

令和 2 年 5 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04275

研究課題名（和文）十二指腸乳頭部がんにおけるトランスクリプトーム解析による治療標的の探索

研究課題名（英文）Proteomic analysis in ampullary carcinomas for exploring new therapeutic targets

研究代表者

谷内田 真一（Yachida, Shinichi）

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20359920

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：十二指腸乳頭部がんは希少がんであることから、その分子遺伝学的な特徴は明らかになっていない。これまでに研究代表者は本疾患の凍結組織試料を日米から収集し、全エクソーム解析を行い、本疾患に特徴的な突然変異を有する遺伝子ELF3を同定してきた。本研究でこれらの凍結試料からRNAを抽出し、トランスクリプトーム解析を行った。遺伝子の発現解析の階層型クラスター解析では十二指腸乳頭部がんの亜分類（腸型と膵胆型）で異なったクラスターに分類された。またELF3の機能解析でElf3が転写因子として直接的に制御する遺伝子を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

十二指腸乳頭部がんは希少がんであることから、その分子遺伝学的な異常や発がんメカニズムは明らかになっていない。これまでに研究代表者は日米から希少な凍結組織試料を多数例（172名）収集してきた。本研究ではトランスクリプトーム解析を行い、本疾患の分子遺伝学的な特徴をさらに明らかにした。本研究のような国内外からの検体集積と包括的ゲノム解析は、人種横断的な普遍的なデータが得られ、難治がん・希少がん克服のモデルケースとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Ampullary carcinoma is rare and a highly malignant neoplasm. Therefore, the genomic biology of ampullary carcinomas is currently poorly defined. We have conducted the in-depth analysis of the genomic abnormalities of these carcinomas through an international multi-center collaboration. We identified a characteristic significantly mutated driver gene (ELF3) in these carcinomas by whole-exome sequencing. In this study, we performed transcriptome analysis using these samples and functional analysis of ELF3 by using an immortalized normal epithelial cell line of common bile duct origin. Ampullary carcinomas can be separated into two histological phenotype, intestinal-type or pancreatobiliary-type. The transcriptome analysis demonstrated the different clusters based on the histological phenotype. Functional studies demonstrated that ELF3 silencing in normal human epithelial cells enhances abnormalities of several pathways.

研究分野：がんゲノム

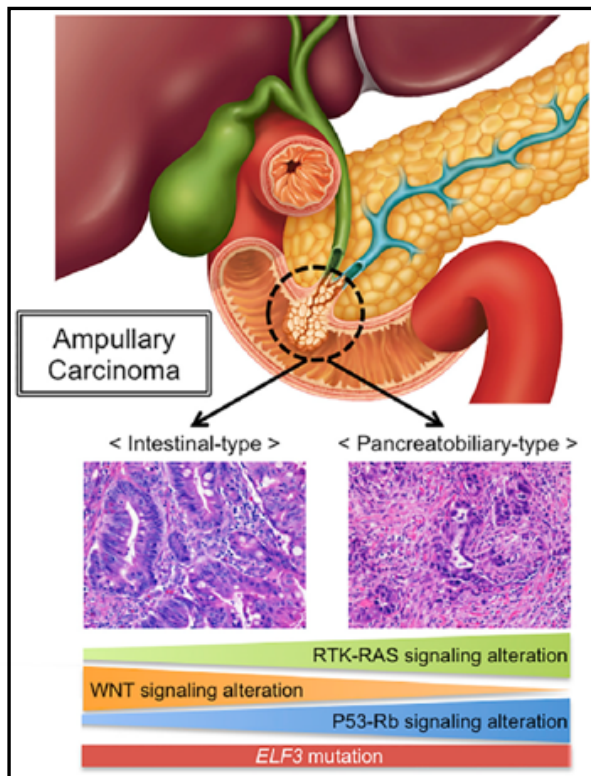
キーワード：十二指腸乳頭部がん トランスクリプトーム ChIP-Seq 希少がん

