

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：24303  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2021～2023  
課題番号：21K09726  
研究課題名（和文）次世代シーケンサーによる脂腺癌の発癌・転移遺伝子の解明と非観血的治療法の開発

研究課題名（英文）The elucidation of carcinogenesis, metastasis gene and development of non-invasive treatment of sebaceous gland carcinoma with the next-generation sequencer

研究代表者  
渡辺 彰英（WatanabeWatanabe, Akihide）  
京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・講師

研究者番号：80516188  
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）：我々は眼瞼脂腺癌よりRNA、DNAの抽出方法の確立を行った。それらを用いて眼瞼脂腺癌15例の正常、腫瘍組織の次世代シーケンサー解析を行った。DNA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変異を検出できた。脂腺癌の発癌や転移に關与する遺伝子の解明に必要な手法とデータを確立し、脂腺癌の発癌・転移遺伝子の解明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

眼瞼脂腺癌はアジア人に特に多い眼瞼原発悪性腫瘍の一つである。現時点では治療は外科的切除が第一選択であり、放射線治療や化学療法といった保存的治療法は効果が限定的である。それは眼瞼脂腺癌が希少疾患であり、遺伝子解析が十分に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非観血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 established a method for extracting RNA and DNA from sebaceous gland carcinoma of the eyelid. Using these methods, we performed next-generation sequencing analysis on normal and tumor tissues from 15 cases of sebaceous gland carcinoma of the eyelid. DNA analysis revealed genes that were specifically expressed in tumor tissues compared to normal tissues, allowing us to detect mutations potentially related to carcinogenesis. We have established the methods and data for elucidating genes involved in the carcinogenesis and metastasis of sebaceous gland carcinoma, contributing to the understanding of these processes.

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

## 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。この内眼瞼組織内のマイボーム腺で発生する脂腺癌は、眼瞼悪性腫瘍に占める割合が欧米の白人では約5%程度であると報告されているのに対し、アジア人種では発症頻度が高く、特に日本では約30%を占めるとされている。

また眼瞼の脂腺癌に関しては、発症頻度の他に肉眼的所見に関しても人種差が報告されている。この肉眼的所見は、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 の大きく二つに分けられ、白人では両タイプはほぼ同じ頻度だが、アジア人では diffuse type よりも nodular type の方が多いとされている。この様に脂腺癌には、発症頻度と臨床病型それぞれで人種間に相違が存在しているが、それらをもたらし得る遺伝学的な病因は未だに不明である。

こうした脂腺癌の治療においては、腫瘍の外科的完全切除が第一選択となっており、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。そのため、発症要因の解明や創薬に繋がる遺伝子間の作用機序に関する研究が俟たれて来たが未だ十分とは言えず、希少疾患である脂腺癌検体に対する次世代シーケンサー (Next-generation sequencing, NGS) などによる網羅的遺伝子解析は特に報告例が少ない。この様に眼瞼脂腺癌に関しては、分子生物学的な検証がこれまでほとんど行われておらず、またそのためにエビデンスのある抗癌剤使用方法も存在しない。

### 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いないため、これを実施遂行することは基礎的な癌研究のみならず、欧米人と異なる人種差をもたらし得る遺伝学的背景を解き明かす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に差異をもたらす遺伝子の解明や、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、予後予測および非観血的治療法の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

#### 対象

京都府立医科大学付属病院において、眼瞼脂腺癌に対し遊離瞼板移植術を施行した症例の内、切除した腫瘍組織に加え、移植時に用いた健側瞼板の余剰組織由来の正常組織も入手できた 18 症例 (女性: 13 例、男性: 5 例、手術時平均年齢:  $76.1 \pm 11.7$  歳) を対象とした。

