

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09417

研究課題名（和文）次世代シーケンサーを用いた脂腺癌の遺伝子解析と発症メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of gene analysis and the onset mechanism of sebaceous gland carcinoma using the next-generation sequencer

研究代表者

渡辺 彰英（Watanabe, Akihide）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：80516188

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：我々は眼瞼脂腺癌6例より独自の方法でRNA、DNAの抽出を行い、それらを用いて次世代シーケンサーにて解析を行った。RNAの解析では正常組織と比較し、腫瘍組織で特異的に発現している遺伝子を抽出し、発癌機構に関連している可能性のあるpathwayを検出できた。エクソーム解析と合わせて、脂腺癌の分子レベルでのメカニズム解析に貢献できると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

眼瞼脂腺癌は眼瞼原発悪性腫瘍の一つである。治療は外科的切除が第一選択であり、全身転移例では放射線治療や化学療法が選択されるが、確立された保存的治療法はないのが現状である。それは眼瞼脂腺癌が希少疾患であり、遺伝子解析が進んでいないことによる。我々がやっている脂腺癌の遺伝子解析は眼瞼脂腺癌の保存的治療法の同定へのきっかけになる可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We extracted RNA and DNA from 6 sebaceous carcinoma cases and analyzed them by next generation sequencer. We compared normal tissue with tumor tissue and detected genes that specifically expressed in tumor tissues and identified the pathway that are involved in the development of sebaceous carcinoma. With exome analysis, we presume it will become possible to detect the mechanisms associated with sebaceous carcinoma.

研究分野：眼形成眼窩外科

キーワード：脂腺癌 次世代シーケンサー 遺伝子解析 発がんメカニズム RNA解析 エクソーム解析

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

本邦における眼瞼原発悪性腫瘍としては基底細胞癌、脂腺癌、扁平上皮癌の頻度が高い。欧米では、脂腺癌が眼瞼悪性腫瘍に占める割合は約5%程度であると報告されている。

眼瞼脂腺癌の肉眼的所見は大きく二つのタイプに分けられ、黄色調の結節状の病変として眼瞼結膜や眼瞼縁に隆起してくる nodular type とびまん性の眼瞼肥厚や眼瞼炎、慢性結膜炎のような所見を認める diffuse type がある。疫学的には人種差が知られており、眼瞼脂腺癌は白色人種よりもアジア人に多いことが知られている。また、臨床所見についてはアジア人では nodular type が diffuse type よりも多いが、白色人種では diffuse type と nodular type はほぼ同じ頻度であるとされている。基底細胞癌は紫外線がリスクの一つであるとされているが、眼瞼脂腺癌の発症リスクは特定されていない。眼瞼脂腺癌の人種差、臨床像の違い、発癌機構には何らかの遺伝子背景があると推測される。脂腺癌の治療において、腫瘍の完全切除がスタンダードとなっており、術後の再発や転移を予防するための術後補助化学療法は標準的には行われていない。希少疾患である脂腺癌の次世代シーケンサー(NGS)による網羅的遺伝子解析は報告が少なく、分子生物学的な検討がこれまでほとんど行われておらず、エビデンスのある抗癌剤使用法が存在しない。

### 2. 研究の目的

日本人における脂腺癌の網羅的遺伝子解析はまだ行われておらず、その欧米人と異なる特徴から、基礎的な癌研究の観点からも国際的に発信する価値があると考えられる。

そこで本研究では、NGSを用いた日本人の眼瞼脂腺癌の網羅的遺伝子解析を通じて臨床病型の違いの遺伝子的解明、発癌、増殖及び転移に関わる細胞内伝達機構を明らかにし、予後推測および非観血的治療法の同定を目指す。

### 3. 研究の方法

#### 対象

対象は京都府立医科大学において、眼瞼脂腺癌に対し遊離瞼板移植術を施行し、かつ、腫瘍組織と正常組織である健側瞼板の余剰検体が入手できた症例9例(女性:7例、男性:2例、手術時平均年齢:77.3±11.7歳)である。

