

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：18001

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06168・19K21277

研究課題名(和文) 沖縄に多発する頭部血管肉腫の、多検体RNA発現解析による腫瘍特異蛋白の網羅的探索

研究課題名(英文) Detection of tumor-specific antigen of highly prevalent angiosarcoma in Okinawa by comprehensive transcriptome analysis

研究代表者

内海 大介 (UTSUMI, DAISUKE)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40551958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：琉球大学病院皮膚科学教室で経験した約100例の血管肉腫症例の中から、3年以上の長期生存患者5例および1年以下の短期生存患者4例の2群に分け、それらのFFPE検体から抽出したRNAを用い、トランスクリプトーム解析を行った。通常トランスクリプトーム解析では凍結検体由来RNAを用いるが、我々はFFPE検体も凍結検体の遺伝子発現プロファイルと非常に高い相関を示すことを明らかにし、比較解析に十分耐えうることを示した。免疫チェックポイントに関連する遺伝子群のうちマクロファージの貪食作用抑制に関与するSIRPが長期生存患者群で統計学的に有意に低いことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管肉腫は高齢者に好発する疾患であり、高齢化社会の進展と共に本邦でも患者数が増加している。一方で全悪性腫瘍の0.01%程の希少な悪性腫瘍であるため、大規模な臨床試験が行われておらず、エビデンスレベルの高い治療方法は限られているのが現状である。今回の研究により、短期および長期生存患者腫瘍の群間に、免疫チェックポイントに関連する遺伝子群のうちSIRP発現に統計学的に優位な差があることを見出した。血管肉腫の病態におけるSIRPの役割を更に検討することで、今後増加が予測される頭部血管肉腫に対する免疫チェックポイント阻害剤などの分子標的薬を含む新たな治療法導入の足がかりとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We performed differential gene expression analysis between angiosarcoma tumor samples obtained from 5 long-term survivors (> 3 years) and 4 short survivors (< 1 year) based on the transcriptome data. RNA extracted from FFPE samples were used for the transcriptome analysis as we discovered the high correlation between gene expression profile of frozen and FFPE samples. Among genes associated with immune checkpoint, SIRP, which inhibits macrophage phagocytic activity, was significantly lowly expressed in long-term survivors.

研究分野：皮膚科学

キーワード：血管肉腫 バイオインフォマティクス 次世代シーケンサ 免疫チェックポイント阻害剤 SIRP CD4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

沖縄県は頭部血管肉腫の好発地域である。琉球大学での疫学調査では、沖縄県内の過去 15 年間の年平均発症率は 4.3 人であった。140 万人程の県民人口より計算した沖縄県の発症率は、日本の他地域と比較し 3~5 倍程度高い。琉球大学病院皮膚科における頭部血管肉腫患者の生存期間中央値は約 1.2 年、5 年生存率は 9.6%と、ヒトの癌腫の中でも極めて予後不良な悪性腫瘍である。北里大学の報告では近年、患者数が増加傾向にあり、琉球大学でも同様の傾向が見られ、今後は患者数がさらに増加することが予測される。頭部血管肉腫は全悪性腫瘍の 0.01%程の希少な悪性腫瘍であり、大規模な臨床試験が行われておらず、エビデンスレベルの高い治療方法は限られているのが現状である。頭部血管肉腫に使用可能なマルチキナーゼ阻害薬であるパゾパニブも、効果は限定的である。抗 VEGF 受容体抗体ベバシズマブもパクリタキセルとの併用で、上乘せ効果がなかったと報告されている。これら薬剤の標的分子の他に、頭部血管肉腫の腫瘍形成のメカニズムにおいて中心的役割を果たす異なる分子が存在することを示唆している。

