

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16481

研究課題名（和文）エンハンサー解析手法を用いた膵胆管合流異常での発癌メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of carcinogenic mechanism of Pancreaticobiliary Maljunction using enhancer analysis method

研究代表者

本間 祐樹（HOMMA, Yuki）

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：60567618

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：膵胆管合流異常が併存する胆嚢癌の発癌メカニズムを解明するため、主要な消化器領域の臨床癌検体を用いて大規模なトランスクリプトーム解析を実施した。臨床検体342例に対しRNAの抽出を行い、297例にCap Analysis of Gene Expression解析、68症例に対してRNAシーケンス解析を実施した。現在これらのデータ解析を進め、膵胆管合流異常における胆嚢癌の発癌メカニズムに関連する遺伝子やプロモーター、エンハンサーを検索している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵胆管合流異常が併存する胆嚢癌では、通常の胆嚢癌と比較して、どのゲノム領域でこういった遺伝子変異が起こり、その結果どういった遺伝子発現の差が生じているのか。このプロセスを解明するため、特異的に発現している遺伝子やエンハンサー、プロモーターを同定し、この構造を理解する。膵胆管合流異常を有する胆嚢癌の発癌メカニズムが解明され、早期診断のバイオマーカーや発癌の予防治療が見つかることで膵胆管合流異常の予後の大きな改善につながると考える。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanism of carcinogenesis of gallbladder cancer coexisting with Pancreaticobiliary Maljunction, we performed a large-scale transcriptome analysis using clinical cancer specimens from major digestive organs. RNA was extracted from 342 clinical specimens, and Cap Analysis of Gene Expression analysis was performed on 297 specimens, and RNA sequencing analysis was performed on 68 specimens. We are currently analyzing these data to identify genes, promoters, and enhancers associated with the mechanism of gallbladder carcinogenesis in pancreatic cholangiocarcinoma.

研究分野：消化器

キーワード：膵胆管合流異常 CAGE エンハンサー 胆嚢癌

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵胆管合流異常(以下 PBM)は、解剖学的に膵管と胆管が十二指腸壁外で合流する先天性の形成異常であり、日本では 1,000 人に 1 人の頻度で発生する。膵液と胆汁の逆流によって、胆道と膵臓に様々な病態が生じるとされている。その病態の一つとして胆道癌が挙げられる。PBM は日本の 50 歳以下の胆道癌患者の原因の 1 位であり、特に胆嚢癌は健常者と比較し、1,000-3,000 倍の発癌リスクがある。PBM 胆嚢は hyperplasia や、metaplasia を多く認めるため、発癌パターンは hyperplasia-dysplasia-carcinoma sequence とされる。PBM 胆嚢の発癌は膵酵素の逆流による慢性炎症が関与するとされるが、その発癌パターンや、発癌率、局在を含めたメカニズムは十分に解明されていない。

エンハンサーは遺伝子の発現を遠位から調節する領域であり、胆道癌を含めた様々な癌腫において、発癌メカニズム、腫瘍形成における重要な役割があることが報告されている。胆道癌は非常に予後不良な疾患の一つであり、国立がん研究センターの統計では胆道癌の 5 年生存率は 26.5%で、膵臓癌に次いで 2 番目に予後不良のがんであり、PBM 患者の予後に大きく寄与する。そのため PBM の発癌メカニズムの解明や、発癌を早期に同定するバイオマーカー、発癌を予防する新規治療ターゲットの同定が望まれる。

2. 研究の目的

臨床データベースと CAGE 法で得られたエンハンサー情報を含む RNA 解析情報をオミックス解析し、膵胆管合流異常が併存する胆嚢癌の発癌メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

横浜市立大学消化器・腫瘍外科学講座が所有する消化器領域(食道、胃、肝臓、胆嚢、膵臓、大腸)における臨床癌検体(癌部と、同じ患者由来の腫瘍と隣接した正常部位)を用いた。他の悪性腫瘍の既往がある症例は除外した。