#### RNA、DNAの抽出方法

得られた9例の腫瘍組織と正常組織は、まず独自の凍結破砕を行った。その後、AllPrep DNA/RNA Mini Kit® (Qiagen社)にてそれぞれDNAとRNAを抽出した。抽出したDNAはQubit® Assays (Life technologies社)とNano Drop (Thermo Scientific社)を用いて濃度を測定した。抽出したRNAはAgilent 2100 BioAnalyzer® (Agilent Technologies社)を用いて品質の確認を行った。

#### NGS解析

DNAはQubitとNano Dropの結果より、またRNAはRNA 6000 Pico kitにて測定したRNA Integrity Number (RIN)値を基に、シークエンスに用いる検体を選定した。9ペアの正常組織、腫瘍組織のうち、DNA、RNAの抽出に共に成功して品質の良かった6ペアを選抜して、RNA-Seq解析、エクソーム解析を行った。

選定した症例は男性:1例、女性:5例、平均年齢:73.2±12.4歳、左眼:4例、右眼:2例、腫瘍タイプはnodularタイプ:5例、diffuseタイプ:1例であった。平均腫瘍径は8.5±4.9mmであった。検体の平均重量は腫瘍組織:10.2±4.8mg、正常組織:14.3±7.0mgであった。

DNAの濃度は正常組織:32.9±7.0nmol/l、腫瘍組織:35.8±11.0nmol/lであった。エクソ-

ム解析のための DNA ライブラリー作製には、SureSelect XT Human All Exon(アジレント・テクノロジ社)を用いて行った。

一方、RNA の濃度は正常組織:  $3.7 \pm 2.1$  ng/ul、腫瘍組織:  $9.4 \pm 12.5$  ng/ul であった。総量は正常組織:  $84.3 \pm 48.3$  ng、腫瘍組織:  $212.8 \pm 289.4$  ng、RIN 値は正常組織:  $7.2 \pm 0.6$ 、腫瘍組織:  $7.4 \pm 0.8$  であった。RNA-Seq シーケンスライブラリーの作製は SMART-Seq(クロンテック社)にて施行した。シーケンスデータを取得する NGS は、共に NovaSeq6000(イルミナ社)を用いた。

#### 4. 研究成果

非常に硬い瞼板組織は、従来の破碎方法では安定して DNA、RNA の核酸抽出を行うことは困難であった。今回の研究により、我々は独自の方法で瞼板組織より安定的かつ比較的簡便に、品質の良い DNA、RNA の抽出を可能とする方法を確立した。

また、我々は選定した全検体のシーケンスデータの取得に成功した(表 1)。まず、先行して RNA-Seq のデータ取得から行い、得られたシーケンスライブラリーのリード数は正常組織:  $86.8 \pm 5.7$ M、腫瘍組織:  $83.5 \pm 14.0$ M であった。また、リードの品質を示す Q30R1, Q30R2 は正常組織:  $92.1 \pm 0.7\%$ ,  $91.7 \pm 0.4\%$ 、腫瘍組織:  $91.4 \pm 0.6\%$ ,  $91.3 \pm 0.3\%$  であった。一方、DNA のシーケンスライブラリーのリード数は正常組織:  $88.5 \pm 7.0$  M、腫瘍組織:  $247.0 \pm 14.4$  M であり、Q30R1, Q30R2 は正常組織:  $93.1 \pm 0.1\%$ ,  $91.7 \pm 0.4\%$ 、腫瘍組織:  $93.0 \pm 0.1\%$ ,  $91.4 \pm 1.5\%$  であった。特に、腫瘍組織特異的な変異の同定に必要な精度を確保するために、正常組織の約 3 倍近くのデータ量を腫瘍組織で取得成功した意義は大きい(表 1)。

このうち、我々は先行して入手した RNA-Seq から解析を開始した。まず我々は、クオリティの確認(FastQC 0.11.9)後に不良 read を除外し、STAR(Spliced Transcripts Alignment to a Reference)により最新のゲノム情報に全 read をマッピングし、RSEM(RNA-Seq by Expectation-Maximization)にて発現量を解析するという、解析パイプラインの構築を行った(図 1)。