2. 研究の目的

頭部血管肉腫の腫瘍特異的蛋白を同定することが主眼である。本研究の成果を頭部血管肉腫の病態の解明の端緒とすることを目標とする。

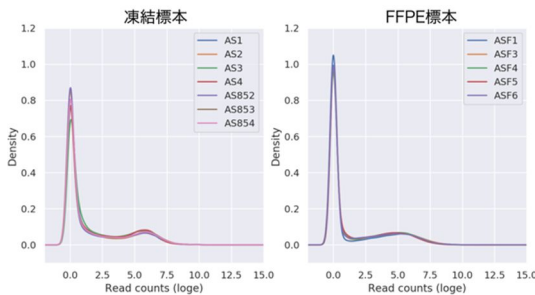
3. 研究の方法

血管肉腫に高発現、かつ正常組織に低発現な治療標的として適切な抗原選択を行うために、両者の遺伝子発現変動解析を行う。頭部血管肉腫は、病巣拡大が早く、遠隔転移や再発の頻度が高い特徴的な臨床症状を呈する。他癌腫と比較することで、その臨床的特徴の病理学的機序の背景を明らかにする。毛細血管拡張性肉芽腫や、やはり沖縄に多いカボジ肉腫などの血管内皮の増殖性腫瘍の凍結保存検体を利用し、これもトランスクリプトーム解析を行い、頭部血管肉腫との差分を行い、腫瘍性増殖に関与する分子群の同定を試みる。上記の発現変動解析には Deseq や edgeR などの専用解析ライブラリや Lasso 回帰、主成分分析の因子負荷量計算などによる統計解析など、複数の手法を用いて解析を行う。さらに遺伝子発現に統計学的な有意差を持つ遺伝子群についてパスウェイ解析を行い、血管肉腫の腫瘍化に関連する生物学的経路を探索する。上記の発現変動解析で得られた腫瘍特異的遺伝子の発現をリアルタイム PCR で再検証し、蛋白発現の局在性を免疫染色で確認する。次世代シーケンスデータは、遺伝子発現解析のみならず発現している遺伝子 mRNA の配列情報の解析も同時に行うことが可能である。副次的な解析として、血管肉腫に共通する遺伝子変異の探索によるドライバー変異の同定も期待できる。またシーケンスデータに含まれるヒト遺伝子以外の病原体由来 mRNA を解析することで、腫瘍原性に関わる可能性のある新たな外来性の病原体やウイルスのゲノムの検出の可能性もありうる。

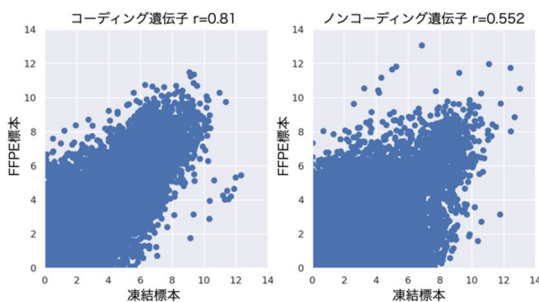
4. 研究成果

血管肉腫 FFPE 組織検体の利用可能性の検討

琉球大学病院皮膚科学教室にはこれまでに約 100 例の血管肉腫症例の蓄積がある。生検組織は主に FFPE 標本が大多数であり、凍結標本は比較的数が少ない。トランスクリプトーム解析では、凍結組織抽出 RNA が通常用いられるが、解析症例を増やすためには FFPE 標本を利用する必要がある。FFPE 標本由来のトランスクリプトデータが利用可能かを担保するために、凍結および FFPE 標本由来のトランスクリプトデータのクオリティを確認した。凍結標本と FFPE 標本のシーケンスデータの各遺伝子リードカウントの分布は両者で若干の違いがあった。両データ間で正規化を行い、その上で相関係数を算出した。両データ間で、コーディング遺伝子のみに着目すると、相関係数は 0.81 と強い相関を示したが、ノンコーディング領域では、相関係数は 0.552 と低い相関を示した。このことから血管肉腫の FFPE 腫瘍組織検体も、コーディング領域に限定して解析を行うのであれば、十分利用可能であると考えられた。



