

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09194

研究課題名(和文) 膵癌EMTに関するtumor-educated plateletsの応用可能性

研究課題名(英文) Tumor-educated platelets of pancreatic cancer cases from the viewpoint of EMT status

研究代表者

服部 憲史 (HATTORI, Norifumi)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：70744051

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)：膵癌治療において、手術を行う症例、行わない症例を選別して各々に適した治療を行うことは、膵癌全体の予後向上につながる可能性がある。

本研究では血小板サンプルを膵癌担癌患者から収集し、tumor-educated platelets (TEP) に関与する遺伝子マーカーを高throughput RNA-sequenceにより解析・選定した。遺伝子Aについて、63例のTEP validation cohortを用いてその臨床病理学的特徴を検証したところ、遠隔転移を有する症例で有意に高値であった。さらに膵癌組織検体においても、遺伝子Aの発現は遠隔転移を有する症例で有意に高値であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌に対する手術介入は、疾患を根治できる唯一の方法であるが、病勢進行例への適応は、かえってADLの悪化や早期再発の原因となる。その見極めは、現存の血清マーカーや画像診断、病理診断では限界があり、選別が重要な課題である。本研究はそれに対し、新規TEPマーカーを提示することで一つの解決法を提示できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： In recent years, the concept of tumor-educated platelets (TEP) has been reported. Although platelets do not have nuclei and RNA themselves, they could be stimulated by the surrounding environment of cancer cells and uptake tumor-originated RNAs. Since tumor-educated platelets are abundant in the blood and reflect hemostasis, inflammation, immune system, and crosstalk with tumors, we tried to collect them and find potential blood molecular biological biomarkers among them in pancreatic cancer cases and detected some candidate genes by high-throughput RNA-sequencing.

Among them, we focused on the expression levels of TEP linked-gene A, and applied it to 63 another TEP samples of pancreatic cancer cases. The expression of gene A was significantly higher in cases of early distant metastasis recurrence within 1 year. It may contribute the screening test of early distant metastatic cases.

研究分野：消化器外科学

キーワード：膵癌 血小板 バイオマーカー

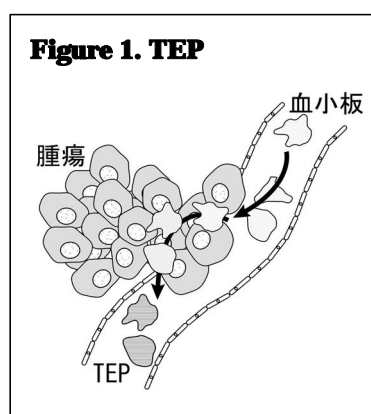
## 1. 研究開始当初の背景

### リキッドバイオプシーの活用による膵癌タイプ分類

解剖学的に組織採取が困難である膵癌のバイオマーカーについて、血液などによる非侵襲的マーカーが切望されてきた。さまざまな癌種において、血中に分泌される分子を利用する腫瘍マーカー検査 (CEA, CA19-9 など) は日常臨床で広く普及し、陽性例においては癌の進行や治療効果を知るための重要な検査である。しかし、癌の早期診断や生物学的特性の評価を目的とする検査としては不十分である。近年は腫瘍から血中に分泌される核酸を利用する試みもされており、申請時は我々も、膵癌や食道癌において血液中の **microRNA** および血液中エクソソーム由来の **microRNA** の解析による生物学的特性の同定を試みていた (Niwa Y, *J Transl Med*, 2019, Sonohara F, *Anticancer Res*, 2020)。

### 「腫瘍によって影響を受けた血小板 (tumor-educated platelets)」の臨床的意義

血小板は腫瘍からタンパク質や RNA 分子を取り込むことが最近の研究で明らかになり、さらに腫瘍の増殖や転移にも関与する可能性も指摘されている。ある種の癌細胞は血小板凝集を惹起し、次のような機序で癌の増殖や転移を促進すると考えられている (井上克枝, 血液, 2010)。(1) 活性化血小板から放出された TGF- $\beta$  により、上皮系の癌細胞に EMT が生じることで浸潤能が亢進する。(2) 血流中の活性化血小板が癌細胞に粘着し、ずり応力や免疫細胞から癌細胞が保護される。(3) 血管外浸潤の足場となる。(4) 活性化血小板から放出された血管新生因子や増殖因子が、腫瘍血管新生や癌細胞の増殖を促進する。つまり、循環血漿中に多量に存在する血小板は癌組織と相互に作用し、性質の異なる癌においては腫瘍によって影響を受けた血小板も異なる分子的特徴を持つことになると考えられる。この **tumor-educated platelets**



