

令和 4 年 8 月 26 日現在

機関番号：82406

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21740

研究課題名（和文）早期発見が困難な癌の二次予防に向けた新規高感度遺伝子発現解析による診断技術の開発

研究課題名（英文）Development of diagnostic technique through a new, high-sensitivity gene-expression analysis: to promote secondary prevention against cancers which are difficult to detect early

研究代表者

四ノ宮 成祥（Shinomiya, Nariyoshi）

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・分子生体制御学・教授

研究者番号：40505260

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：腎癌及び膵癌の症例の手術検体組織を用いて、新規高感度解析法（NGS-HiCEP法）を実施し、腎癌や膵癌に特異的な発現分子を探索した結果、腫瘍特異的なマーカー候補をそれぞれ12個及び26個同定した。そのうち4個及び12個は新規であった。これらのマーカー候補については、腎癌34例、膵管癌28例を対象にreal-time PCRを用いた再現解析を行い、高い再現性を確認した。同時に、別のアプローチによる発現解析を用いた再現解析を検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの癌腫では今なお実臨床において有効な診断マーカーは確立しておらず、早期発見や再発の早期検知に有効な診断法が存在せず、その技術開発が強く求められてきた。本研究では、本邦初のNGS-HiCEP法の実施により、膵癌・腎癌特異的分子の「完全な」網羅的探索を容易にし、候補遺伝子を同定することができた。これらの成果は、早期診断や再発検出への非侵襲的診断技術の開発、予後予測や治療法の有用性の予測などに繋がるだけでなく、実臨床においても大変有益である。また、同様の手法は他の腫瘍にも応用可能であり腫瘍分子遺伝学的にも重要である。

研究成果の概要（英文）：We performed analyses using “next generation sequencing (NGS) combined with high-coverage gene expression profiling (HiCEP) method” (NGS HiCEP) with patients’ surgical specimens of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) and pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). Comparing with expression levels of mRNA from tumor and non-tumor tissues, we identified 12 and 26 candidate genes for ccRCC and PDAC, respectively. Among them, 4 and 12 were novel genes. Replication analysis by quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) were performed using another 34 ccRCC and 28 PDAC cases, high reproducibility of NGS-HiCEP method were confirmed. Furthermore, we are also conducting other replication analyses with tumor and non-tumor tissues from ccRCC and PDAC cases using other approaches.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：淡明細胞型腎細胞癌 浸潤性膵管腺癌 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 新規腫瘍マーカー

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

多くの癌腫では、今なお早期発見や再発の早期検知に有効な診断法や簡便なバイオマーカーは存在しない。

例えば、腎細胞癌(以下「腎癌」という)は、発生初期には自覚症状に乏しく、早期発見には超音波検査などの画像検査に頼らざるを得ず、術後の再発予測を含めて、簡便なバイオマーカーがない。

また、浸潤性膵管癌(以下「膵癌」という)は、他の癌と比較して悪性度が高く、極端に予後不良なため、「21世紀に残された消化器癌」と言われ、早期発見や再発の早期検知に有効な診断法がない。

このような問題点を克服するために、膵癌と腎癌の分子的背景や特性を解析することで、不鮮明な画像診断に頼ることなく、非侵襲的に早期の膵癌と腎癌をスクリーニングできる技術や、術後予後マーカーの開発が求められてきた。

2. 研究の目的

本研究では、担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(Next Generation Sequencer: NGS)を組み合わせた新規の高感度解析法「NGS-HiCEP法」により、膵癌・腎癌に特異的な分子を探索する。

次に、候補遺伝子をコードする分子の組織発現解析、細胞株を用いた生理学的、病態学的機能解析を行う。さらに、有望な候補遺伝子の発現と臨床病期、病理所見や治療効果等の臨床データとの関連性を解析・検討することにより、膵癌・腎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への応用を目指す。また、ゲノムコホート研究と組み合わせることにより、治療効果の予測や二次予防に向けた臨床応用に繋がる技術開発が可能となると期待される。

3. 研究の方法

腎癌と膵癌の臨床検体(手術切除検体および血液細胞)の収集を進め、これまでそれぞれ腎癌約90例、膵癌約60例の患者から同意を得て、検体を採取している。

上記症例のうち、腎癌6症例と膵癌4症例を用いてNGS-HiCEP法を実施した(図1)。すなわち、HiCEP法の途中で作成される全cDNAフラグメントを対象にNGSで配列及びサイズを決定する。HiCEPフラグメントのカタログ化

