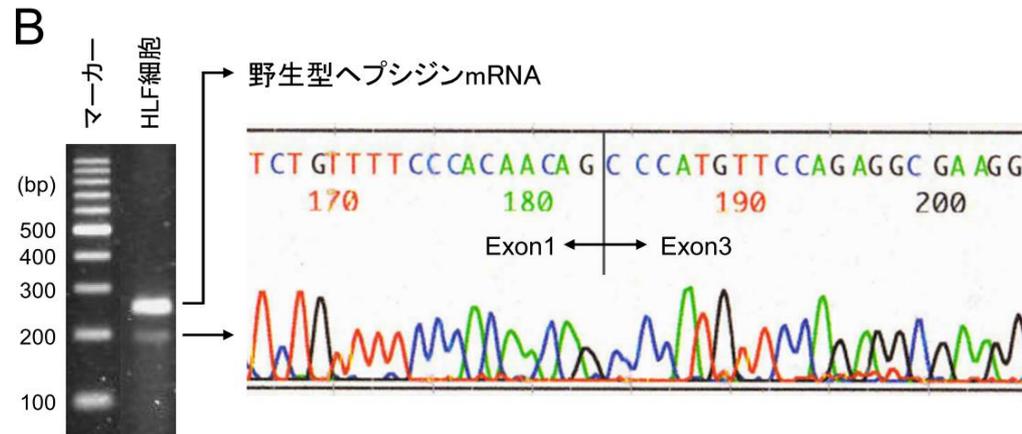
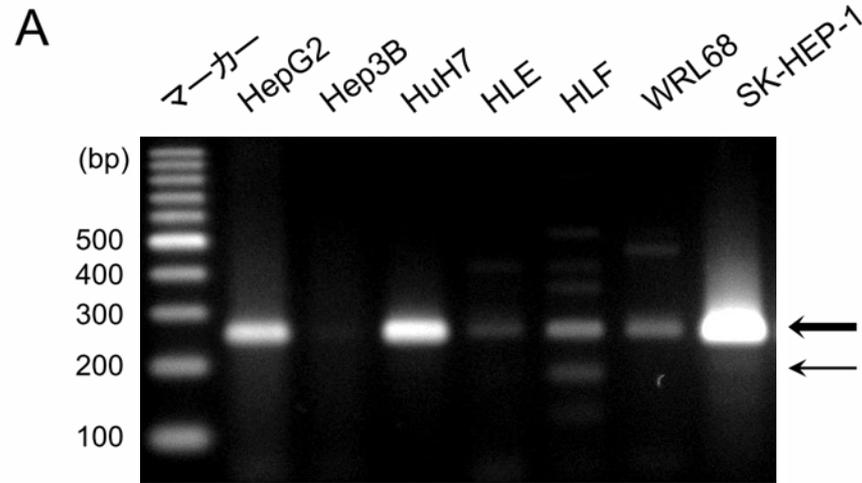
図 4 血清エクソソーム RNA の品質. A は血清エクソソームより抽出した RNA の品質をアガロースゲル電気泳動にて評価した結果であり, 右図はゲル・イメージを示し, 左図はエレクトロフェログラムを示した. 不均一な低分子サイズを示し, 18S/28S の ribosomal RNA はほとんど含まれていなかった. B は肝臓組織から抽出した total RNA の品質をアガロースゲル電気泳動にて評価した結果であり, 右図はゲル・イメージを示し, 左図はエレクトロフェログラムを示した. その主組成が 18S/28S の ribosomal RNA であった. Total RNA の分解度を客観的に評価する RNA Integrity Number equivalent: RIN[®] は電気泳動システム付属の解析ソフトで自動算出された数値である.

図 5 肝細胞がん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. A は肝細胞がん (HCC) 患者 20 例, 慢性肝疾患 17 例, うち HCC 既往歴が有る患者 7 例, HCC 既往歴の無患者 10 例, 健常人のボランティア 30 例の 4 群に分けて, 変異型ヘプシジン mRNA の発現量を算出した. HCC 患者群の変異型ヘプシジン mRNA 量と HCC 既往歴の無い慢性肝疾患患者群の変異型ヘプシジン mRNA 量との間に統計学的有意差 ($p < 0.05$) を認めた. さらに, HCC 患者群の変異型ヘプシジン mRNA 量と健常人群の変異型ヘプシジン mRNA 量との間にも統計学的有意差 ($p < 0.01$) を認めた. B は 4 群の野生型ヘプシジン mRNA の発現量を算出した結果であるが, 各々の群間における有意差は認めなかった. 多重比較検定には Dunnett テストを採用した.

