

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：82406

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2020

課題番号：18H06247・19K21342

研究課題名(和文)膵癌の早期診断及び術後予後マーカーの同定とその臨床応用に向けた研究

研究課題名(英文) Identification of candidate tumor marker genes for pancreatic ductal adenocarcinoma by NGS-HiCEP method

研究代表者

高尾 幹也 (Takao, Mikiya)

防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・外科学・助教)

研究者番号：70821924

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)：我々は、包括的高感度転写産物プロファイリング(High Coverage Expression Profiling: HiCEP)法と次世代シーケンサー(Next Generation Sequencer: NGS)を組み合わせた新規高感度解析法を行うことにより、膵癌に特異的な発現遺伝子の同定を行った。HiCEP法は日本で発明された網羅的な遺伝子発現解析手法であり、高感度かつ網羅的、定量的な発現解析を行うことができ実験の再現性が高いといった特徴があるが、目的とするピークの塩基配列決定が煩雑であった。我々はNGSを用いて癌発現データベースを作成することで、その欠点を克服することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は他の癌と比較して悪性度が高く、極端に予後不良な「21世紀に残された消化器癌」と言われ、その対策は急務である。膵癌細胞の分子的背景は不明な点が多く、その特性を解析して非侵襲的早期診断や治療効果の向上に繋げる技術開発が求められている。本研究では膵癌患者の手術検体組織に加えて、手術前後に末梢血検体を採取し、日本発の技術である包括的高感度転写産物プロファイリング(High Coverage Expression Profiling: HiCEP)法を活用し、かつ次世代シーケンサーを組み合わせた新規の高感度解析法により、膵癌に特異的な候補遺伝子を同定できた。今後臨床応用に向けて解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：High coverage expression profiling (HiCEP) is an AFLP-based comprehensive gene expression analysis invented in Japan, which can efficiently detect an especially low amount of mRNA with high sensitivity and reliability, and which enables us to analyze mRNA expression much more quantitatively and reproducibly. On the other hand, it requires complicated processes to obtain the sequence information of the detected peaks. In order to solve this problem, we established the gene expression database of human cancers by combining the next-generation sequencing (NGS) with HiCEP method.

We applied the NGS combined HiCEP method to analyze pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cases in this study, and succeeded in establishing the gene expression database of PDAC and in identifying candidate tumor marker genes.

研究分野：肝胆膵外科学

キーワード：膵癌 早期診断 予後マーカー 包括的高感度転写産物プロファイリング:HiCEP 次世代シーケンサー:NGS

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌の死亡者数は、2016年現在 33475人(厚生労働省の人口動態統計)を数え、近年急増する傾向にある。膵癌は癌死全体の9.0%を占め、肺、大腸、胃に次いで第4位となっており、他の癌と比較して極端に予後が悪い(全国がんセンター協議会の生存率共同調査によると5年後の生存率は全癌症例で67.6%、胃癌74.5%、大腸癌76.0%、乳癌93.5%に対して、膵癌では9.3%と顕著に低い)。診断法開発の遅れや治療成績の悪さから膵癌は「21世紀に残された消化器癌」と言われ、その対策は急務である。

家族歴や遺伝素因(p16, BRCA1, 2)、糖尿病、肥満、喫煙、慢性膵炎などが膵癌の危険因子と挙げられており、これらの要因を持つ者が一次スクリーニングの対象とされている。しかし、良好な予後が期待できる早期の膵癌(膵内に限局2cm以内の腫瘍でリンパ節転移なし)では、CEAやCA19-9などの血清腫瘍マーカーの上昇は14~36%程度に留まることから(花田ら, 2012)、早期診断の決め手とはならない。初回診断時に既に遠隔転移を起こしている症例も多く、早期の転移が予後不良の一因となっている。また、手術加療後の再発率も高く、化学療法や免疫療法等の治療に対する反応も不良であり、有効な分子標的薬も開発されていない。このように、有効な低侵襲スクリーニング検査手段がないことに加え、なぜ転移しやすいのか、治療への反応が不良であるのか等の分子的背景の多くが未だ不明である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、臨床的に予後が最も悪いとされる膵癌に対して、膵癌患者の手術検体組織に加えて、手術前後に末梢血検体を採取し、HiCEP法を活用し、かつ次世代シーケンサーを組み合わせた新規の高感度解析法により膵癌に特異的な分子を探索し、さらには非侵襲的早期診断技術の開発を目的とする。

HiCEP法とは、日本発の細胞機能の診断技術であり(Fukumura R. et al. *Nucleic Acids Res*, 2003)、mRNAの発現パターンを解析することにより細胞特異的な分子発現のより詳細な検出が可能になった。ATGCの4塩基全ての組み合わせ(4の4乗=256通り)に相当する256対のプライマーを用いてcDNAを網羅的に増幅することで、高感度に漏れなくmRNAの発現量を鋭敏に測定する技術である。

