

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09299

研究課題名(和文) 子宮体癌におけるリンパ節転移診断に資するマーカーの確立とリンパ節転移機能解析

研究課題名(英文) Development of promising markers for diagnosis of lymph node metastasis for uterine cancer and its functional analysis

研究代表者

寺尾 泰久(terao, yasuhisa)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：00348997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：CAGE法による網羅的解析により、子宮体癌のリンパ節転移診断マーカーとして有用な2遺伝子を同定した。マーカーの1つである新規転写開始点を持つTACC2新規アイソフォームは、同じ新規転写開始点を有するTACC2のisoformが複数確認された。そこでOxford Nanopore sequeencerによる網羅的塩基配列決定を実施した結果、800種類を超える新規isoformを同定した。その複雑性は細胞株、正常子宮内膜、子宮体癌の違いによらず維持され、従来考えられてきた以上のスプライシングバリエーションが存在し、下流の機能発現は複雑な転写産物の混合体により制御されている可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮体癌の再発低リスク症例ではリンパ節郭清は治療的意義に乏しくリンパ節郭清適用の個別化が必要である。申請者は術式適用判断の基準となるリンパ節転移リスク診断マーカーを同定するため、子宮体癌組織RNAをCAGE法により網羅的に解析した。この結果、リンパ節転移診断マーカーとして有用な2遺伝子を同定した。この同定の過程でTACC2新規アイソフォームが複数存在し、最も転移と相関するisoformを同定することは、診断精度の向上に寄与し得る。そこで、新規手法となる全長cDNAの網羅的解析を確立し実施した結果、800種類を超える新規isoformを同定され、転写制御の複雑性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Two promising genes for diagnostic markers for uterine cancer lymph node metastasis were identified by CAGE analysis. One is the TACC2 novel isoform with a new transcription initiation site. Previous studies we have identified multiple transcripts of novel TACC2 with the same novel transcription initiation site. Therefore, as a result of comprehensive nucleotide sequence determination by Oxford Nanopore sequeencer, more than 800 novel isoforms of TACC2 were identified. This complexity is maintained regardless of cell line, normal endometrium, or endometrial cancer, and there are more splicing variants than previously we thought, and it revealed that downstream function expression may be regulated by transcriptional regulation or a mixture of complex transcripts.

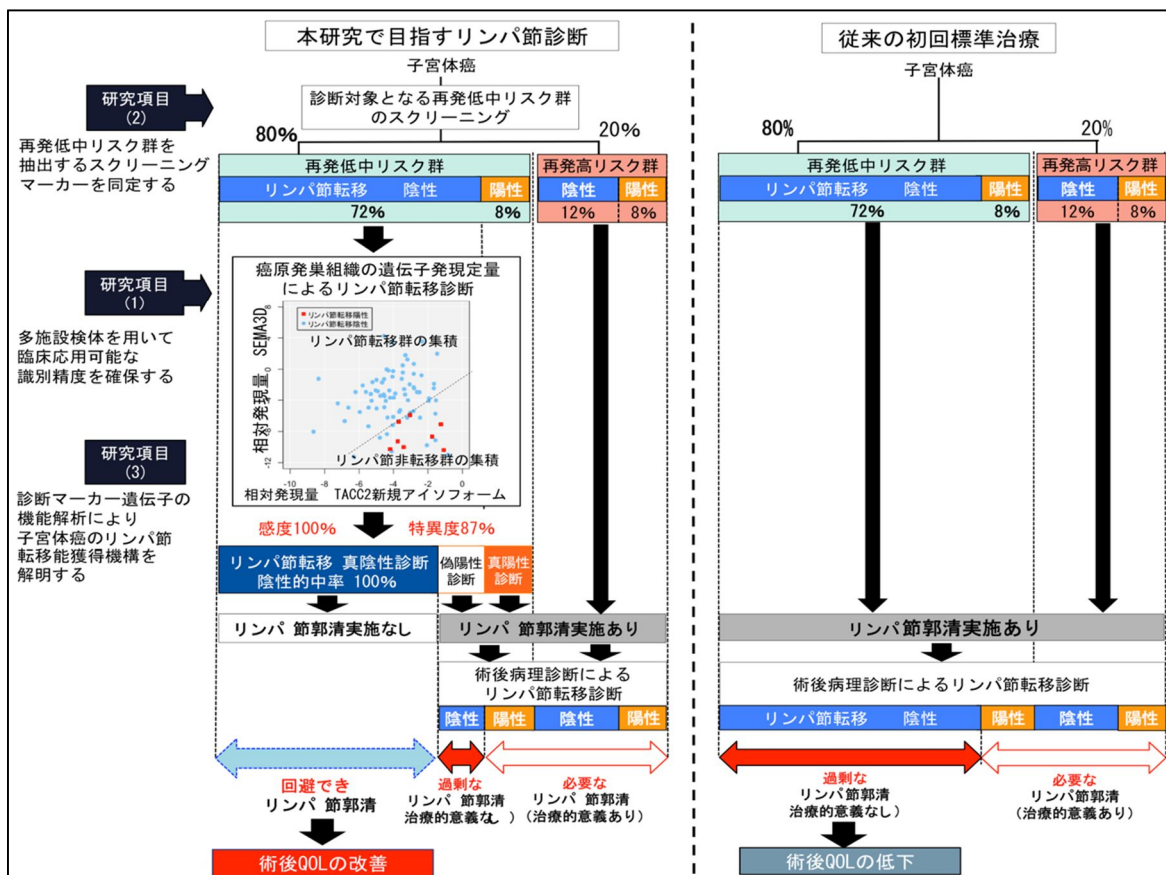
研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮体癌 リンパ節転移 バイオマーカー ロングリードシーケンス 個別化医療