図 6 変異型ヘプシジン mRNA コピー数と血清 AFP および血清 PIVKA-II との相関. A は肝細胞がん患者 20 例の変異型ヘプシジン mRNA コピー数と血清 AFP 値との相関について検討したところ, $r = 0.39$ であった. B は血清 PIVKA-II 値との相関について検討した結果であり, $r = 0.19$ であった. 二群間の相関係数は Pearson 積率相関関係で表記した. 図中の破線はそれぞれ AFP 基準値上限の 20 ng/ml, および PIVKA-II 基準値上限の 40 mAu/ml を示す.

表 1

分類		数	コピー数 (copies/ μ l)			≥ 20 copies/ μ l
			平均値	中央値	範囲	
肝細胞がん患者群		20	1212.4	75.4	0-5279.2	12/20
慢性肝 疾患群	肝細胞がん既往歴有	7	200.4	1.7	0-1326.9	2/7
	肝細胞がん既往歴無	10	1.9	0.14	0-16.2	0/10
健常人		30	2.0	0.19	0-19.7	0/30



従来型検出方法

高感度検出方法

[細胞・組織RNA]

total RNA 1 μ g

逆転写反応 ↓

cDNA

PCR増幅反応 ↓

対象mRNA: ヘプシジン
サイズ: 255 bp
(開始コドン - 終始コドン)

↓

アガロースゲル電気泳動
SYBR Green I 蛍光染色
ゲル撮影

↓

泳動パターン解析

[細胞・組織RNA]

total RNA 1 μ g

↓ 逆転写反応

cDNA

↓ digital PCR

増殖(陽性)ウェルのカウント

↓

絶対定量

[血清エクソソームRNA]