HiCEP法は、既存の解析法であるDNAマイクロアレイ法と比較して、後者が既知配列の遺伝子のみを検出対象とするのに対して、前者は未知遺伝子を含む全てのmRNAを探索することが可能で、より網羅性の高い方法である。また、RNAシーケンシング法等と比較しても、HiCEP法では検出感度が高く、さらに低発現量のmRNAも検出することができるのに加えて、発現量差を高い再現性を持って判別できることが利点として挙げられる。

このようなことから、本研究では既存の実験方法では見出し得なかった新たな膵癌特異的発現分子を検出し、未だ確立されていない非侵襲的早期診断技術の開発を目指す学術的独自性のあるものとなっている。また、これらの結果を病期診断や病理診断、治療効果等の臨床データと結び付けて解析することにより、再発の早期検知のみならず、治療効果の予測といった臨床応用に繋がる可能性がある。さらに、なぜ転移しやすいのか、治療への反応が不良であるのか等の膵癌細胞の分子的背景を明らかにすることが期待でき、薬剤耐性遺伝子/治療標的分子を指標に治療の有効性評価や治療薬剤の選択に応用できる可能性があるものである。

### 3. 研究の方法

#### **HiCEP解析の実施**

手術検体を癌部と肉眼的非癌部に分けて採取し、血液検体は担癌状態の有無での差を検討できるよう術前、術後1週間、術後1ヶ月以降の計3回採取する。それぞれの検体において、total RNAを抽出後にcDNAに転写する。

既に切除膵癌6症例でHiCEP解析を施行したところ、癌部での発現が非癌部での発現と比較して3倍以上に増加している共通のピーク(転写物)、及び3分の1以下に減少している共通のピークをそれぞれ複数箇所で見出している。既存の方法である次世代シーケンサーによる解析も進めており、HiCEPによる遺伝子発現解析との結果を比較検討する。また血液サンプル検体に対するHiCEP解析も並行して進めている。また、より多数の膵癌症例を対象とした再現解析に加えて、他の癌との比較解析も準備中である。

#### **次世代シーケンサーを用いたHiCEP法の改良**

HiCEP法では、高感度かつ網羅的、定量的な発現解析を行うことが可能であり、実験の再現性も非常に高いという特徴がある。しかし、得られたピークの解析には、再度の電気泳動によるピークの個別分取と精製、シーケンシングが必要であり、これまでは転写物の配列決定に時間と手間を要した。そこで本研究においては、ヒトにおいてはじめてとなるHiCEP法の新たな解析手段についても膵癌や腎癌等の腫瘍を対象に計画している。すなわ

ち、通常の HiCEP 解析に加え、HiCEP 法の途中で作成される全 cDNA フラグメント(256 対のプライマーを用いて網羅的に増幅された cDNA の集合体)を対象に次世代シーケンサーで配列及びサイズを決定する。これにより、HiCEP フラグメントのカタログ化を行い、カタログ化された情報を既に全配列が決定されているヒトゲノムヘアノテーションすることにより、ピークに該当する転写物の同定が、効率的に、かつ高い確率で可能となることが期待される。

#### **候補分子と臨床データとの関連解析**

本技術により検出した膵癌に特異的な候補分子と、症例における病期診断や病理診断、治療効果等の臨床データを対比させ、その関連について解析・検討する。

これらにより、膵癌の非侵襲的早期診断技術の開発や再発の早期検知のみならず、治療効果の予測や治療有効性の評価といった臨床応用に繋がり、膵癌予後の向上に寄与することが十分に期待できる。

#### **4. 研究成果**

上記のように、我々は HiCEP 法を NGS と組み合わせることで解析(NGS-HiCEP 法)を行うことにより膵癌における遺伝子発現データベースの作成に成功し、新規腫瘍マーカーとなりうる候補遺伝子を得ることができた。