新鮮凍結検体を gentleMACS™ Dissociator で粉砕、均質化し、miRNeasy Mini Kit を用いて RNA の抽出・精製を実施した。定量は NanoDrop 微量分光光度計を用いて行い、Quality control のために自動電気泳動装置 TapeStation を用いて RNA Integrity Number (RIN) を測定した。RIN 2 以上の検体に対して、高解像度に転写開始地点の情報を抽出する CAGE 解析を実施した。RIN 6 以上の検体に対しては Colibri™ Stranded RNA Library Prep Kit を用いて、転写産物の構造を同定するための RNA シークエンス (RNA-seq) 解析を実施した。CAGE、RNA-seq とともに使用 RNA 量は 1,000ng、Quality control は自動電気泳動装置 TapeStation を用いて行った。シークエンスは次世代シーケンサーを用いて行い、トリミングされたリード、マッピングされなかったリード、複数箇所にマッピングされたリード、リボソーム RNA にマッピングされたリードは解析対象から除外した。CAGE による転写開始点とエンハンサー、プロモーターに関する情報と、RNA-seq による転写産物の構造に関する情報を統合し解析を行った。

4. 研究成果

膵胆管合流異常が併存する胆嚢癌の発癌メカニズムを解明するため、食道、胃、肝臓、胆嚢、膵臓、大腸といった主要な臓器の臨床癌検体を用いて CAGE 解析 217 例、RNA-seq 解析 68 例という大規模なトランスクリプトーム解析を実施した。収集した胆嚢癌検体(=G)は 39 例(癌部 22 例、非癌部 17 例)であり、その他の臓器と比較するため、食道癌(=E) 11 例(癌部 6 例、非癌部 5 例)、胃癌(=M) 57 例(癌部 30 例、非癌部 27 例)、肝臓癌(=L) 51 例(癌部 27 例、非癌部 24 例)、膵臓癌(=P) 55 例(癌部 33 例、非癌部 22 例)、大腸癌(=C) 129 例(癌部 68 例、非癌部 61 例)を収集し、合計 342 例とした。全ての臨床検体に対し、RNA 抽出を行った。RNA 抽出後の各臓器における RIN 中央値は、癌部では食道 4.5、胃 2.7、肝臓 5.1、胆嚢 5.7、膵臓 5.5、大腸 3.4 であり、非癌部では食道 7.8、胃 2.2、肝臓 6.0、胆嚢 6.1、膵臓 2.4、大腸 5.0 であった。

RIN 2.0 以上の 297 例に対し CAGE 解析を行い、遺伝子発現、プロモーター、エンハンサーの RNA 解析情報を得た。臓器別の内訳は、食道癌 9 例(癌部 5 例、非癌部 4 例)、胃癌 49 例(癌部 27 例、非癌部 22 例)、肝臓癌 45 例(癌部 24 例、非癌部 21 例)、胆嚢癌 34 例(癌部 19 例、非癌部 15 例)、膵臓癌 44 例(癌部 28 例、非癌部 16 例)、大腸癌 116 例(癌部 62 例、非癌部

54 例)であった。RNA 抽出の段階で RNA の分解が進んでいない検体では、Library 作成後の TapeStation の波形は概ね均一であり、シークエンスでも有効なリードが得られた(図 1a)。一方で、RNA の分解が完全に進んだ検体では、TapeStation の波形が歪であり、シークエンスでもリボソーム RNA へのマッピング率が 90%程度と、解析に用いるための有効なリードが得られなかったため解析対象からは除外した。これらの結果、解析に用いることができた検体は、食道癌 7 例(癌部 4 例、非癌部 3 例)、胃癌 20 例(癌部 11 例、非癌部 9 例)、肝臓癌 45 例(癌部 24 例、非癌部 21 例)、胆嚢癌 26 例(癌部 15 例、非癌部 11 例)、膵臓癌 28 例(癌部 20 例、非癌部 8 例)、大腸癌 91 例(癌部 49 例、非癌部 42 例)の 217 例であった。

RIN 6.0 以上の 68 例に対し RNA-seq 解析を行った。臓器別の内訳は、食道癌 2 例(癌部 1 例、非癌部 1 例)、胃癌 5 例(癌部 3 例、非癌部 2 例)、肝臓癌 17 例(癌部 9 例、非癌部 8 例)、胆嚢癌 13 例(癌部 9 例、非癌部 4 例)、膵臓癌 16 例(癌部 13 例、非癌部 3 例)、大腸癌 15 例(癌部 10 例、非癌部 5 例)であった。シークエンスの結果、全