1. 研究開始当初の背景

本研究の最終目的は、子宮体癌のリンパ節転移診断法を実用化し、術後の生活の質(QOL)を著しく低下させる過剰なリンパ節郭清を回避する“個別化医療”を実現することである。リンパ節転移は他のがん種と同様に重要な予後因子である。しかし、子宮体癌では確実なリンパ節転移術前診断法は確立していない。このため、リンパ節郭清を本来必要としない転移陰性症例を含む症例で診断目的にリンパ節郭清術を実施せざるを得ない。再発低中リスク群のリンパ節転移陰性患者は、子宮体癌が根治できているにもかかわらず、過剰な郭清によってリンパ浮腫等の難治性合併により術後のQOLが著しく低下している。子宮体癌は手術によって治癒が期待できるからこそ、術後合併症による女性の身体的負担、治療に伴うによる経済的負担、精神的負担および家族の負担を軽減することが考慮されるべきであり、本研究が従来の子宮体癌標準術式を、原発巣の遺伝子発現の評価に基づいて個別化するための新しい診断法となることが強く期待される。CAGE (cap analysis gene expression) 法はゲノムワイドに転写活性部位を既知、未知によらず検出・定量する方法である。申請者は子宮体癌におけるリンパ節転移予測マーカーを CAGE 法を用いて同定を試みた (MEXT 科研費基盤 C15K10732)。この結果、候補遺伝子からリンパ節転移に関連する 2 遺伝子 SEMA3D と TACC2 新規アイソフォームの同定に至った (Sci Rep. 2017 Oct 26;7(1):14160. doi: 10.1038/s41598-017-14418-5)。実臨床におけるリンパ節転移診断で問題となるのは、リンパ節転移陽性症例の偽陰性判定であり、診断結果に基づく不十分な術後治療により再発リスク増大という患者不利益を生じうる。

本マーカーは、偽陰性率が 0% となる極限 (感度 100%、陰性的中率 100%) にカットオフ値を設定した場合、子宮体癌全体の約 80% を占める再発低中リスク群においてリンパ節転移陰性症例の 88% を正しく判定し、偽陽性率はわずか 12% であった (業績 1)。次に CAGE 解析データを再検証した結果、再発低中リスク群と再発高リスク群を識別するスクリーニングマーカー候補遺伝子として複数のタンパクコーディング遺伝子が抽出できた。これらはリンパ節郭清を必要とする再発高リスク群を除外し、診断対象である再発低中リスク群を高精度に抽出することで、リンパ節転移診断マーカーの識別精度を向上させうる可能性があり、その同定が新たな課題となっている。