total RNA

↓ 逆転写反応

cDNA

↓ PCR増幅反応

1次増幅産物

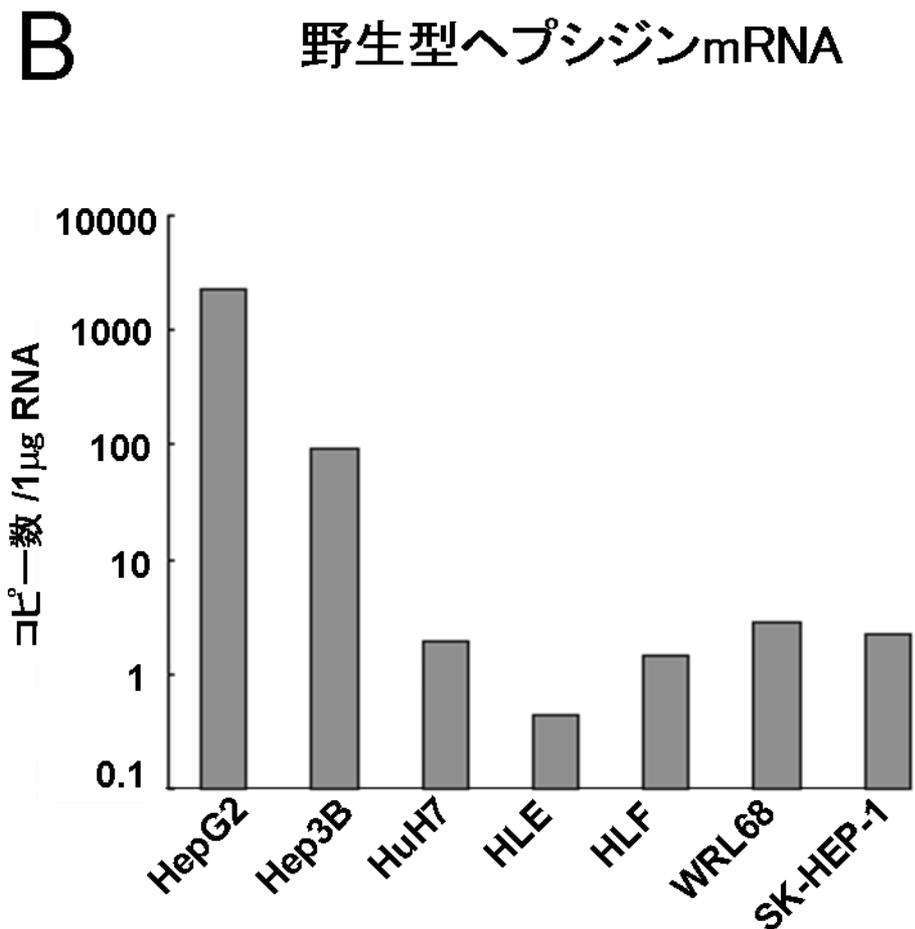
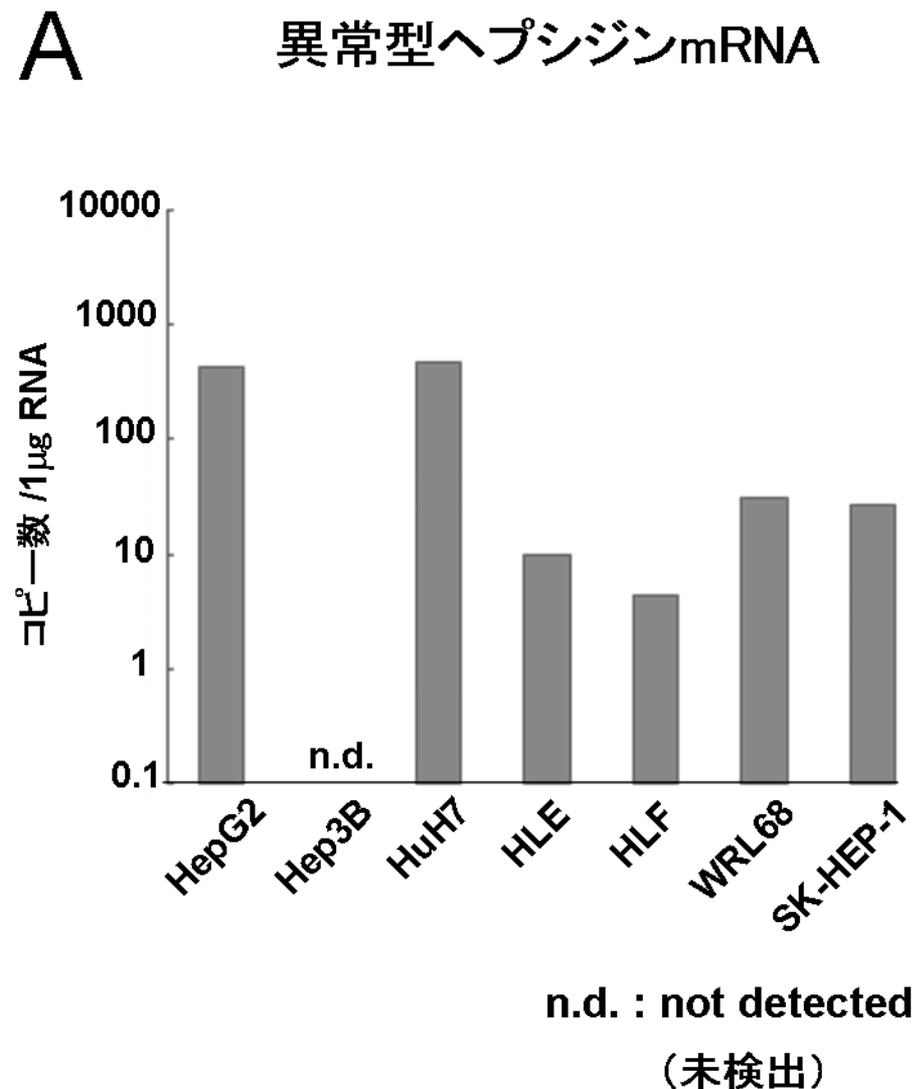
↓ digital PCR