図1a. CAGE解析におけるリードの内訳

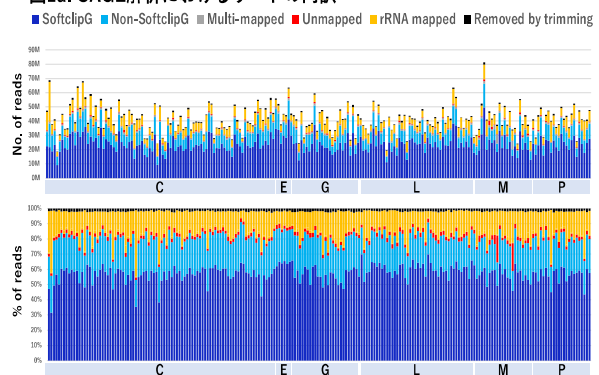
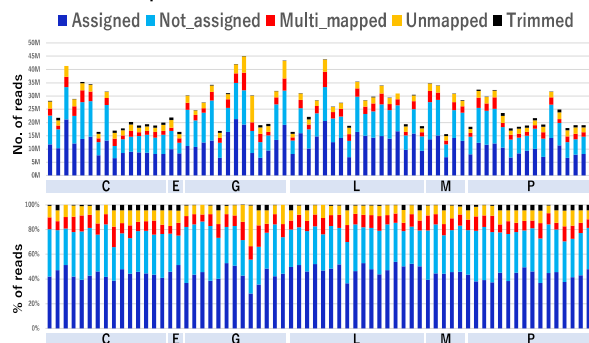


図1b. RNA-seq解析におけるリードの内訳

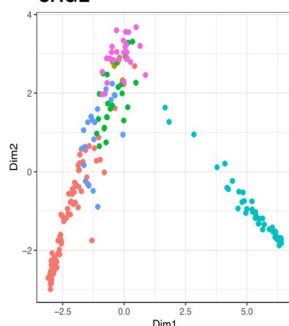


例で解析に用いるための有効なリードが得ることできた (図 1b)。

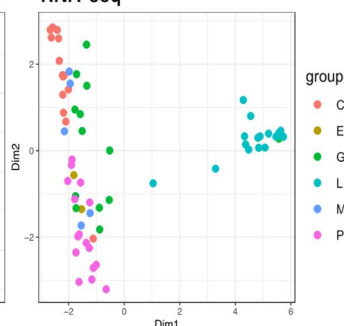
MDS (Multi Dimensional Scaling) plot

では、肝臓とその他の臓器で異なる遺伝子発現の傾向を認めた。肝臓以外の臓器では、大まかな傾向はあるものの各臓器における明瞭なクラスタリングは認めず、臓器内での多様性や、臓器間の類似性が示唆された (図 2)。癌部と非癌部を比較すると、非癌部において各臓器での検体間の類似性がより高い結果となり、臓器による機能的な違いが非癌部で

図2. MDS plot
CAGE



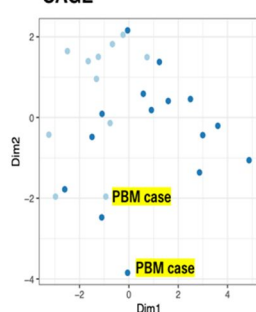
RNA-seq



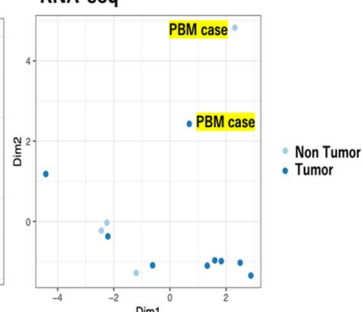
の遺伝子発現の差となって示された結果となった。癌部においては、組織型や進行度による検体間の多様性が遺伝子発現の差を反映しているものと考えられる。

胆嚢癌における遺伝子発現を見ると、膵胆管合流異常を併発したサンプルでは他の胆嚢癌とは異なる発現パターンを示した (図 3)。現在、このサンプルに特異的に発現しているプロモーターやエンハンサーと同定している。CAGE と RNA-seq で得られたデータと患者情報をひとつひとつ丁寧に確認し、統合解析することで、

図3. 胆嚢サンプル
CAGE



RNA-seq



膵胆管合流異常を伴った胆嚢の発癌メカニズムの解明や発癌の新規バイオマーカーの同定を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	平井 公也 (Hirai Tomoya)		

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
---------	---------