2. 研究の目的

本研究では、先行研究で同定した子宮体癌リンパ節転移診断マーカーの精度を補完する機能解析を実施し、高精度な診断法の開発を目的とする。バイオマーカーに関連したリンパ節転移機構および関与する遺伝子群が解明できれば、これら

の遺伝子を標的とした将来的な創薬開発も期待できる。

近年子宮体癌の罹患数は増加傾向にあり、治療後の女性の社会復帰の必要性も強く望まれている。そこで術後の QOL の維持、向上のためには適切な術式選択による個別化医療が実現されるべきであり、本研究が従来の標準治療を“女性にやさしい個別化医療”に変えるための新しい基準になることが強く期待される。我々が目指す「子宮体癌リンパ節転移診断法」は、転移リンパ節を同定し判定するのではなく、癌原発巣の遺伝子発現を定量しリンパ節転移の有無を評価する方法である。これは他のリンパ節転移診断法とは全く異なる世界初の手法である。さらに従来法と比較して高い診断精度を有し、診断キットの実用化が実現できれば簡便かつ広く一般臨床で実施可能な診断法となりうる。また、転移診断マーカーとしての候補遺伝子の抽出においては、他研究においてもマイクロアレイを用いて様々な同定が試みられてきた。これらの場合では設定した既知の遺伝子のみが検出・定量可能であるが、本研究では CAGE 法によりゲノムワイドに転写活性部位を検出・定量し、マイクロアレイでは捕捉しえない未知の遺伝子をも含む網羅的な解析を実行した。この結果、イントロンに転写開始点を有する新規遺伝子も含むバイオマーカー候補遺伝子を世界で初めて同定しており、これらのマーカー遺伝子と子宮体癌細胞のリンパ節転移能との関連性が解明できれば、今後の創薬開発にも寄与しうる可能性がある。

マーカーの 1 つは、性ホルモン関連腫瘍抑制因子である TACC2 新規アイソフォームの転写産物(mRNA)である。先行研究において、新規アイソフォームの全塩基配列の同定を試みた結果、同じ新規転写開始点を有する TACC2 の転写産物が複数確認された。そこで最も転移と関連するアイソフォームを同定することは、マーカーの精度向上およびリンパ節転移機能解明に大きく寄与しうると考えられた。しかしながら、コロニーアイソレーションによる各転写産物ごとの塩基配列決定では、網羅的配列決定は困難であることが示唆された。そこで、単一分子で長鎖塩基配列(最大 100k 塩基)を決定することを可能にする Oxford Nanopore sequencer (MinION) を使用し、ロングリードによる網羅的塩基配列決定によるアイソフォームの同定を目指す。

3. 研究の方法

● 患者検体・細胞株収集、および RNA 調製

倫理承認に従い、研究担当者 太田剛志を代表者とする「子宮体癌の個別化医療選択に資する臨床的特性に相関する遺伝子の同定」(MEXT 科研費基盤 C 17K11296) において収集された、多施設多検体の残検体を用いて検体を収集した。

各組織および子宮体癌細胞株 (JHUEM-1) は、RNeasy MiniKit(QIAEN) を使用し totalRNA を抽出した。

● シーケンシングターゲットアンプリコンの準備

PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ) によって、JHUEM-1 細胞および患者検体のトータル RNA から cDNA を調製した。LA-taqDNA ポリメラーゼによる PCR により TACC2p10 アンプリコンを調製した。TACC2 p10 FP (CCAGTTGCTGAAGGGCAGAA) および TACC2p10 RP Ex22 (TTGCCTCGAACCTGAGCAATC) は、先行研究で同定された新規転写開始点 (p10) から設計した。TACC2 p10 アンプリコンは AMPureXP ビーズで精製した。