#### 核酸の抽出

眼瞼板組織は硬さと弾力が備わっているため、核酸を安定的に抽出することは困難であり、また入手可能な組織片の大きさが限られていることから、少量のサンプルより DNA と RNA の両方を効率的に抽出せねばならない。そこで我々は、まずウサギの正常瞼板組織を用いて同様の用途で従来多用されて来た手法である乳鉢と Pellet Pestle、及び新しい手法として液体窒素を用いる凍結破碎装置「SK mill」(Tokken 社)の3種類の組織破碎方法と、有機溶媒と AllPrep DNA/RNA Mini Kit® (Qiagen 社)を用いたカラム法の2種類の核酸精製法により、それぞれ DNA と RNA を抽出して品質を比較検討した。

抽出した DNA は Qubit® Assays (Life Technologies 社)、Nano Drop (Thermo Scientific 社) 及び NanoPhotometer NP-80 spectrophotometer (Implen 社) を用いて濃度と品質を測定した。また抽出した RNA は Agilent 2100 BioAnalyzer® (Agilent Technologies 社) を用いて品質の確認を行った。その後、これらの検討を通して確立した手法によって、ヒト眼瞼脂腺癌 18 例の腫瘍及び正常眼瞼組織から DNA 及び RNA の抽出を実施した。

#### NGS 解析

我々は核酸を抽出した全 18 例より、DNA は Qubit と Nano Drop、NanoPhotometer の結果、また RNA は BioAnalyzer の RNA 6000 Pico kit にて測定した RNA Integrity Number (RIN) 値を基に、正常組織、腫瘍組織の DNA、RNA の抽出に共に成功して品質の良かったサンプルを最終的にシーケンスに用いるものとして選抜して、NGS による RNA-Seq 解析、及び DNA を用いたエキソーム解析を行った。エキソーム解析のための DNA ライブラリー作製には、SureSelect XT Human All Exon (Agilent Technologies 社)、及び Comprehensive Exome Panel (Twist Bioscience 社) を用いて行った。一方、RNA-Seq シーケンスライブラリーの作製は SMART-Seq® Ultra® Low Input RNA kit (Clontech 社)、及び SMART-Seq® Stranded kit (Clontech 社) を用いて施行した。シーケンスデータを取得する NGS は、共に NovaSeq6000 (Illumina 社) を用いた。

## 4. 研究成果

### 1) RNA、DNA の抽出方法の確立

まず、我々はウサギの正常眼瞼組織を用いて安定した組織破碎方法を比較検討した。その結果、SK mill、乳鉢、Pellet Pestle で破碎後に有機溶媒で精製した DNA の OD 比は、それぞれ  $0.69 \pm 0.22$ 、 $0.56 \pm 0.18$ 、 $0.40 \pm 0.06$  であり、同様に RNA の OD 比はそれぞれ  $1.60 \pm 0.19$ 、 $1.48 \pm 0.13$ 、 $1.58 \pm 0.19$  であった。以上より、DNA、RNA の品質は共に SK mill で破碎後のものが安定して良かったため、続いて上述の有機溶媒を用いた手法とカラム法の 2 種類の核酸精製法を比較し抽出された核酸の品質、収量を検討した。有機溶媒を用いた精製法では DNA の収量は  $12.34 \pm 2.51 \mu\text{g}$ 、OD 比は  $0.69 \pm 0.22$ 、RNA の収量は  $12.77 \pm 6.56 \mu\text{g}$ 、OD 比は  $1.60 \pm 0.19$  であった。一方、カラム法による核酸精製では DNA の収量は  $5.53 \pm 0.79 \mu\text{g}$ 、OD 比は  $1.89 \pm 0.01$ 、RNA の収量は  $1.13 \pm 0.35 \mu\text{g}$ 、OD 比は  $2.07 \pm 0.02$  であったため、有機溶媒を用いた精製方法より安定的に質の高い核酸の抽出が可能であった。また、組織の破碎から核酸の抽出までの時間は、最も簡便かつ短時間で組織破碎が可能な SK mill を用いた破碎後に、有機溶媒を用いた方法では約 3 時間もかかったのに対し、カラム法を用いると核酸精製が 1 時間程度で完了した。これらの検討により、SK mill を用いて組織破碎を行った後、カラム法により核酸を精製する方法は効率よく安定した核酸の抽出法であることが確認でき、眼瞼組織からの核酸抽出法を確立できた。