凍結標本と FFPE 標本の遺伝子ごとのリードカウント数の分布

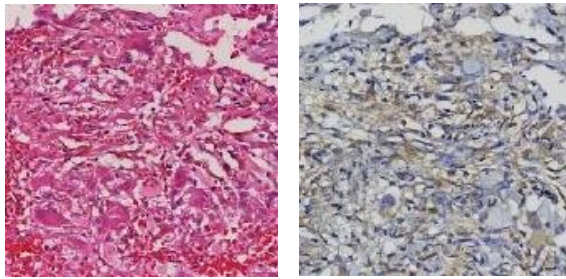


凍結標本と FFPE 標本の遺伝子発現の相関

長期生存および短期生存の血管肉腫患者腫瘍組織の遺伝子発現変動解析

教室に蓄積された血管肉腫症例から生存期間が 3 年以上の長期生存症例 5 例、生存期間が 1 年以下の予後不良群 4 例を抽出し 2 群に分け遺伝子発現変動解析を行った。解析に用いたトランスクリプトデータは FFPE 標本由来の RNA を使用した。この中で、免疫チェックポイントに関連する遺伝子群のうち SIRP が、短期生存群において統計的に有意に高かったことが明らかとした。マクロファージに発現する SIRP と腫瘍細胞に発現する CD47 タンパク質が結合することによりマクロファージの貪食作用が抑制されることが知られている。現在、複数の腫瘍組織の SIRP の免疫染色を進めている。今後、これらの遺伝子に着目し、頭部血管肉腫に対するチェッ

クボイント阻害剤などの分子標的療法の足がかりとなる研究をすすめる。



長期生存患者腫瘍組織の HE 染色と SIRP 免疫染色像

血管肉腫とカポジ肉腫の遺伝子発現変動解析

カポジ肉腫は HHV8 感染者に生じる脈管系腫瘍である。沖縄県、特に宮古島ではカポジ肉腫の発症率が非常に高いことが明らかになっている。血管肉腫はカポジ肉腫と同様に脈管系の腫瘍であるが、その生命予後はカポジ肉腫と比較し非常に悪い。生命予後は異なるが、組織型が類似するこれらの腫瘍の遺伝子発現変動解析を行い、その要因を検証した。これらの2腫瘍の間で、統計学的に有意に発現の差があった遺伝子をもとに、エンリッチメント解析を行った。血管肉腫では免疫応答に関連する遺伝子発現が低く、血管肉腫の悪性度の高さは、腫瘍細胞の免疫反応からの回避に起因する可能性が示唆された。

| パスウェイ | adj.P値 | 遺伝子数 |
|-----------------------------------------|----------|------|
| Immune system process | 6.76E-73 | 602 |
| Immune response | 1.60E-60 | 466 |
| Cellular response to chemical stimulus | 8.52E-54 | 550 |
| Immune effector process | 3.84E-49 | 285 |
| Response to stress | 2.34E-48 | 641 |
| Response to organic substance | 7.92E-47 | 539 |
| Cell activation | 1.81E-46 | 315 |
| Cellular response to organic substance | 2.47E-45 | 469 |
| Cell surface receptor signaling pathway | 4.27E-44 | 500 |
| System development | 1.01E-43 | 680 |
| Biological adhesion | 5.32E-43 | 299 |
| Defense response | 1.44E-42 | 359 |
| Cell adhesion | 3.69E-42 | 296 |
| Response to external stimulus | 5.26E-40 | 391 |
| Leukocyte activation | 7.84E-40 | 277 |

血管肉腫組織で有意に発現が低かった遺伝子群のエンリッチメント解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Tamanaha-Nakasone Ayumi, Uehara Karina, Tanabe Yasuka, Ishikawa Haruna, Yamakawa Natsuko, Toyoda Zensei, Kurima Kiyoto, Kina Shinichiro, Tsuneki Masayuki, Okubo Yuko, Yamaguchi Sayaka, Utsumi Daisuke, Takahashi Kenzo, Arakawa Hirofumi, Arasaki Akira, Kinjo Takao | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 K1 gene transformation activities in AIDS-related and classic type Kaposi 's sarcoma: Correlation with clinical presentation | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 6416 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-42763-0 | 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 - |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1. 著者名 Arakawa Nami, Utsumi Daisuke, Takahashi Kenzo, Matsumoto-Oda Akiko, Nyachieo Atunga, Chai Daniel, Jillani Ngalla, Imai Hiroo, Satta Yoko, Terai Yohey | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Expression Changes of Structural Protein Genes May Be Related to Adaptive Skin Characteristics Specific to Humans | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Genome Biology and Evolution | 6. 最初と最後の頁 613 ~ 628 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1093/gbe/evz007 | 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13件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