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵頭部領域のがんは、①膵臓がん、②下部胆管がんと③十二指腸乳頭部がん (Ampullary carcinoma) に分けられる。そのうち膵臓がんと胆管がんは、ICGC (International Cancer Genome Consortium) や TCGA (The Cancer Genome Atlas) による大規模ゲノムスタディーによりその分子遺伝学的な特徴が明らかになりつつあるが (Bailey P et al. Nature 2016; Nakamura H et al. Nat Genet 2015)、十二指腸乳頭部がんについてはその分子遺伝学的特徴がほとんど解明されていない。我々は香川県全体における後向きコホート研究の結果、その発症率は 0.73 人/10 万人であることを報告した (Okano K et al. J Surg Oncol 2014)。十二指腸乳頭部がんは、このように「希少がん」である。

さらに、米国 SEER に基づく十二指腸乳頭部がんの 5 年生存率は、十二指腸乳頭部にとどまる場合は 45%、周囲組織に浸潤した場合は 31%、リンパ節や遠隔転移を伴う場合はわずかに 4% で「難治がん」といえる (Adsay NV et al. WHO Classification of Tumours of the Digestive System 2019)。また本疾患は、胆道がんもしくは小腸がんにも分類されることもあり、疾患概念としても確立されていない。本疾患の治療法は外科切除であるが、術後に半数以上は再発する。転移を伴う症例や再発時の標準的な治療法はなく、担当医が試行錯誤しながら治療を行ってきたのが現状である。2016 年に我々は日米の 172 名の十二指腸乳頭部がんの患者を研究対象として、全エクソーム・シーケンス解析とコピー数解析 (aCGH) を行った (Yachida S et al. Cancer Cell 2016)。その結果、十二指腸乳頭部がんの特徴的な遺伝子異常、さらに新規のがん抑制遺伝子 *ELF3* を発見した (右図)。我々の論文掲載日と同日に欧米豪のグループからも、十二指腸乳頭部がんの網羅的ゲノム解析に関する論文発表があり (Gingras MC et al. Cell Rep 2016)、全く同一のがん抑制遺伝子 (*ELF3*) を同定していた。



また、研究代表者はこれまでに、主に膵臓がんの全エクソーム・シーケンス解析を起点とした、がんゲノムの進化に関する研究を行ってきた (Yachida S, Jones S et al. Nature 2010; Campbell PJ, Yachida S et al. Nature 2010)。がんは遺伝子の病気であり、自然淘汰圧による遺伝子変異の蓄積に伴ってがんゲノムは進化を遂げ、転移能を獲得する (ダーウィンの進化)。疾患あるいは症例ごとに異なる多様な分子遺伝学的特徴を明らかにし、その特性に基づく層別化された個別化治療の実現には、遺伝子異常の全体像の理解と症例ごとの分子プロファイリングが重要と考える。

2. 研究の目的

本研究は、十二指腸乳頭部がんを研究対象とする。本疾患は「希少がん」であることから、その分子遺伝学的な特徴はほとんど解明されていない。研究代表者らは上述のように、これまでに日米から 172 例の十二指腸乳頭部がんの凍結試料を収集してきた。本研究ではこれらの貴重な研究試料を用いて、全トランスクリプトーム解析 (RNA-Seq) を行い、十二指腸乳頭部がんの特徴的な既知もしくは新規の融合遺伝子の同定ならびに遺伝子発現のプロファイリング等を行うことによって、分子標的治療薬や免疫治療薬のリポジショニングや、新たな治療薬開発の基盤データの蓄積を目的とした。

現時点では、手術不能の (転移を有する) がんや再発がんには、エビデンスのある治療法が全くない。十二指腸乳頭部がんのようながん種は、希少であるがゆえ、抗がん剤等のランダム化臨床試験を行うためには長い時間を要する。本研究で十二指腸乳頭部がんの分子遺伝学的な特徴を、さらに明らかにし十二指腸乳頭部がんという疾患の本態解明を進めた。

さらに我々が 2016 年に同定した、十二指腸乳頭部や胆道の腫瘍に特徴的な新規がん抑制遺伝子である *ELF3* の機能はこれまでにほとんど報告されていない。本研究では *ELF3* の機能解析を行い、がん進展におけるその作用機序を解明することも研究の目的とした。

3. 研究の方法

十二指腸乳頭部がんの凍結試料 (計 172 例) から市販のキット (RNeasy Mini Kit, QIAGEN 社) を用いて RNA を抽出する。Agilent 4200 TapeStation (Agilent Technologies 社) を用いて RNA の QC チェックを行う。これまでは RNA の分解度が高いとトランスクリプトーム解析は

