

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：37104
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2023
課題番号：20K17667
研究課題名(和文)新規高感度発現解析法を用いた膵癌マーカー遺伝子の探索と臨床応用に向けた研究

研究課題名(英文)Research for specific gene expression and its clinical use of pancreatic ductal adenocarcinoma utilizing a gene expression database by NGS-HiCEP method

研究代表者
高尾 幹也(Takao, Mikiya)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：70821924
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌は悪性度が高い上に分子的背景は不明な点が多く、その対策は急務である。我々は約90症例の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(HiCEP)法を活用し、かつ次世代シーケンシング(NGS)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た。癌組織において特異的に発現量が増加している新規遺伝子を同定し、臨床データとの比較を行うと共に、他症例検体に対しても再現することができた。また膵癌2症例に対し空間トランスクリプトーム解析を実施し、NGS-HiCEP法で得られたデータベースと照合解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実臨床において膵癌の早期発見や予後予測に関する有効な診断マーカーは確立していない。本研究において、未知遺伝子を含むmRNAに対して高感度かつ網羅的、定量的な発現解析を行うことが可能であり、再現性を確認することができた。NGS-HiCEP法により網羅的な発現データベースを作成することが可能となり、他癌腫への応用や、さらなる研究発展により未だ確立されていない早期診断技術、予後マーカー等の臨床応用に期待できる。

研究成果の概要(英文)：Although pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most lethal cancers due to a dismal survival rate, its biomarkers currently used in clinical practice are neither sufficiently sensitive nor specific. Previously, high coverage gene expression profiling (HiCEP) method was reported as an AFLP-based comprehensive gene expression analysis developed in Japan.

We aimed to identify transcriptional products specific to PDAC by developing a database using HiCEP method and next-generation sequencing (NGS) method in surgical tissues and peripheral blood samples from approximately 90 cases. We identified several novel genes whose expression levels were significantly increased in cancer tissues compared to non-cancerous tissues. We have replicated these results by real-time PCR in other case specimens, and also compared them with clinical database. In addition, we have performed a spatial transcriptome analysis and are now investigating the results.

研究分野：肝胆膵外科学

キーワード：浸潤性膵管癌 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 次世代シーケンシング:NGS

1. 研究開始当初の背景

膵癌の死亡者数は、2017年現在 34224 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 9.2% 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。

一方で HiCEP フラグメントからはピーク分取による分子の同定が必要であり、網羅的解析には不向きであった。我々は、少数例であるが、このフラグメントの一部を次世代シーケンシング (Next Generation Sequencing; NGS) 解析により網羅的に読み込むことに成功し、カタログ化したデータをデータベースとして発現解析を可能とした。この新規解析方法(NGS-HiCEP 法)の開発は、微少発現量を含めた癌の発現解析としてはもちろん、ヒトを含む哺乳類を対象とした研究としても、分取不要な網羅的解析の成功は世界で初めてである(図 1)。

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

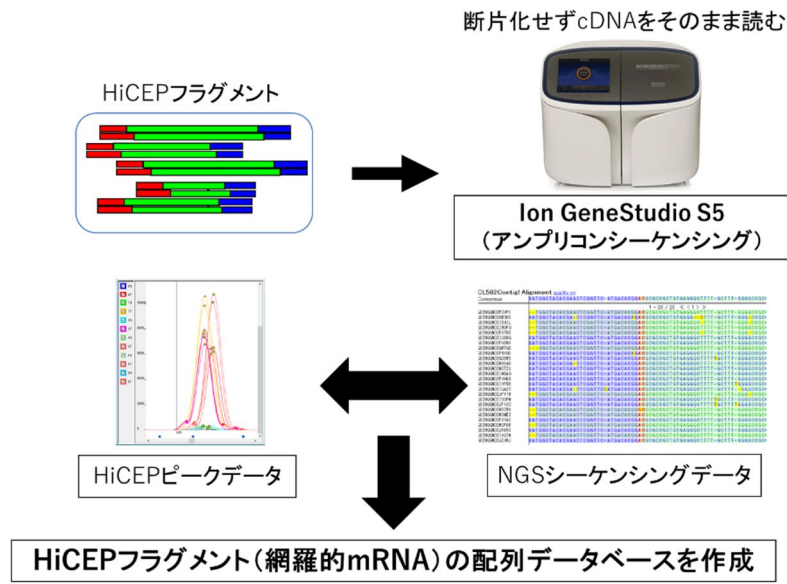


図1 NGS-HiCEP法の概要 癌部・非癌部のほか、手術前後の血液検体でも同様の手法で解析する。

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。得られたcDNAをATGCの4塩基全ての組み合わせ(4⁴ = 256通り)に相当する256対のプライマーを用いて網羅的に増幅しHiCEPフラグメントを作成する。