次に、実際にこの方法を用いてヒト正常眼瞼組織より核酸を抽出、精製し、NGS によるエキソーム及び RNA-Seq 解析を行うためのサンプルを準備した。我々は先行して 9 症例分の正常及び腫瘍組織のうち、DNA、RNA の抽出に共に成功して品質の良かった 6 症例を選抜して、エキソーム解析および RNA-Seq 解析に用いるシーケンスデータを取得した。その後追加で同様に検討を行い、残る 9 症例全てについてデータ取得を行った。最終的に用いた症例は、男性：5 例、女性：10 例、平均年齢： $75.2 \pm 10.8$  歳、左眼：9 例、右眼：6 例、腫瘍タイプは nodular タイプ：11 例、diffuse タイプ：4 例となった。

DNA の濃度は最初の 6 症例は正常組織： $38.5 \pm 23.4 \text{ ng/ul}$ 、腫瘍組織： $81.9 \pm 30.4 \text{ ng/ul}$ 、追加の 9 症例は正常組織： $24.7 \pm 16.9 \text{ ng/ul}$ 、腫瘍組織： $89.6 \pm 95.6 \text{ ng/ul}$  であった。一方、RNA の濃度は最初の 6 症例は正常組織： $3.7 \pm 2.5 \text{ ng/ul}$ 、腫瘍組織： $9.4 \pm 14.8 \text{ ng/ul}$ 、追加の 9 症例は

正常組織:23.5±21.3ng/ul、腫瘍組織:111.5±115.1ng/ulであった。

## 2)NGS解析

NGSの結果、エキソーム及びRNA-Seqのシーケンスデータの品質は、クオリティの確認(FastQC V0.12.1)後にfastp version 0.23.4にて不良リードを除外してもなお、共に解析に支障が無い高いqualityのものが得られていた。まず、先行して6症例の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±6.2M、腫瘍組織:83.5±15.2Mであった。また、リードの品質を示すQ30R1,Q30R2は正常組織:92.1±0.7%,91.7±0.4%、腫瘍組織:91.4±0.6%,91.3±0.3%であった。一方、6症例の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±7.0M、腫瘍組織:247.0±14.4Mであり、Q30R1,Q30R2は正常組織:93.1±0.1%,91.7±0.4%、腫瘍組織:93.0±0.1%,91.4±1.5%であった。これらの内、眼瞼板正常組織のデータを特に精査し、RNA-Seqによる遺伝子発現解析の結果、PPARG、PLIN2、MUC16といったマイボーム腺での発現が知られている遺伝子の発現を追認できた。これにより、我々が確立したSK millを用いる凍結組織破碎とカラムによる核酸精製を組み合わせた核酸抽出法が、ヒト眼瞼板組織からマイボーム腺特異的遺伝子の解析を可能とするNGSデータの取得に十分な品質のRNAを得られることが検証できたため、この研究成果を論文としてまとめて公表に至った(Hiroaki Oku, Akihide Watanabe, et al. *J Biochem.* 2022; 172(6): 385-394.)

次に、残る9症例についても追加で同様にNGSによるデータ取得を行った。RNA-Seqのリード数は正常組織:144.7±24.8M、腫瘍組織:163.0±52.7Mであり、Q30R1,Q30R2は正常組織:92.8±0.4%,90.1±0.5%、腫瘍組織:93.1±0.6%,89.9±1.0%であった。また、エキソームデータのリード数は正常組織:94.4±89.1M、腫瘍組織:322.5±40.3Mであり、Q30R1,Q30R2は正常組織:92.8±0.2%,92.1±0.3%、腫瘍組織:92.8±0.1%,91.9±0.7%であった。