(TEP)を癌の診断に応用した報告がされており、担癌患者においても **EMT status** を含めた癌の性質を反映する鏡となる可能性が示されてきている (Best MG, *Cancer Cell*, 2015)。また、血小板は血液中に多量に含まれるため、これまで積極的に行われている循環血漿中の遊離癌細胞を用いた癌のタイプ診断よりも高い精度を得られる可能性がある。

## 2. 研究の目的

膵癌の治療成績向上のためには、集学的治療が不可欠である。我々の所属する名古屋大学医学部附属病院 消化器外科ではこれまでに上皮間葉転換 (EMT) が膵癌の浸潤・転移メカニズムにおいて重要な鍵となっていることを報告してきた。また、過去の豊富な臨床経験に基づいた膵癌の臨床的特徴の考察より、膵癌は「局所進展タイプ」と「遠隔転移タイプ」に大きく二分されると考えており、各々のタイプに応じた治療法の確立が求められることから EMT を膵癌のタイプ別分類に利用することを着想した。これまでも当教室は消化器癌における EMT に関連した分子生物学的機構の研究や臨床検体における発現検討などに取り組んでおり、膵癌の進展様式を分類するにあたり EMT の状態を考慮することが重要であることを明らかにしている。さらに最近、当教室において膵癌における LOX ファミリーの発現状況と予後への関与、膵癌 EMT への関わりを検討して報告してきた (Tanaka N, *Scientific Reports*, 2018)。近年、腫瘍によって影響を受けた **tumor-educated platelets** (TEP) が癌との相互作用において EMT とも関連していることが示され、TEP 内の分子プロファイルで腫瘍の性質を類推することが可能と考えられた。さらに、血小板は循環血漿中に多量に含まれているため、比較的限られた量の血液検体においても測定可能と考えられ、臨床的に将来有望なりキッドバイオマーカーとなる可能性が高い。最近、手法の改良が進み、汎用性が高まっている **single cell sequencing (SCS)** の技術は多様性・不均一性のあるサンプルから同じプロファイルを持つクラスターを抽出することが可能になっており、ごく微量サンプルからの個々の細胞の遺伝子発現状況も解析可能である。したがって、SCS を用いることで本研究の TEP を抽出し、その分子発現状況を確認するという目的は達成可能であり、上記のような経緯で本研究を立案するに至った。

これまでの膵癌をめぐる研究では、膵癌の進展およびそのタイプ別分類に重要と考えられる **EMT status** と、EMT にも関連し、癌そのものではないものの、血漿中に多量に存在し、癌との相互作用によって癌のタイプで異なる特徴を持つと考えられる“TEP 関連 RNA”に焦点をおいたものではなく、また、消化器癌の中でも浸潤・転移能の極めて高い膵癌においては、非侵襲的バイオマーカーとしての TEP 関連 RNA を活用し、EMT の見地から治療に有用な診断法の確立をめざす本研究は極めて価値が高いと考える。

### 3. 研究の方法

膵癌患者から採取された採血検体の遠心分離処理を行い、血小板が多く含まれる血漿（多血小板血漿：**platelet rich plasma**）を分離した。さらに遠心処理し、血小板のペレットを抽出した。遠隔転移のない局所進行膵癌患者、遠隔転移を有する進行膵癌患者、悪性疾患のない患者の血液検体から血小板を分離し、**SCS**による**RNA-seq (mRNA および non-coding RNA-seq)**で解析し、腫瘍特異的かつ、局所進展タイプの膵癌および遠隔転移を有する膵癌それぞれに特徴的な変化を抽出した。

#### (1) 膵癌手術症例からの血小板検体の回収

採取された全血の遠心処理で多血小板血漿 (**platelet-rich plasma**) を得た。

#### (2) High-throughput RNA sequencing

血小板検体を遠隔転移のない局所進行膵癌患者 (**n=4**)、遠隔転移を有する膵癌患者 (**n=4**) および、悪性疾患をもたない患者 (**n=4**) の血液から分離した。採取された全血の遠心処理で多血小板血漿 (**platelet-rich plasma**) を得た。さらにこの多血小板血漿から分離された血小板 (担癌患者の血小板は **TEP** を含むと考えられる) から **RNA** を抽出し、**SCS/RNA-seq** 解析 (**mRNA** および **non-coding RNA**) で網羅的な **TEP** 関連 **RNA** の発現データを得た。

#### (3) validation cohort の設定と測定

(2)で同定された候補となる **TEP** 関連 **RNA** の発現を、(2)とは異なる膵癌 (**63** 症例, **internal validation**) で検証した。当教室で治療 (手術・全身化学療法・化学放射線療法) を施行された膵癌患者から採取した血液検体を用い、**TEP** を分離した上で **TEP** 関連 **RNA** 候補を定量 **RT-PCR** 法で検出した。結果をもとに、新規マーカー候補遺伝子につき膵癌の臨床病理学的因子との関係を解析し、再発転移様式や治療反応性を予測可能な新規の非侵襲的膵癌バイオマーカーとしての可能性を探索した。