増殖(陽性)ウェルのカウント

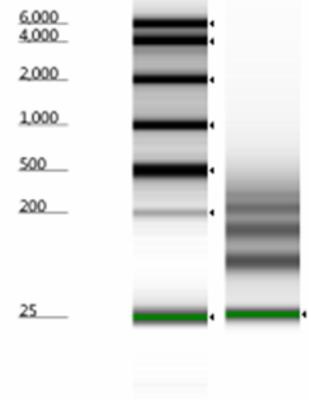
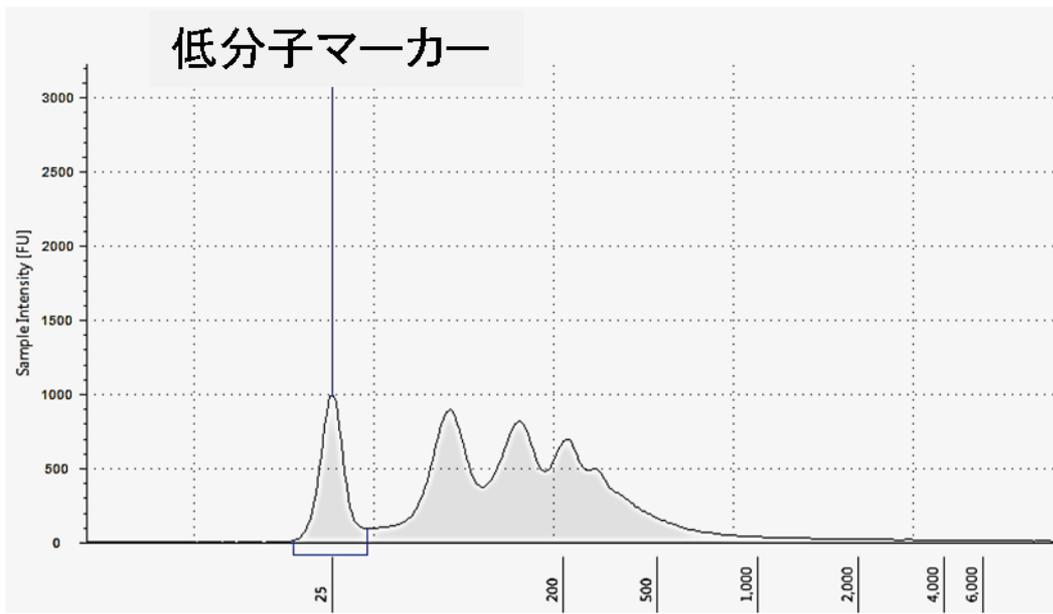
↓

絶対定量

プライマー及びプローブ	ヘプシジン	
	異常型	野生型
フォワード・プライマー	エクソン 1	エクソン 1
リバース・プライマー	エクソン 3	エクソン 2
プローブ(FAM標識)	エクソン1/エクソン3 結合部位	エクソン1/エクソン2 結合部位

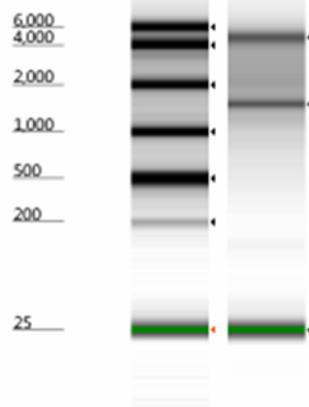
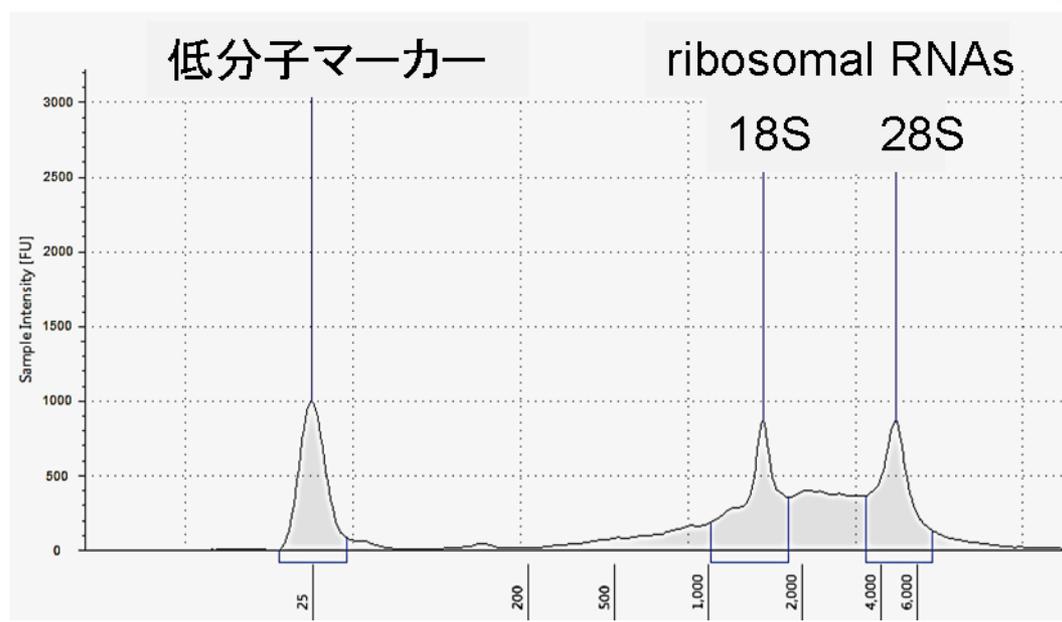


