

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32203

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670570

研究課題名(和文) 血液細胞高精度遺伝子発現解析を用いた膵臓癌分子マーカーの探索

研究課題名(英文) Development of novel biomarkers for pancreas cancer using a high accuracy blood cell gene expression analysis.

研究代表者

小橋 元 (Kobashi, Gen)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：60270782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓癌の有用バイオマーカーを開発するために、膵臓癌罹患患者血液細胞を用いて、発癌による血液細胞の遺伝子発現状態の変化を調べた。患者17名と健常者4名の高精度大規模遺伝子発現解析(8919種類のmRNA型転写産物の量測定)を行った結果、罹患患者群と健常者群では発現パターンが異なった。群間差の大きい転写産物を絞り込んで評価することで、今後、症例と対照の高精度な弁別ができる可能性が示唆された。

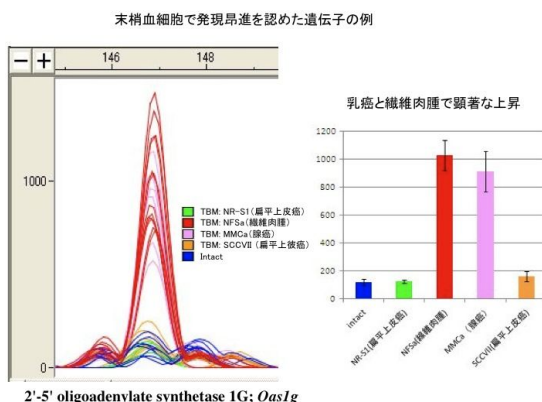
研究成果の概要(英文)：To develop novel biomarkers useful for detecting and monitoring pancreas cancer, 17 cases and 4 control were obtained. A high accuracy large-scale gene expression analysis of 8919 mRNAs revealed difference of transcriptome between the cases and controls. It is suggested that studies focusing on differentially-expressed transcripts might discriminate cases from controls with high accuracy in the future.

研究分野：予防医学

キーワード：膵がん バイオマーカー 遺伝子発現 トランスクリプトーム

### 1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は、自覚症状や健康診断からは早期発見が難しい難治性の癌である。重粒子線治療と化学療法により生存率の上昇が期待されるが、局所制御向上のためには、有効な治療効果予測・判定マーカーが必要である。申請者らは腫瘍が、がん細胞と線維芽細胞、脂肪細胞、免疫細胞などの間質細胞とで構成される疑似臓器であり、その維持には血液細胞も深く関与することに着目し、血液細胞の遺伝子発現が腫瘍細胞からの影響を受ける可能性を検討した。複数の組織型の担癌動物を用いて血液細胞への遺伝子発現影響を調べた結果、がん組織型に応じた遺伝子発現影響を示す知見が得られた(下図)。この機構の詳細は不明であるが、腫瘍組織との相互作用が直接または間接に血液細胞の遺伝子発現状態に変化を及ぼすことを示唆している。



### 2. 研究の目的

本研究では、このような発現変化の探索を、膵臓癌罹患者血液細胞を用いて行い、診断精度の高い発現変化遺伝子群を同定することで、未だ有用バイオマーカーがない膵臓癌の局所制御評価と将来の治療計画に役立てることを目指す。

### 3. 研究の方法

罹患者: 放射線医学総合研究所重粒子医科

学センター病院において重粒子線治療を受ける膵臓癌罹患者で基準を満たし、同意の得られた者。対照群: 罹患者と性・年齢がマッチ(±5歳)する健常ボランティアとする。

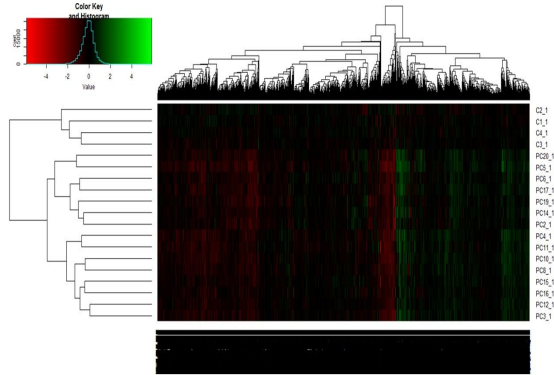
罹患者の重粒子線治療開始に先立ち行われる血液検査時に、本研究用血液 10ml の採血を行い、白血球画分の分離の後 RNA 安定化剤を添加して冷凍保管する。重粒子線治療後の経過観察のため来院する際(3ヶ月後、1年後)にも同様に 10ml の研究用血液を採血する。対照者は、罹患者と性・年齢をマッチさせて(±5歳)リクルートし、血液 10ml を採取し、同様の操作を行い保存する。