困難であったが、最近ではキャプチャー法を用いることで、RNA Integrity Number (RIN) 値もしくは DV200 (200 nt Distribution Value) が低値であっても、トランスクリプトーム解析を行うことが可能となった。つまり、効率的なシーケンス特異的キャプチャーを組み合わせることで、RNA コード領域にフォーカスした RNA-Seq ライブラリーを作製するためである。具体的には、RNA を Covaris (Covaris 社) で断片化した後、RIN 値と DV200 値を取得する。cDNA (1st Strand)、DNA-RNA 複合体を作成後に、cDNA (2nd Strand) 作成し、DNA 二重鎖としアデニル化を行う。アダプター結合し PCR 増幅することで、ショットガンライブラリーを構築する。その後ショットガンライブラリーの Hybridization・Capture を実施する。2 度のライブラリーの濃縮反応、および 2nd PCR の後に、ライブラリープールを回収し、Qubit HS Assay System (Thermo Fisher Scientific 社) でライブラリー収量を測定する。濃度調製後に、次世代シーケンサー (HiSeq2500、Illumina 社) でランを行った。RNA を解読することにより、十二指腸乳頭部がんで既知遺伝子を含めた転写量の定量的データを取得した。シーケンス・ランを行った結果の情報解析を、大阪大学大学院医学系研究科 医学専攻 ゲノム生物学講座・がんゲノム情報学に所属するのバイオインフォマティクスの専門家とともに行った。遺伝子発現プロファイルのクラスタリングは Ward method を用いた。発現レベルは Log₂

(PRKM) 値を使い、GSEA (Subramanian A et al. Proc Natl Acad Sci USA 2005) を用いて、クラスター間の統計学的に有意差のある遺伝子セットを特定した。これらのクラスターと臨床病理学的な所見 (腸型 vs. 膵胆型、生命予後など) との関連を検討した。加えてトランスクリプトーム解析から、既知もしくは新規の融合遺伝子を探索した。

並行して、全エクソーム・シーケンス解析で十二指腸乳頭部がんに高頻度に変異が検出された新規がん抑制遺伝子 (*ELF3*) の機能解析を、ゲノム編集技術を用いて行った。不死化した正常胆管細胞株 (HBDEC2-3H10) を用いて、CRISPER/Cas9 システムで *ELF3* 遺伝子を knock-out した細胞株を作製した。これらの細胞株を用いて、IncuCyte (Essen BioScience 社) 等で細胞増殖、細胞遊走、細胞浸潤の動態解析を行った。細胞株から RNA を抽出し、マイクロアレイ (SurePrint G3 Human GE 8x60K v3、Agilent Technologies 社) を用いて *ELF3* の有無に伴う遺伝子発現の挙動を検討した。遺伝子変動の挙動は、DAVID Bioinformatics Resources 6.8 や GSEA、KEGG を用いて解析した。また、レンチウイルスベクターを用いて *ELF3* 発現細胞株 (HBDEC2 *ELF3* Tet-ON 細胞) を樹立した。マイクロアレイで *ELF3* の Knock-out で大きな変動があった遺伝子をベンチマークに *Elf3* 抗体と FLAG 抗体を用いてドキシサイクリン (DOX) 存在の有無による変動をリアルタイム PCR で確認した後に、免疫沈降で DNA 断片を回収し、サンプル調製を施しシーケンス解析 (HiSeq3000、Illumina 社) により *Elf3* のゲノム上での結合部位をゲノム網羅的に解析した (ChIP-Seq 法)。*Elf3* の対する Peak calling は MACS1.4 を用いて行い、ChIP-Seq で特定された遺伝子は、ChIP-qPCR で検証を行った。

本研究課題では、上述のようにトランスクリプトーム解析を行い、本疾患の分子遺伝学的特徴の全体像をさらに明らかにし、それに基づいた治療法の基盤構築を目標とした。さらに研究代表者らが発見した新規がん抑制遺伝子 *ELF3* の分子生物学的な意義を明らかにした。