A



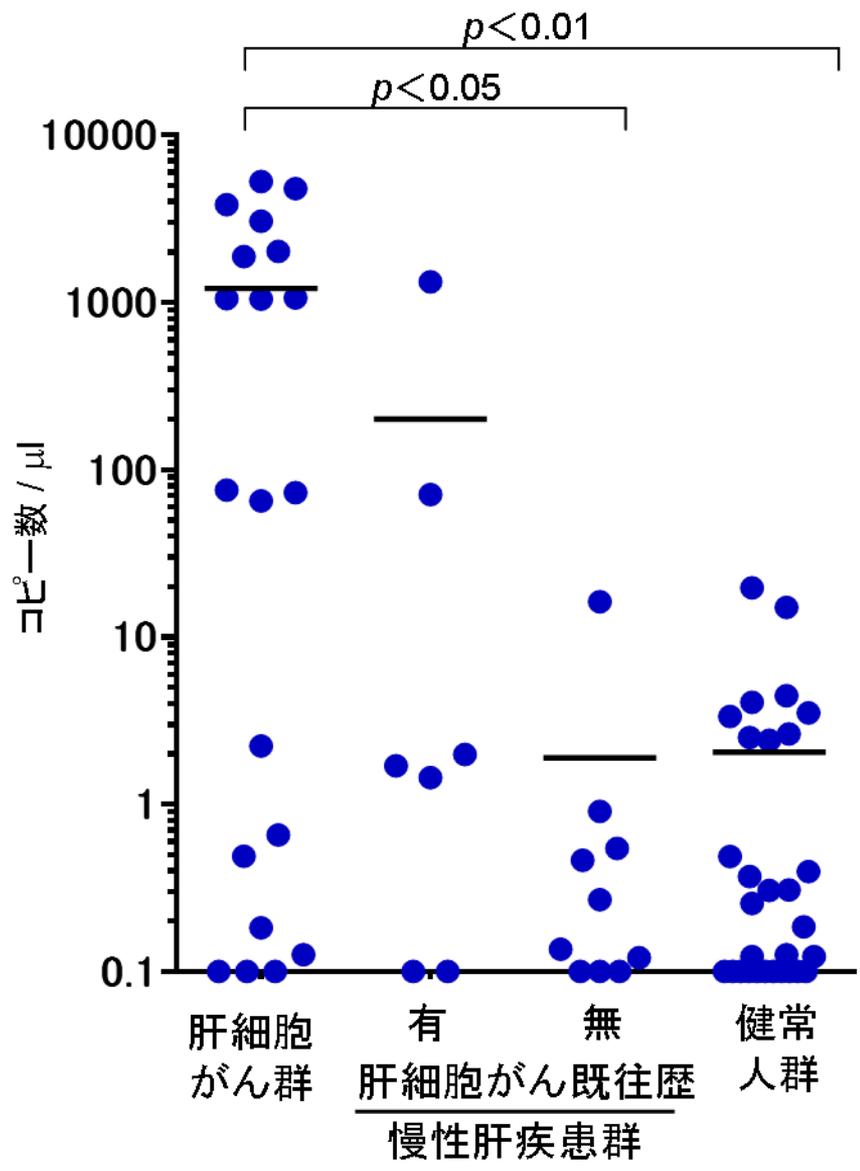
RIN^e
1.0

B

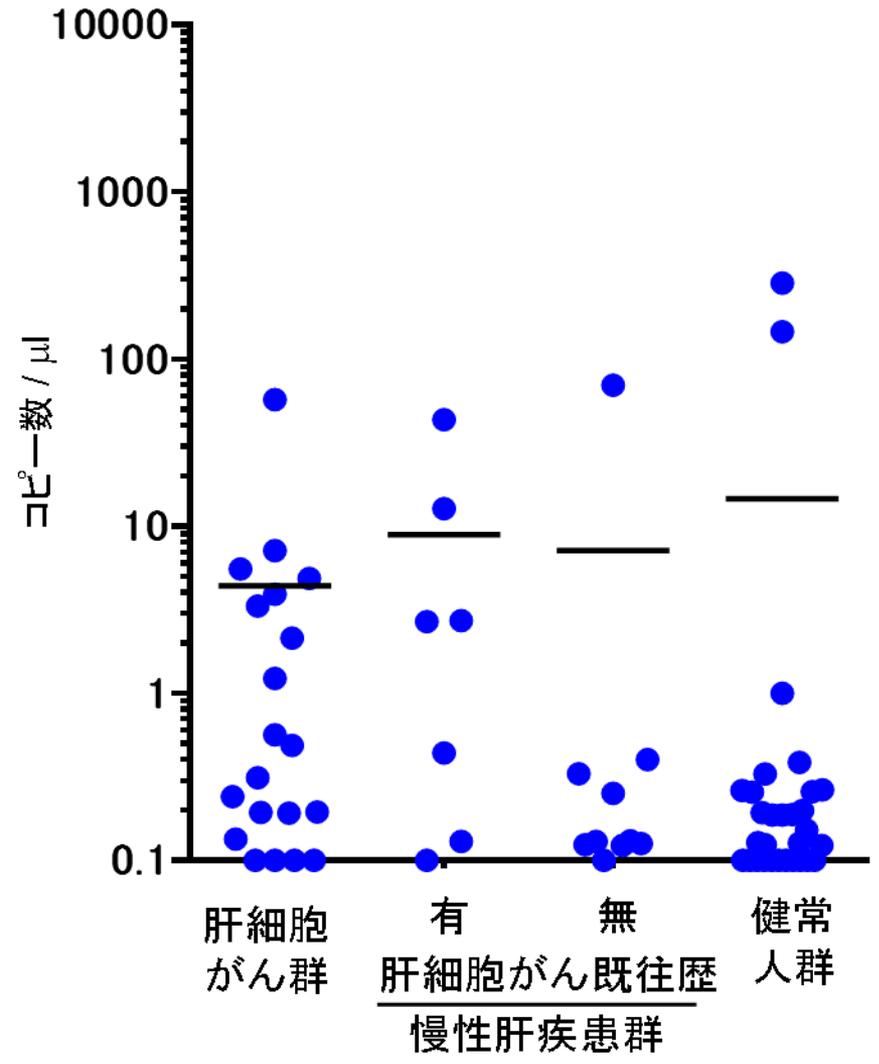