我々は、これら2回に分けて取得したNGSデータを全て出揃った段階で改めて精査し、まずはエキソーム解析を開始した。取得したエキソームデータは、BWA(Burrows-Wheeler Aligner)により最新のゲノム情報に全リードをマッピングし、GATK(Genome Analysis Toolkit)4のMutect2にて各症例の腫瘍組織と正常組織間で比較することによりがん特異的変異候補の抽出を行うという解析パイプラインの構築を行った。その結果、先行してデータ取得した6症例より、4症例でTP53遺伝子のframeshift変異が1例、stopgainが1例、同義置換が1例、非同義置換が2例認められた。また、ZNF750遺伝子では、frameshift変異が1例、stopgainが2例、非同義置換が1例認められた。現在、さらに9検体でも同様の解析を行っており、上記以外にも既報情報やがんパネル採用遺伝子に加え、新規関連遺伝子の探索を進めている。

本研究期間中においては、上述の様に独自の眼瞼板組織からの核酸抽出法を確立するという脂腺癌研究の基盤を成し世界に貢献する成果を上げ、またその核酸を用いてアジア人には少ないdiffuseタイプの脂腺癌4症例を含む高品質なNGSデータの取得に成功した。この腫瘍タイプに加え、性別、年齢などの臨床像をも加味し、腫瘍と正常組織のペア単位での比較を行うことにより、関連するpathwayなどを絞り込み、脂腺癌特異的な遺伝子の発現や変異をRNA、DNAレベルで検討できる環境が整った。以上より本研究の成果は、脂腺癌の発癌や転移に關与する遺伝子の解明に必要な手法とデータを確立し、非観血的治療法の研究を進展させたものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Oku H, Watanabe A, Tokuda Y, Nakayama T, Tashiro K, Sotozono C, Nakano M.	4. 巻 172(6)
2. 論文標題 Efficient DNA/RNA extraction from tarsal plates by SK mill, a freeze-crush apparatus.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Biochem	6. 最初と最後の頁 385-394
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvac078	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 -

1. 著者名 渡辺彰英	4. 巻 108
2. 論文標題 眼瞼悪性腫瘍に対するTenzel flapとHughes flap.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Monthly Book OCULISTA	6. 最初と最後の頁 138-145
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 無
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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡辺彰英
2. 発表標題 眼瞼悪性腫瘍治療の現状と未来
3. 学会等名 第128回京都眼科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥拓明, 渡辺彰英, 米田亜規子, 中山知倫, 徳田雄市, 中野正和, 田代啓, 外園千恵
2. 発表標題 ヒト眼瞼脂腺癌組織からの核酸の抽出方法の検討
3. 学会等名 第33回日本眼瞼義眼床手術学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥拓明、渡辺彰英、中山知倫、米田亜規子、外園千恵
2. 発表標題 眼瞼腫瘍の組織分類と好発部位の検討
3. 学会等名 第126回日本眼科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥拓明、渡辺彰英、中山知倫、大山泰司、外園千恵
2. 発表標題 眼瞼脂腺癌の局所再発と転移に関する因子の検討
3. 学会等名 第125回日本眼科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥拓明、渡辺彰英、中山知倫、大山泰司、外園千恵
2. 発表標題 涙点を含む眼瞼腫瘍症例の検討
3. 学会等名 第8回日本眼形成再建外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥拓明、渡辺彰英、中山知倫、米田亜規子、熊切将宣、上田幸典、外園千恵
2. 発表標題 眼瞼脂腺癌症例の臨床的特徴と予後の検討
3. 学会等名 第38回日本眼腫瘍学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥拓明, 渡辺彰英, 米田亜規子, 中山知倫, 徳田雄市, 中野正和, 田代啓, 外園千恵
2. 発表標題 ヒト眼瞼脂腺癌組織からの核酸の抽出方法の検討
3. 学会等名 第33回日本眼瞼義眼床手術学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野々村美保, 奥拓明, 中山知倫, 渡辺彰英, 外園千恵
2. 発表標題 前頭洞内脂腺癌に対して他科と連携し放射線治療と外科的手術を施行した1例
3. 学会等名 第40回日本眼腫瘍学会
4. 発表年 2023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	中山 知倫  (Nakayama Tomomichi)  (00769325)	京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医   (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
---------	---------