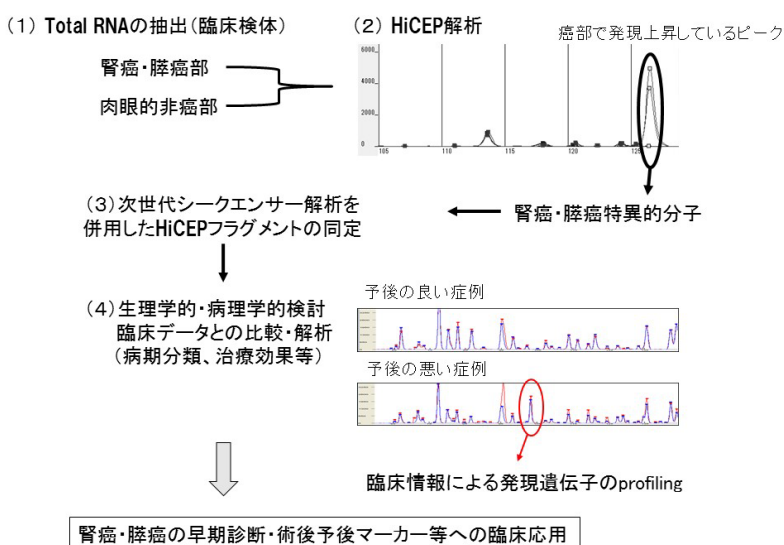


図1 HiCEP法とNGSを組み合わせた腎癌・膵癌マーカーの同定と臨床応用への流れ

癌部・非癌部の他、術前後の血液において同様の新規解析法による研究を推進する。

された情報を既に全配列が決定されているヒトゲノムへアノテーションすることが可能となり、より効率的かつ高確率で候補遺伝子を同定する。

さらに、有望な候補遺伝子に関して、他症例におけるリアルタイム PCR 解析による再現性の確認、抗体作成による組織内や細胞内での局在の検討、in vitro 発現実験による生理学的、病態学的機能の検討を行う。また、検出した癌特異的な候補分子マーカーと、臨床症例における病期診断や病理診断、予後・治療効果等の臨床データを対比し、これらの関連性について解析・検討する。

4. 研究成果

腎癌及び膵癌の症例の手術検体組織を用いて、NGS-HiCEP 法を実施した。

まず、腎癌の 6 症例を対象に、HiCEP 法による解析を実施し、全ての症例で非癌部と比較し癌部において発現が 5 倍以上増加しているピークを 28 個認めた。この 28 個のピークについて、同時に RNA シークエンスにより解析した HiCEP フラグメントの配列情報を参照し、腫瘍マーカー候補遺伝子を探索した。その結果、フラグメントの長さが 400bp 未満の 12 個の候補遺伝子を同定した。12 個の候補遺伝子のうち 8 個は腎癌関連遺伝子として既に報告があったが、4 個については腎癌との関連は報告されておらず新規の腎癌関連遺伝子 (Gene A-D) であることが分かった (表 1)。

Primer set	peak ID	sequence length	gene
TA-tt	34	35	CA9 (carbonic anhydrase 9)
GC-gt	84	101	SCARB1 (scavenger receptor class B member 1)
GA-at	208	302	EGLN3 (egl-9 family hypoxia inducible factor 3)
AT-tg	61	88	ENPP3 (ectonucleotide
GT-ct	51	62	ESM1 (endothelial cell specific molecule 1)
GC-ac	52	56	STC2 (stanniocalcin 2)
CT-tt	161	203	SEMA5B (semaphorin 5B)
CA-ca	105	182	ANGPT2 (angiopoietin 2)
AT-tt	25	28	Gene A
AC-aa	148	177	Gene B
GC-cc	20	29	Gene C
TG-ca	77	97	Gene D

表 1 腎癌マーカー候補遺伝子の同定

癌部において非癌部と比較し発現が増加している候補遺伝子を示す (抜粋)。

Gene A-D は腎癌における新規候補遺伝子を指す。

次に、上記 6 症例とは異なる腎癌 34 症例 (HiCEP 解析未使用の組織検体) を対象に、これらの候補遺伝子に関して、リアルタイム PCR による再現解析を行い、既知の遺伝子、未報告の両者含めて癌部で発現が有意に上昇しており、NGS-HiCEP の高い再現性を確認することができた。