保存白血球から全 RNA を抽出し、逆転写反応による相補 DNA への変換、二重鎖化後に制限酵素切断してアダプター連結を経て、cDNA-AFLP 解析用の鋳型を調製する。上記鋳型に対して 256 通りの選択塩基組み合わせでの蛍光標識 PCR を実施し、キャピラリー型電気泳動装置による展開をおこなう。検出される増幅産物の蛍光シグナル強度から各転写産物量を測定する。同一被験者の治療前および治療後経過観察中の遺伝子発現量をグローバルノーマライゼーションに基づくパターンマッチング比較により変化程度を評価する。

### 4. 研究成果

重粒子線治療前の膵臓癌罹患者 17 名と健常者 4 名について高精度大規模遺伝子発現解析を行った。8919 種類の mRNA 型転写産物の量測定を cDNA-AFLP 変法にて行った。各検体の発現パターンを距離法にて系統評価すると、罹患者群と健常者群は別個のクラスタを形成した。特に群間差の大きい 100 転写産物に着目することで、両群の高精度な弁別が可能と考えられた。当該手法で得られた結果は、従来行った血漿由来 miRNA 解析による罹患者群検出能力よりも遙かに高感度であった。

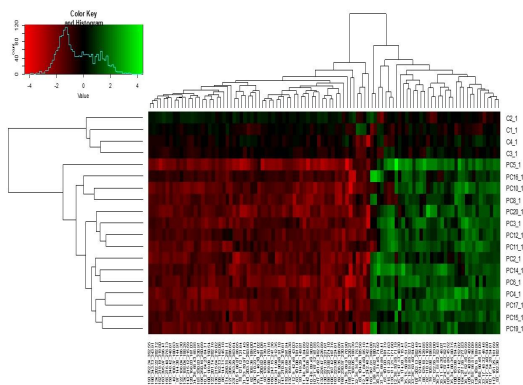
図1 罹患者 (PC) と対照群 (C) のトランスクリプトームは明確に異なる



白血球画分より抽出した全RNAを用いて、8919種類のmiRNA型転写産物をcDNA-AFLP法にて定量解析した。各転写産物量の評価を、対照平均に  
対する各検体の量比をlog2の対数として表示している。したがって対照平均に比して緑は増加、赤は減少する転写産物を表す。

従来行った解析は膵癌細胞そのものから放出される特異的 miRNA の捕捉によるバイオマーカーを期待したものであったが、今回の解析は膵癌という疾患組織が血液細胞へ及ぼす遺伝子発現変化の検出によるバイオマーカー開発を期すものである。両解析を通して得られた結果からは、罹患者血液細胞を対象として膵癌高感度バイオマーカー開発研究を進展させることの重要性が判明した。

図2 発現変化の大きい上位100転写産物



今後は、解析例数を増やすことに加えて重粒子線治療後に提供された血液検体も用いて転写産物の一層の絞り込みを行うことで、本手法の膵臓癌分子マーカーとしての有用性を確立していきたい。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

佐藤真輔, 有江文栄, 小橋 元: ゲノムシーケンシング及びエクソームシーケンシングによる臨床診断の普及促進に関する課題と対応. 社会医学研究 33 (1) : 25-34, 2016.

〔学会発表〕(計1件)

齋藤俊行, 林 昭子, 臺野和広, 今岡達彦, 西村まゆみ, 小橋 元, 道川祐市, 小池幸子, 島田義也, 福村 龍太郎. がん罹患者の血液細胞に見出された遺伝子発現変化. 第37回日本分子生物学会年会(横浜・平成27年1月)

〔図書〕(計1件)

小橋 元: CHAPTER 1 DNA の構造と機能. 櫻井晃洋訳編, コルフ臨床遺伝医学(原書第4版)(Korf BR, Irons MB 「Human Genetics and Genomics, Fourth Edition」 John Willey & Sons, Ltd の翻訳)丸善出版, pp3-20, 2014.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

小橋 元 (KOBASHI, Gen)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：60210782

### (2)研究分担者

齋藤 俊行 (SAITO, Toshiyuki)

放射線医学総合研究所・重粒子医科学セン

ター・研究員

研究者番号：90205667