● Oxford Nanopore sequencer (MinION) による配列同定

ナノポアシーケンシングライブラリーは、EXP-NBD103 および SQK-LSK108 (ONT) を使用して、1D ネイティブバーコードゲノム DNA で調製した。JHUEM-1 アンプリコンのライブラリーは NB01-NB03 バーコードでラベル付けし、患者検体アンプリコンのライブラリーは、NB01~NB12 バーコードでラベル付けした。シーケンスは、MinION FlowCellR9.4 を搭載した MinIONMK1b デバイスで実行した。basecall は、Albacore ONT シーケンスワークフローソフトウェア v2.3.1 と Basecall バーコーディングワークフロー (ONT) を使用して実行した。

● MinION read data の計算処理

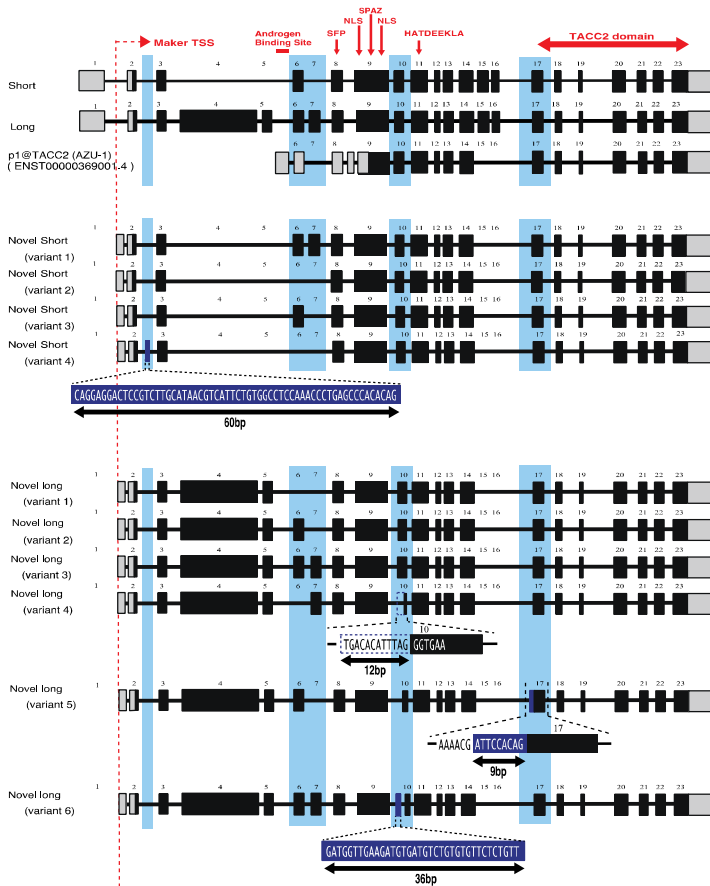
ミニマップ 2.21 とスプライスアライメントモードオプションを使用して、リードをリファレンスゲノム GRCh37 とアライメントした。エクソンプロックは、一次アライメントの重複する exon をマージすることによって生成され、同じエクソンプロックのセットを持つ一次アライメントをグループ化した。シーケンスエラーは Canuv1.722 で修正した。

修正されたリードは、スプライスアライメントモードおよび k-mer サイズ 12 (-k 12) の minimap2 でアライメントされ、増幅プライマーのターゲットとなるエクソンとオーバーラップするプライマリアライメントのみを保持した。代表的なエクソンまたは同定されたエクソンバリエーションに一致するアライメントのみをアイソフォームとしてカウントした。

4. 研究成果

先行研究で子宮体癌のリンパ節転移予測マーカーの一つとして新規転写開始点(p10)から転写される p10 TACC2 を報告した。さらに PCR 法による p10 TACC2 の増幅産物(アンプリコン)を大腸菌を用いてサブクローニングし、プライマーウォーク法およびサンガーシーケンスによって配列決定を行った結果、非常に多様な p10 TACC2 バリエーションが存在することが明らかになった(図 1)。多様なエクソン構造および数十〜百塩基前後の短い塩基配列の挿入・欠失が示唆される複雑なバリエーションの網羅的探索において、ショートリードシーケンサーを用いた従来法ではそれぞれの全長配列を再現することは限界があった。そこで本研究では、全長配列を保持したま