次世代シーケンサーを用いたHiCEPフラグメントのカタログ化・データベース化

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した(図2)。

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った。これにより**膵癌に特異的な新規ピーク(転写産物)の検出**及びそれぞれのピークについて**NGSを併用して遺伝子同定**を行う。

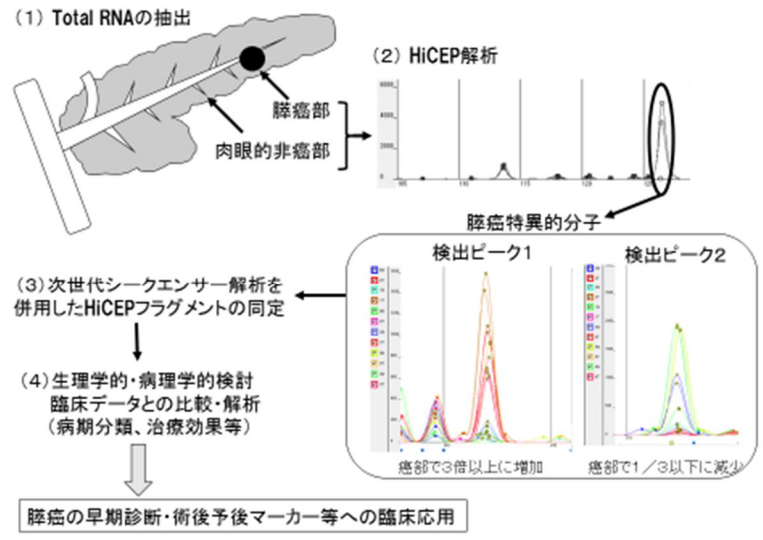


図2 .HiCEP法と次世代シーケンサーを組み合わせた膵癌マーカーの同定と臨床応用への流れ

癌部・非癌部の他、手術前後の血液からもRNA抽出も併せて実施して、同様の新規解析法による研究を推進する。

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。

空間トランスクリプトーム解析

膵癌症例に対して近年開発された病理検体における発現解析である「空間トランスクリプトーム」解析を実施する。この解析は、組織中の形態学的位置情報と紐づいた遺伝子発現データの取得を可能にする技術である。NGS-HiCEP 法で得られた結果と比較検討を行う。

4. 研究成果

これまで膵癌約 90 症例の検体を収集することができており、うち 6 症例分について HiCEP フラグメントを作成した。この結果と NGS 法から、長短を問わない全発現分子を網羅的にカタログ化・データベース化し、膵癌非癌部組織と比較して発現量が大幅に増加する未知の遺伝子を複数個同定することが可能であった(図3)。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・検討した。また TCGA(The Cancer Genome Atlas)をはじめとした臨床データベースを用いて癌部での発現量比較、予後の比較を行った。

また他の症例検体に対してサイバークリーンによる発現解析を行い、再現可能であったことから、これらの研究内容に関する論文を現在準備中である。

さらに、膵癌 2 症例に対し、空間トランスクリプトーム解析を実施した(図4)。現在、この空間トランスクリプトーム解析で得られた結果と上記のデータベースの照合解析を行っているところであり、今後さらに研究内容を発展させていく。