具体的には、膵癌の腫瘍組織を用いて癌部と非癌部の発現を比較することで腫瘍特異的なマーカー候補遺伝子を 26 個同定することができ、そのうち 12 個は新規遺伝子であった。これらの候補については、28 例で real-time qPCR を用いた再現解析を行い、高い再現性を確認した。以上の成果より、NGS-HiCEP 法は新規腫瘍マーカー候補を効率よく網羅的に検出できることが示唆され、今後これらの結果と病期診断や病理診断、治療効果等の臨床データとの関連を解析・検討することにより、膵癌の非侵襲的早期診断や再発の早期検知を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Cancer Communications	4. 巻 38
2. 論文標題 The 150 most important questions in cancer research and clinical oncology series: questions 94-101	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Communications	6. 最初と最後の頁 3-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40880-018-0341-9	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 Takao M, Matsuo H, Araki R, Shimizu S, Kawaguchi M, Nakayama A, Kitamura Y, Kawamura Y, Maehara K, Abe M, Ito K, Hoshikawa M, Yamamoto J, Kishi Y, Shinomiya N
2. 発表標題 Development of a gene expression database of pancreatic ductal adenocarcinoma cases by NGS-combined HiCEP to identify tumor markers
3. 学会等名 American Association for Cancer Research (AACR) 2020. (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takao M, Matsuo H, Shimizu S, Kitamura Y, Kawaguchi M, Nakayama A, Kawamura Y, Ito K, Kishi Y, Shinomiya N
2. 発表標題 Identification of candidate tumor marker genes for pancreatic ductal adenocarcinoma tissue by NGS-HiCEP method
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会, 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shimizu S, Matsuo H, Kawaguchi M, Nakayama A, Takao M, Kitamura Y, Tsujita Y, Kawamura Y, Ito K, Shinomiya N
2. 発表標題 The use of NGS-HiCEP to build an extensive renal cell carcinoma gene expression database for identifying tumor markers
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会, 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前原一輝, 川口真, 松尾洋孝, 荒木良子, 清水聖子, 高尾幹也, 中山昌喜, 北村陽典, 辻田裕二郎, 河村優輔, 堀江美音, 藤原慎, 湯野川春信, 安倍真澄, 伊藤敬一, 四ノ宮成祥
2. 発表標題 次世代シーケンシングの併用によるHiCEP法 (NGS-HiCEP法) の開発 腎癌組織の網羅的遺伝子発現データベースの構築と腎癌マーカーの同定
3. 学会等名 第38回日本ヒト細胞学会学術集会(高知), 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前原一輝, 高尾幹也, 松尾洋孝, 荒木良子, 清水聖子, 中山昌喜, 瀧端康博, 永生高広, 北村陽典, 川口真, 河村優輔, 森友理乃, 田中里沙, 安倍真澄, 伊藤敬一, 四ノ宮成祥, 岸庸二
2. 発表標題 HiCEP法と次世代シーケンシングを併用した膵癌マーカーの同定
3. 学会等名 第66回防衛衛生学会, 2020
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高尾幹也, 松尾洋孝, 荒木良子, 清水聖子, 川口真, 中山昌喜, 河村優輔, 青柳有香, 前原一輝, 湯野川春信, 安倍真澄, 伊藤敬一, 岸庸二, 四ノ宮成祥
2. 発表標題 HiCEP法と次世代シーケンサーを併用した新規発現解析法による膵癌の遺伝子発現データベースの構築と膵癌マーカーの同定
3. 学会等名 第37回日本ヒト細胞学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高尾幹也, 松尾洋孝, 荒木良子, 清水聖子, 中岡博史, 川口真, 中山昌喜, 河村優輔, 湯野川春信, 安倍真澄, 伊藤敬一, 星川真有美, 山本順司, 岸庸二, 四ノ宮成祥
2. 発表標題 NGS-HiCEP法を活用した膵癌発現データベースの構築と膵癌マーカー候補遺伝子の探索
3. 学会等名 第30回日本疫学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川口真、松尾洋孝、清水聖子、高尾幹也、中山昌喜、山本順司、伊藤敬一、四ノ宮成祥
2. 発表標題 Development of the gene expression database of renal cell carcinoma cases to identify the tumor markers.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口真、松尾洋孝、荒木良子、清水聖子、高尾幹也、中山昌喜、湯野川春信、安倍真澄、四ノ宮成祥、伊藤敬一
2. 発表標題 次世代シーケンサーを併用したHiCEP法による腎癌の遺伝子発現データベースの構築と腎癌マーカーの同定
3. 学会等名 第28回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口真、松尾洋孝、荒木良子、清水聖子、高尾幹也、中山昌喜、北村陽典、安倍真澄、伊藤敬一、四ノ宮成祥
2. 発表標題 Development of a gene expression database of renal cell carcinoma cases by NGS-combined HiCEP to identify tumor markers.
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口真、松尾洋孝、荒木良子、清水聖子、高尾幹也、中山昌喜、北村陽典、湯野川春信、安倍真澄、四ノ宮成祥、伊藤敬一
2. 発表標題 HiCEP法と次世代シーケンサーを併用した腎癌組織の遺伝子発現データベースの構築と腎癌マーカーの同定
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高尾幹也、松尾洋孝、荒木良子、清水聖子、川口真、中山昌喜、湯野川春信、安倍真澄、伊藤敬一、星川真有美、青笹季文、山本順司、四ノ宮Development of the gene expression database of pancreatic ductal adenocarcinoma cases by NGS combin成祥
2. 発表標題 Development of the gene expression database of pancreatic ductal adenocarcinoma cases by NGS combined HiCEP method to identify the tumor markers.
3. 学会等名 第31回日本肝胆膵外科学会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高尾幹也、松尾洋孝、清水聖子、川口真、中山昌喜、河村優輔、伊藤敬一、岸庸二、四ノ宮成祥
2. 発表標題 Development of a gene expression database of pancreatic ductal adenocarcinoma cases to identify tumor markers.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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