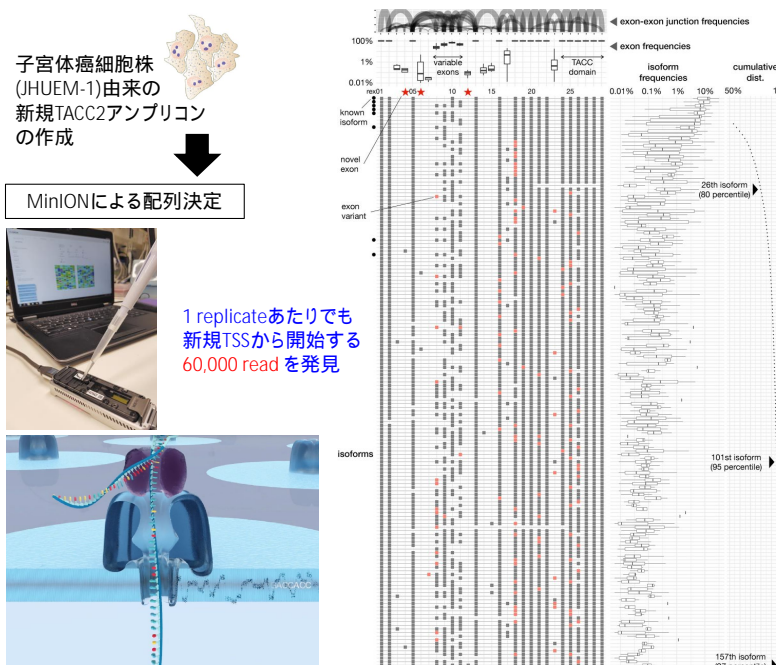
まのシーケンスを可能とする一分子長鎖シーケンサー (MinION)を用いて全長配列の網羅的探索を実行した。既報の TACC2 遺伝子のバリエーション頻度(variant usage)を基準として p10 TACC2 の新規バリエーションを決定した。そこで子宮体癌細胞株(JHUEM-1)、子宮体癌原発腫瘍組織、正常子宮内膜組織から p10 TACC2 アンプリコンを作成し、それぞれの配列解析を行い比較した。



(図1) Variant structures of p10 TACC2 isoforms
16回のサブクロニングと primer walk によるサンガーシーケンスで10種の新規アイソフォームを同定した

JHUEM-1 のシーケンス結果において、新たに 889 の新規 p10 TACC2 バリエーションを同定した(図2)。各バリエーションのリード数は、総リード数で除した usage(頻度)として正規化した。

先行研究で配列決定された既報のバリエーション(図1)の usage を閾値に設定すると、閾値以上の41バリエーションがp10 TACC2 バリエーション全体の80%以上を占めることが明らかになった。そこで既報のバリエーションを除く33バリエーションを usage(頻度)の高い新規 p10 TACC2 バリエーションとして同定した。エクソン usage は、各エクソンのリード数を総リード数で除して算出した。細胞株、癌組織、正常内膜の各検体におけるエクソン usage を比較すると、核移行シグナルと TACC domain 領域のエクソン usage はどの検体においても高く保持され、転写開始点近傍のエクソン1とエクソン3の usage も同等に高く保持されていた(図3)。