### 4. 研究成果

本研究では **TEP** に含まれる分子の網羅的解析を行い、膵癌のタイプ別分類に有用な **TEP** 関連バイオマーカーを開発し、難治性膵癌に対する個別化集学的治療に貢献することを目的として、以下の事柄を実施した。

#### (1) 膵癌手術症例からの血小板検体の回収

当科で膵疾患に対して手術予定となった患者から血小板を採取し、血小板ペレットの作成を行った。

#### (2) High-throughput RNA sequencing

血小板中の **RNA** を網羅的に解析するため、**high-throughput RNA sequencing** を行った。まず **4** 例のテストサンプルに対して **Agilent 2100** バイオアナライザ (**Agilent, CA, USA**) を用いた **quality check** を行った。**Quality check** の結果を基に、**Nugen kit** によるライブラリ調整を行った後、**RNA-seq** に用いた。**Quality Check** を行った **4** 例のテストサンプルに対して **BGI** 社の **DNBseq** で **mRNA-seq** を行い、データを得た。**4** 例のテストサンプルの **DNBseq** を用いた網羅的 **mRNA-seq** で得られたシーケンス情報はフィルタリング処理され、アダプター配列、コンタミネーションおよび低品質の配列情報は除外された。データフィルタリングの後のシーケンス配列統計学的情報から、血小板から十分な **mRNA-seq** 情報 (**6G** リード数以上) が得られることが確認され、さらに症例を拡張する方針とした。

**2019** 年 **9** 月から **2021** 年 **1** 月までに当院で治療を受けた膵疾患患者と健常人から血液検体を採取し、血小板を抽出した。このうち **31** 例の **screening** コホート **A** (膵疾患 **27** 例、健常人 **4** 例) で **high-throughput RNA-sequence** 解析を行い、膵癌患者と健常人で **mRNA** 発現が異なる遺伝子を検出した。

#### (3) validation cohort の設定と測定

**63** 例の **validation** コホート **B** (膵疾患 **56** 例、健常人 **7** 例) で、先に同定した発現が異なる遺伝子群に関して定量 **PCR** を施行し、臨床病理学的因子との関連について検討した。また同じ遺伝子群に関して、別の膵癌切除コホート **C** における **30** 例の組織検体における発現とその臨床データとの相関についても検討した。

**Screening** コホート **A** において、膵癌症例群 (**PDAC** 群, **n=16**) と健常人 (**HC** 群, **n=4**)、**PDAC** 群と膵癌以外の膵腫瘍群 (**PT** 群, **n=11**) の比較で共通して発現量が有意に異なる **12** 個の遺伝子群を抽出した。これらのうち **TCGA** データ (**PAAD**) でも腫瘍組織と正常組織で発現が異なる遺伝子群 (遺伝子 **A, B**) について注目し、**63** 例の **validation** コホート **B** で定量 **PCR** を施行したところ、遺伝子 **A** は、膵癌遠隔転移症例で有意に高値であった (**P=0.03**)。また膵癌切

除コホートCでの膵癌組織内遺伝子 **A** の発現も、**1** 年以内の遠隔転移再発症例で有意に高かった (**P=0.01**)。

これらの知見については、**2022** 年日本外科学会での発表を行った。また、現在論文投稿中である。

#### **本研究の結果から見た今後の展望**

膵癌予後不良の原因として“組織への癌浸潤と強い転移能”が考えられる。これは膵臓の外科的切除症例についても当てはまり、癌の術後進行再発形態により、「局所浸潤型」と「遠隔転移型」に分けられる。進行再発形式により治療法を選択する必要があるため、それを予測できるリキッドバイオプシーの確立に応用できる可能性を見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山中雅也, 林 真路, 大津智尚, 小林大悟, 加藤吉康, 栗本景介, 田中伸孟, 田中晴祥, 猪川祥邦, 高見秀樹, 神田光郎, 田中千恵, 中山吾郎, 小池聖彦, 小寺泰弘
2. 発表標題 Tumor-educated platelets (TEP) を用いた進行膵癌の遠隔転移予測
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022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	小寺 泰弘 (KODERA Yasuhiro) (10345879)	名古屋大学・医学系研究科・教授  (13901)	
研究分担者	山田 豪 (YAMADA Suguru) (30467287)	名古屋大学・医学系研究科・講師  (13901)	
研究分担者	園原 史訓 (SONOHARA Fuminori) (30745534)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教  (13901)	
研究分担者	林 真路 (HAYASHI Masamichi) (70755503)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師  (13901)	

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