同様に膵癌の 4 症例を対象に、HiCEP 法による解析を実施し、全ての症例で非癌部と比較し癌部において発現が 5 倍以上増加しているピークを 54 個認めた。そのうち、26 個の腫瘍マーカー候補遺伝子を同定した。26 個の候補遺伝子のうち 14 個は膵癌関連遺伝子として既に報告があったが、12 個については膵癌との関連は報告されておらず新規の膵癌関連遺伝子候補 (Gene A-K) であることが分かった (表 2)。

primer set	peak ID	fragment length	gene
AT-ga	46	85	AKR1B10 (aldo-keto reductase family 1 member B10)
GA-ct	133	191	CEACAM5 (carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 5)
AG-cc	63	106	GPX2 (glutathione peroxidase 2)
TC-cc	152	199	UCA1 (urothelial cancer associated 1: lncRNA)
CC-ta	98	118	PITX1 (paired like homeodomain 1)
TC-gc	164	254	KLK10 (kallikrein related peptidase 10)
CG-ta	108	162	DHRS9 (dehydrogenase/reductase 9)
GA-ga	175	218	HK2 (hexokinase 2)
CA-tt	49	79	ITGA2 (integrin subunit alpha 2)
GG-ca	98	131	MUC13 (mucin 13, cell surface associated)
GA-ct	348	458	FN1 (fibronectin 1)
GT-tc	33	100	TFF2 (trefoil factor 2)
TC-ac	67	96	CP (ceruloplasmin)
GT-at	113	172	MUC17 (mucin 17, cell surface associated)

primer set	peak ID	fragment length	gene
CT-aa	6	42	Gene A
CT-ga	50	91	Gene B
CC-cg	159	186	Gene C
AA-ga	144	194	Gene D
AG-cg	209	428	Gene E
GT-ta	131	181	Gene F
CC-ac	32	64	Gene G
TA-ct	159	196	Gene H
TA-ac	70	99	Gene I
TC-ac	183	241	Gene J
GG-cc	192	274	Gene K

表 2 膵癌マーカー候補遺伝子の同定

癌部において非癌部と比較し発現が増加している候補遺伝子を示す（抜粋）。

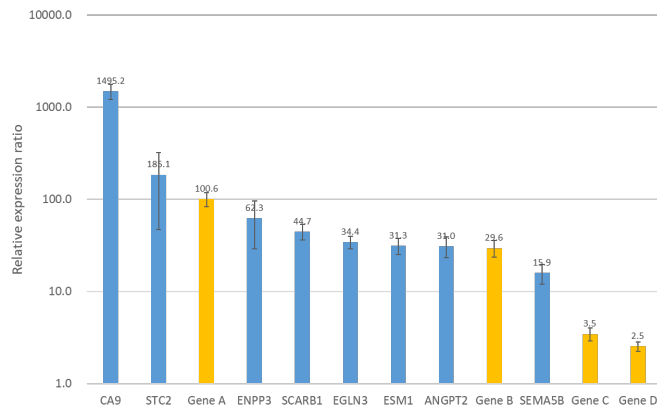
Gene A-K は膵癌における新規候補遺伝子を指す。

次に、上記 4 症例とは異なる膵癌 28 症例（HiCEP 解析未使用の組織検体）を対象に、これらの候補遺伝子をリアルタイム PCR による再現性の解析を行った。その結果、いずれの遺伝子においても発現量の上昇が確認され、NGS-HiCEP 法の高い再現性が認められた（図 2）。

以上の成果より、NGS-HiCEP 法は、異なる癌腫においても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た。

今後、検出した癌特異的な候補分子マーカーにおいて、臨床症例における病期診断や病理診断、予後・治療効果等の臨床データを対比し、これらの関連性について詳細な検討を行う予定である。また同時に、臨床症例における病期診断や病理診断、予後・治療効果等の臨床データを比較した NGS-HiCEP 解析から、新規候補マーカーが見いだせないかを検討し、これらを報告する予定である。

(a)



(b)

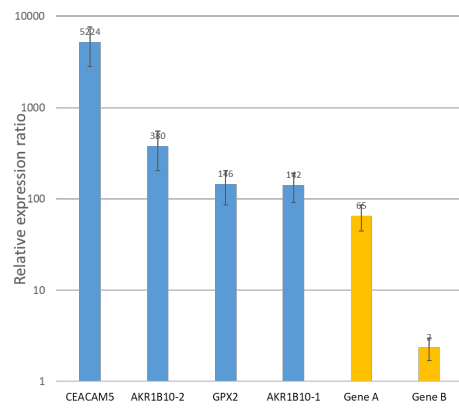


図2 リアルタイムPCRによる再現性の解析

(a) 腎癌および(b)膵癌の各組織における候補遺伝子の発現量をリアルタイムPCRにより検出し、それぞれの非癌部位と比較した(抜粋)。いずれの癌特異的な候補分子マーカーにおいても発現量の上昇が認められ、NGS-HiCEP法の高い再現性が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

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
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
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
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
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

防衛医科大学校分子生体制御学講座ホームページ : <http://ndmc-ipb.browse.jp/>

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	松尾 洋孝 (Matsuo Hirotaka) (00528292)	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・分子生体制御学・教授) (82406)	
研究分担者	高尾 幹也 (Takao Mikiya) (70821924)	久留米大学・医学部・助教 (37104)	

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