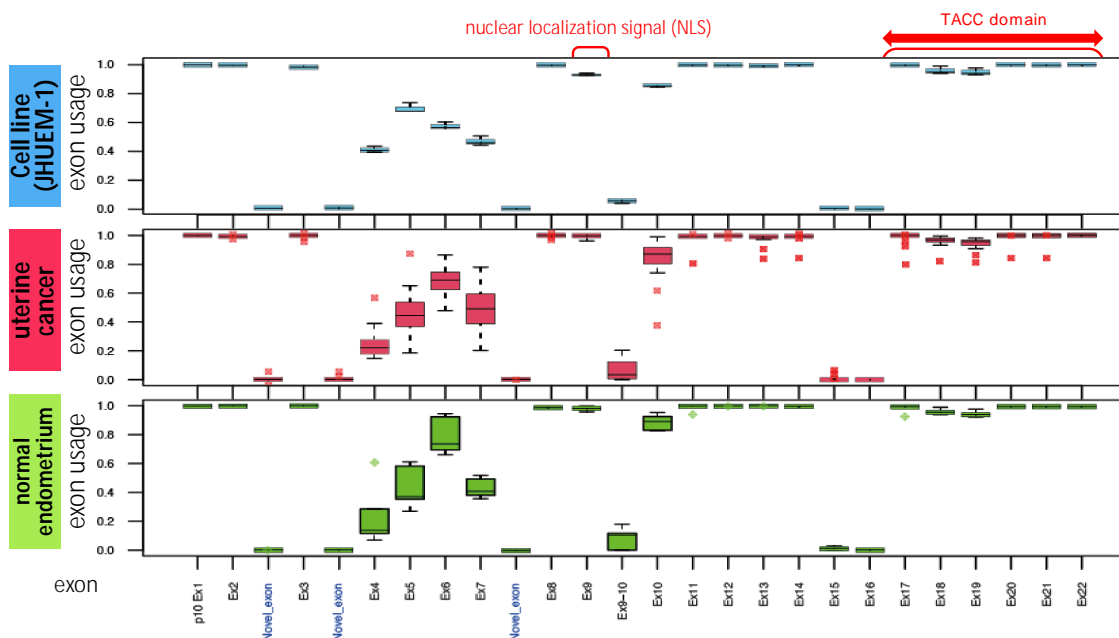


ロングリード解析では「エクソン配列の複雑な組み合わせ」、
「数十塩基以下の短鎖エクソン」を内包するリード長で解析可能

ロングリード解析では、
ショートリード解析では読めなかった部分を明らかにしえた

(図2) 889 の新規 p10 TACC2 バリエーション

さらに新規エクソン候補領域を3箇所(図2)を同定した。MinION シーケンスによる高感度で得られた新規 TACC2 の多様なバリエーションの結果は、先行研究における特異性の高いサンガーシーケンスの結果と組み合わせることによって、高い特異度で配列を決定しえた。新規 TACC2 の転写バリエーションはその由来に関わらず多様性を有しており、転写機構は従来考えられてきたものより複雑であることが明らかとなった。一方で機能ドメインは高い保存性を示しており(図3) 翻訳産物であるタンパク質は、既知の塩基配列に基づくタンパク質と機能は変わらないと考えられた。