4. 研究成果

十二指腸乳頭部がんの凍結試料 (計 172 例) から、市販のキットを用いて RNA を抽出し、Agilent 4200 TapeStation を用いて RNA の QC チェックを行ったところ、RIN 値もしくは DV200 が低値で RNA の分解度が高いと推察されるサンプルが 25 例あり、トランスクリプトーム解析は困難と判断し除外した。シーケンス特異的キャプチャー法により RNA-Seq ライブラリーを作製した。濃度調製後に、次世代シーケンサーでランを行った。リファレンスゲノムへマッピングを行い、転写産物単位および遺伝子単位の発現量を算出した。マッピングされたリードカウントを正規化した後、Fold 解析、階層型クラスタリング、PCA や t-SNE などの非階層型クラスタリングを行った。階層型クラスタリングでは、これらの症例の臨床病理学的所見 (特に、腸型 vs 膵胆型) や国別 (日本 vs 米国)、既存の遺伝子変異等との関連性を検討した。これまでに胆道がんでは、免疫関連遺伝子、とりわけ PD-L1 等の免疫チェックポイント分子の発現が有意に上昇している群が存在することが明らかとなり、その群では高度変異蓄積症例が有意に集積していた (Nakamura H et al. Nat Genet 2015)。十二指腸乳頭部がんでは 22% に Hypermutator phenotype を認めた報告もある (Wang J et al. J Clin Oncol 2015)。膵臓がんにおいても、全トランスクリプトーム解析の結果、4 つの群に分類され、同様にその 1 つは Immunogenic と呼ばれ PD-1 や CTLA-4 の発現が高く免疫療法が奏功する可能性が示唆されている (Bailey P et al. Nature 2016)。本研究における、階層型クラスタリングでは、腸型と膵胆型では遺伝子発現が大きく異なることが明らかとなった。膵臓がんや胆道がんとの RNA-Seq による遺伝子発現の差異を既存のデータや TCGA (The Cancer Genome Atlas) のデータから比較検討した。さらに RNA-Seq データを用いて十二指腸乳頭部がんの組織に含まれる免疫細胞プロファイリング (CIBERSORTx) も行っている。さらにシーケンスデータを用いて、十二指腸乳頭部がんの特徴的な融合遺伝子の探索を行い、多数検体でみられる融合遺伝子を同定した。

ELF3 遺伝子の機能解析も並行して行った。不死化した正常胆管上皮細胞に CRISPER/Cas9 システムで *ELF3* 遺伝子を knock-out した細胞株を作製し、細胞増殖、細胞遊走、細胞浸潤の動態の変化を評価した。細胞株から RNA を抽出し、マイクロアレイを用いて *ELF3* 遺伝子の有無に伴う遺伝子発現の挙動を比較した。*ELF3* の欠失に伴い大きく変動する遺伝子群やパスウェイを

様々なアルゴリズムで特定した。マイクロアレイの発現解析の結果は、qPCR で検証実験を行った。TCGA の他のがん種のデータを用いて、これらの現象を検証し、*ELF3* 遺伝子と連動する遺伝子群の影響が臓器横断的ながん種で見られることを発見した。さらに ChIP-Seq の結果から、Elf3 が転写因子として直接的に影響を及ぼす遺伝子を特定することが出来た。ChIP-qPCR で検証実験を行い確認した。

本研究により、十二指腸乳頭部がんの特徴的な遺伝子発現が明らかになり、さらに組織型や予後と関連する群に分類することが出来た。また、十二指腸乳頭部がんや胆道がんにおいて高頻度に変異を有する *ELF3* 遺伝子のがん抑制遺伝子としての作用機序と新たな遺伝子の機能を発見した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shinichi Yachida
2. 発表標題 Comprehensive genomic analysis of rare gastroenterological cancers
3. 学会等名 The 49th International Symposium of The Princess Takamatsu Cancer Research Fund (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷内田真一
2. 発表標題 がんの不均一性とがんゲノムの進化
3. 学会等名 第10回日本婦人科がん分子標的研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinichi Yachida
2. 発表標題 Cancer Clonal Evolution and Involvement of the Microbiota in Cancer Development
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会 (JCA-Mauvernay Award Session) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷内田真一
2. 発表標題 日米国際連携による十二指腸乳頭部がんの原因遺伝子の解明
3. 学会等名 第15回日本臨床腫瘍学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 谷内田真一
2. 発表標題 次世代シーケンス技術を用いた探索的研究とそれに基づくゲノム医療
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----