primer set	peak ID	fragment length	gene	primer set	peak ID	fragment length	gene
AT-ga	46	85	AKR1B10 (aldo-keto reductase family 1 member B10)	CT-aa	6	42	Gene A
GA-ct	133	191	CEACAM5 (carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 5)	CT-ga	50	91	Gene B
AG-cc	63	106	GPX2 (glutathione peroxidase 2)	CC-cg	159	186	Gene C
TC-cc	152	199	UCA1 (urothelial cancer associated 1: lncRNA)	AA-ga	144	194	Gene D
CC-ta	98	118	PITX1 (paired like homeodomain 1)	AG-cg	209	428	Gene E
TC-gc	164	254	KLK10 (kallikrein related peptidase 10)	GT-ta	131	181	Gene F
CG-ta	108	162	DHRS9 (dehydrogenase/reductase 9)	CC-ac	32	64	Gene G
GA-ga	175	218	HK2 (hexokinase 2)	TA-ct	159	196	Gene H
CA-tt	49	79	ITGA2 (integrin subunit alpha 2)	TA-ac	70	99	Gene I
GG-ca	98	131	MUC13 (mucin 13, cell surface associated)	TC-ac	183	241	Gene J
GA-ct	348	458	FN1 (fibronectin 1)	GG-cc	192	274	Gene K
GT-tc	33	100	TFF2 (trefoil factor2)				
TC-ac	67	96	CP (ceruloplasmin)				
GT-at	113	172	MUC17 (mucin 17, cell surface associated)				

図3. 膵癌新規マーカー候補分子

癌部と非癌部を比較し発現量が増加している遺伝子

Tissue Plot with Spots Colored by Cluster



t-SNE Projection of Spots by Clustering

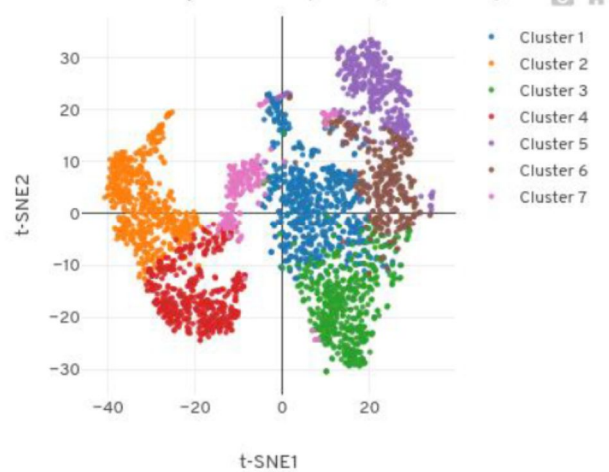


図4 空間トランスクリプトーム解析

膵癌2症例に対し空間トランスクリプトーム解析を行い、その結果と HiCEP-NGS 法で得られたデータベースの照合解析を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 高尾幹也、脊山泰治、横山真太郎、谷圭吾、冲永裕子、仲程純、堀口慎一郎
2. 発表標題 A resected case of synchronous autoimmune pancreatitis and high-grade pancreatic intraepithelial neoplasia(PanIN-3)
3. 学会等名 第26回国際膵臓学会 / 第53回日本膵臓学会（国際学会）
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Yosuke Kitamura, Akiyoshi Nakayama, Yujiro Tsujita, Makoto Kawaguchi, Mikiya Takao, Seiko Shimizu, Keiichi Iwaya, Yusuke Kawamura, Yu Toyoda, Hitoshi Tsuda, Nariyoshi Shinomiya, Yoji Kishi, Keiichi Ito, Hiroataka Matsuo
2. 発表標題 NGS-HiCEP identifies candidate tumor markers in clear cell renal cell carcinoma and pancreatic ductal adenocarcinoma.
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北村陽典、中山昌喜、辻田裕二郎、川口真、高尾幹也、清水聖子、岩屋啓一、河村優輔、豊田優、津田均、四ノ宮成祥、岸庸二、伊藤敬一、松尾洋孝
2. 発表標題 NGS-HiCEP法による淡明型腎細胞癌・膵管腺癌の腫瘍マーカー候補の同定
3. 学会等名 第6回Liquid Biopsy研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北村陽典、中山昌喜、辻田裕二郎、川口真、高尾幹也、清水聖子、中岡博史、岩屋啓一、斎藤俊行、豊田優、河村優輔、高田雄三、湯野川春信、荒木良子、安倍真澄、津田均、四ノ宮成祥、松尾洋孝、伊藤敬一
2. 発表標題 NGS-HiCEP法による腎細胞癌の腫瘍マーカー候補の同定
3. 学会等名 第31回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2022年

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膀胱癌マーカーの同定
3. 学会等名 第66回防衛衛生学会, 2020
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------