| |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 山口 さやか, 上原 遥, 兼島 明子, 伊藤 誠, 松尾 雄司, 佐久川 裕行, 山城 充土, 深井 恭子, 岡本 有香, 宮城 拓也, 林 健太郎, 安村 涼, 内海 大介, 新嘉喜 長, 山本 雄一, 高橋健造 |
| 2. 発表標題 2018年度琉球大学医学部皮膚科外来紹介患者のまとめ |
| 3. 学会等名 日本皮膚科学会第87回沖縄地方会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 山口さやか, 伊藤誠, 内海大介, 宮城拓也, 山本雄一, 高橋健造 |
| 2. 発表標題 SCN9A遺伝子異常による肢端紅痛症患者に対するラコサミドの有効性と安全性の評価 |
| 3. 学会等名 第43回黒潮カンファレンス |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Aoi Ohira, Sayaka Yamaguchi, Daisuke Utsumi, Kenzo Takahashi |
| 2. 発表標題 Cutaneous angiosarcoma in Okinawa located at the southernmost part of Japan. |
| 3. 学会等名 A retrospective study of 92 patients. world congress dermatology, |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|----------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 内海大介 |
| 2. 発表標題 トランスクリプトーム解析による、 HTLV1キャリアに生じた皮膚リンパ腫の鑑別 |
| 3. 学会等名 第25回 分子皮膚科学フォーラム |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--------------------------------------------|
| 1. 発表者名 小松恒太郎、苅谷嘉之、内海大介、高橋健造 |
| 2. 発表標題 機械学習により原発巣を予測した原発不明転移性皮膚悪性腫瘍の1例 |
| 3. 学会等名 第34回 日本皮膚病理組織学会学術大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|----------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Takuya Omine, Daisuke Utsumi, Sayaka Yamaguchi, Kenzo Takahashi |
| 2. 発表標題 The loss of Langerhans cells in the Pellagra lesion. |
| 3. 学会等名 International Investigative Dermatology 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 A. Ohira, S. Yamaguchi, D. Utsumi, K. Takahashi |
| 2. 発表標題 High prevalence of cutaneous angiosarcoma in Okinawa located at the southernmost part of Japan |
| 3. 学会等名 International Investigative Dermatology 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-----------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 内海大介、苅谷嘉之、大平 葵、 宮城拓也、山本雄一、高橋健造、片岡圭亮 |
| 2. 発表標題 トランスクリプトーム解析によるHTLV -1キャリアに生じた皮膚未分化大細胞型リンパ腫の鑑別 |
| 3. 学会等名 第14回日本皮膚科学会南九州地区合同地方会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 山本 雄一、上原 遥、堀口 亜有未、兼島 明子、伊藤 誠、松尾 雄司、山城 充士、深井 恭子、岡本 有香、宮城 拓也、林 健太郎、安村 涼、内海 大介、新嘉喜 長、山口 さやか、高橋健造 |
| 2. 発表標題 2017年度琉球大学医学部皮膚科外来紹介患者のまとめ |
| 3. 学会等名 日本皮膚科学会第84回沖縄地方会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|----------------------------------------|
| 1. 発表者名 内海大介、高橋健造 |
| 2. 発表標題 GTEXデータベースを用いた皮膚特異的発現遺伝子の検討 |
| 3. 学会等名 第33回 角化症研究会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 高橋健造、内海大介 |
| 2. 発表標題 ヒトと類人猿・霊長類・齧歯類の皮膚の違い |
| 3. 学会等名 第90回日本皮膚科学会山梨地方会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 大久保優子、松尾雄司、内海大介、山口さやか、山本雄一、高橋健造 |
| 2. 発表標題 有痛性の掌蹠角化と手指末節骨の骨融解がみられたOlmsted症候群の1例 |
| 3. 学会等名 第82回日本皮膚科学会東部支部学術大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 林健太郎、上間道仁、内海大介、兼島明子、松尾雄司、山口さやか、高橋健造 |
| 2. 発表標題 皮膚粘膜腫より診断に至ったCarney complexの1例 |
| 3. 学会等名 第70回日本皮膚科学会西部支部学術大会 |
| 4. 発表年 2018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 |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|