今回データ取得を行った全 6 検体・12 サンプルより、最新版のアノテーション情報を用いた 6 万 164 の遺伝子の RNA-Seq データの取得に成功した。このうちプレ解析でクオリティーコントロールを行い、約 2 万 6 千の遺伝子を正常組織と腫瘍組織の検定対象とした。

統計的に有意な遺伝子を抽出した結果、癌組織で特異的に発現している約 300 個の遺伝子を抽出した。それらをオンライン解析ツール「DAVID6.8」により解析したところ「has\_04110:cell cycle」, 「has\_04115:p53 signaling pathway」等との有意な関連が浮上し、癌に関連している pathway を確実に検出できた。

また、RNA-Seq のプレ解析に続いて、脂腺癌特異的な遺伝子の変異を同定する事で、脂腺癌関連候補 pathway の絞り込みのために DNA のエクソーム情報の解析を実施している。本研究で得られた網羅的遺伝子の発現・変異情報は、眼瞼脂腺癌の病態解明、予後因子、非観血的治療法の同定へ一助となると考えられる。

表 1: NGS のクオリティ

		リード数(M)	Q30R1 (%)	Q30R2 (%)
RNA	正常組織	$86.8 \pm 5.7$	$92.1 \pm 0.7$	$91.7 \pm 0.4$
	腫瘍組織	$83.5 \pm 14.0$	$91.4 \pm 0.6$	$91.3 \pm 0.3$
DNA	正常組織	$88.5 \pm 7.0$	$93.1 \pm 0.1$	$91.7 \pm 0.4$
	腫瘍組織	$247.0 \pm 14.4$	$93.0 \pm 0.1$	$91.4 \pm 1.5$

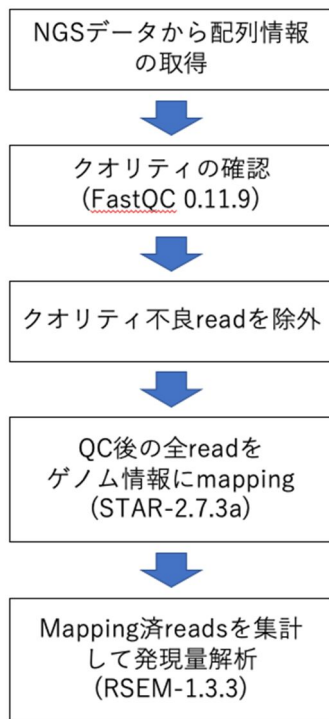


図 1 :RNA-Seq 解析パイプライン

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 福井歩美、渡辺彰英、中山知倫、米田亜規子、外園千恵	4. 巻 124
2. 論文標題 眼瞼脂腺癌の臨床像と再建術後合併症の検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本眼科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 410-416
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 渡辺 彰英
2. 発表標題 眼瞼悪性腫瘍の外科的治療
3. 学会等名 第73回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺 彰英
2. 発表標題 眼瞼脂腺癌の再建術式と再発、転移との関連
3. 学会等名 第37回日本眼腫瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥 拓明、渡辺 彰英
2. 発表標題 眼瞼脂腺癌症例の転移、術後局所再発に関する因子の検討
3. 学会等名 第34回日本眼窩疾患シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸橋歩美、渡辺彰英、中山知倫、山中亜規子、外園千恵
2. 発表標題 眼瞼脂腺癌に対する再建術後の合併症の検討
3. 学会等名 第42回日本眼科手術学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山知倫、渡辺彰英、山中亜規子、外園千恵
2. 発表標題 当院における眼瞼脂腺癌61症例の臨床像と組織学的検討
3. 学会等名 第36回日本眼腫瘍学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakayama T, Watanabe A, Sotozono C
2. 発表標題 Heavy-Ion Radiotherapy for 10 Cases of Lacrimal Gland Carcinoma
3. 学会等名 American Academy of Ophthalmology 2018 (国際学会)
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
研究分担者	福岡 秀記  (Fukuoka Hideki)  (00381963)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教   (24303)	

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