RIN^e
6.7

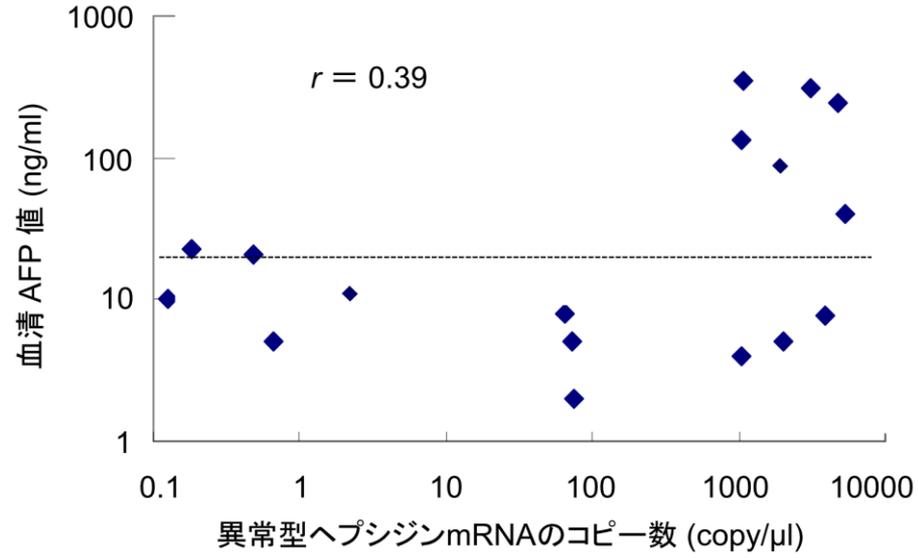
A 異常型ヘプシジンmRNA



B 野生型ヘプシジンmRNA



A



B