(図3) Comparison of exon usage between cell line and tissue sample

引用文献

Sci Rep. 2017 Oct 26;7(1):14160. doi: 10.1038/s41598-017-14418-5

Sci Rep. 2021 Aug 13;11(1):16835. doi: 10.1038/s41598-021-96196-9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ito Yosuke, Terao Yasuhisa, Noma Shohei, Tagami Michihira, Yoshida Emiko, Hayashizaki Yoshihide, Itoh Masayoshi, Kawaji Hideya	4. 巻 11
2. 論文標題 Nanopore sequencing reveals TACC2 locus complexity and diversity of isoforms transcribed from an intronic promoter	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-88018-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Emiko Yoshida, Yasuhisa Terao, Yosuke Ito, Yuta Ueno, Masayo Ozawa, Tomoyasu Kato, Hisamori Kato, Kazunari Fujino, Takashi Hirayama, Maiko Yamaguchi, Satoru Takeda, Atsuo Itakura
2. 発表標題 Validation of ethnic difference in novel predictive biomarker of lymph node metastasis for uterine cancer : International joint research with Russia
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kaidiliayi Sulidan, Yasuhisa Terao, Yosuke Ito, Emiko Yoshida, Shiori Sakayori, Atsuo Itakura
2. 発表標題 Identification of novel companion biomarkers to discriminate the risk of recurrence for endometrial cancer
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Ito, Yasuhisa Terao, Emiko Yoshida, Shiori Sakayori, Atsuo Itakura
2. 発表標題 Novel initiatives for clinical application: intraoperative-prediction of lymph node metastasis for uterine cancer using isothermal nucleic acid amplification technology
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshida Emiko, Terao Yasuhisa, Ito Yosuke, Ota Tsuyoshi, Ogishima Daiki, Kaneda Hiroshi, Kusunoki Soshi, Fujino Kazunari, Hirayama Takashi, Kato Hisamori, Takeda Satoru, Itakura Atsuo
2. 発表標題 Novel initiatives for clinical application: Intraoperative-prediction of lymph node metastasis for uterine cancer using isothermal nucleic acid amplification technology
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshida Emiko, Kengo Usui, Yosuke Ito, Yuta Ueno, Masayo Ozawa, Shuko Nojiri, Yasushi Kogo, Tomoyasu Kato, Takashi Ohtsu, Hisamori Kato, Masayoshi Itoh, Hideya Kawaji, Yasuhisa Terao
2. 発表標題 Novel initiatives for intraoperative assessment of lymph-nodes metastases in endometrial cancer: one-step isothermal nucleic acid amplification based on mRNA expression of primary tumor
3. 学会等名 21st European Congress on Gynaecological Oncology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshida Emiko, Kengo Usui, Yosuke Ito, Yuta Ueno, Masayo Ozawa, Shuko Nojiri, Yasushi Kogo, Tomoyasu Kato, Takashi Ohtsu, Hisamori Kato, Masayoshi Itoh, Hideya Kawaji, Yasuhisa Terao
2. 発表標題 Development of novel diagnosis method of uterine cancer using lymph node metastasis predictive biomarker for more personalized lymphadenectomy
3. 学会等名 The 6th Biennial Meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺尾泰久
2. 発表標題 子宮体癌原発巣の遺伝子発現に基づく術中リンパ節転移診断
3. 学会等名 第60回日本産婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 E. Yoshida, Y. Terao, Y. Ito, T. Ota, M. Nojima, D. Ogishima, H. Kaneda, S. Kusunoki, K. Fujino, T. Hirayama, K. Usui, M. Itoh, H. Kawaji, A. Itakura, S. Takeda
2. 発表標題 Validation of clinical efficacy of lymph node metastasis predictive biomarker and development of rapid diagnosis method for uterine cancer
3. 学会等名 17th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masyoshi Itoh, Yosuke Ito, Hideya Kawaji, Emiko Yoshida, Shohei Noma, Yoshihide Hayashizaki, Yasuhisa Terao
2. 発表標題 Whole stretch sequencing of various alternative forms from TACC2 gene by MinION sequencer
3. 学会等名 Advances in Genome Biology and Technology (AGBT) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yosuke Ito, Yasuhisa Terao, Emiko Yoshida, Atsuo Itakura
2. 発表標題 Searching comprehensive transcript of sex hormone related gene TACC2 using MinION Nanopore sequencer
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Emiko Yoshida, Yasuhisa Terao, Yosuke Ito, Tsuyoshi Ota, Daiki Ogishima, Hiroshi Kaneda, Soshi Kusunoki, Kazunari Fujino, Takashi Hirayama, Hisamori Kato, Satoru Takeda, Atsuo Itakura
2. 発表標題 Novel initiatives for clinical application: intraoperative-prediction of lymph node metastasis for uterine cancer using isothermal nucleic acid amplification technology
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 子宮体がんのリンパ節転移能の評価方法のためのコンパニオンマーカー	発明者 順天堂、理化学研究所、神奈川県立病院機構	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-046188	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	野島 美知夫 (nojima michio) (50198595)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	
研究分担者	金田 容秀 (kaneda hiroschi) (60445517)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	
研究分担者	太田 剛志 (ota tsuyoshi) (80407254)	順天堂大学・医学部・非常勤講師 (32620)	
研究分担者	荻島 大貴 (ogishima daiki) (90327784)	順天堂大学・医学部・先任准教授 (32620)	

	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
研究協力者	吉田 恵美子 (yoshida emiko) (90825788)	順天堂大学・産婦人科・助教 (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------