

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：82406

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19679

研究課題名（和文）膵癌・腎癌の二次予防のための新規高感度発現解析法を用いた診断技術の開発

研究課題名（英文）Development of a diagnostic technique using novel high-sensitivity expression analyses for secondary prevention against pancreatic and renal tumors

研究代表者

中山 昌喜（Nakayama, Akiyoshi）

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・准教授

研究者番号：50876000

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：早期発見や再発の早期検知に有効な診断法がない癌腫は多く、膵癌と腎癌はその代表例である。我々は、膵癌約90症例、腎癌約100症例の手術検体組織と末梢血検体で、包括的高感度転写産物プロファイリング(HiCEP)法と次世代シーケンシング(NGS)を組み合わせた新規高感度解析法を行うことにより、データベースを作成して膵癌や腎癌に特異的な分子を探索した。その結果、非癌部と比較して癌組織で発現量が大幅に増加する未知の遺伝子を複数個同定し、結果は他の症例検体でも再現できた。また、近年開発された「空間トランスクリプトーム」解析を実施し、その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いない。未知遺伝子を含む全てのmRNAについて網羅的に探索することが可能であり、検出感度や再現性も高い。本研究は、申請者らがこれまで行ってきたHiCEP法とNGSを組み合わせた高感度解析法をさらに発展させ、網羅的なデータベースを作成できた。本研究成果は、他の癌腫へも応用可能であり、癌の二次予防を含めた臨床応用を目指したチャレンジである。

研究成果の概要（英文）：It is unfortunate that there are many carcinomas for which there are currently no effective diagnostic methods for early detection or early detection of recurrence. Pancreatic and renal cancers are typical examples. We sought to identify molecules specific to pancreatic and renal cancers by creating a database using a novel high-sensitivity analysis method combining the High Coverage Gene Expression Profiling (HiCEP) method and next-generation sequencing (NGS) method in surgical tissues and peripheral blood samples from approximately 90 and 100 cases of pancreatic and renal cancer, respectively. As results, we have identified several novel genes whose expression levels were significantly increased in cancer tissues compared to non-cancerous areas. We have also replicated these results in other case specimens. In addition, we have performed a spatial transcriptome analysis, which was recently developed, and are now in the process of matching the results with the above database.

研究分野：分子遺伝疫学

キーワード：浸潤性膵管癌 腎細胞癌 包括的高感度転写産物プロファイリング 次世代シーケンシング 高感度発現解析

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。

## 1. 研究開始当初の背景

多くの癌腫において二次予防としての早期発見や早期再発の検出に有効な早期診断技術が存在しないなか、その技術開発が強く求められている。特に、疾患早期において自覚症状に乏しく診断困難な浸潤性膵管癌（以下「膵癌」）や腎細胞癌（以下「腎癌」）に関して、実臨床で有効な診断マーカーは未だ確立していない。

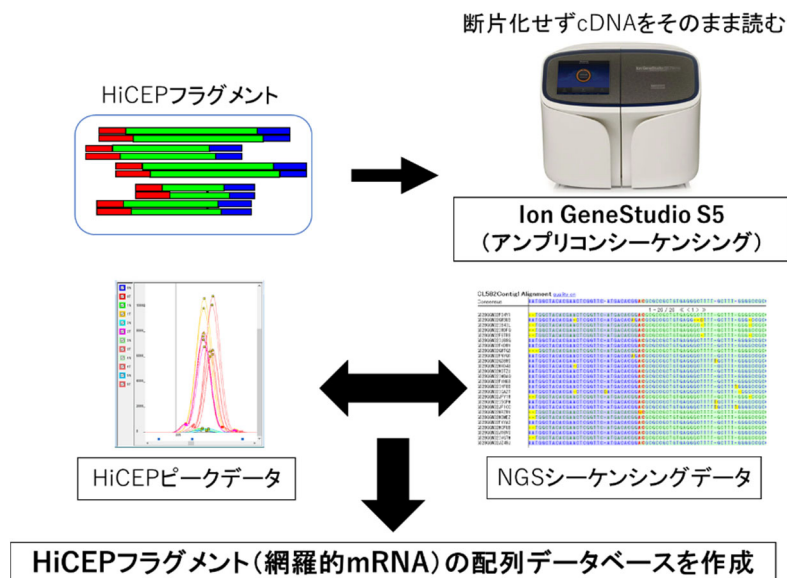
例えば膵癌において、良好な予後が期待できる早期癌（膵内に限局 2cm 以内の腫瘍でリンパ節転移なし）では、CEA や CA19-9 などの血清腫瘍マーカーの上昇は 14～36%程度に留まる（花田ら, 2012）ことから、早期診断の決め手とはならない。腎癌においても、早期発見は超音波検査などの画像検査に頼らざるを得ず、血液検査などの簡便なスクリーニング方法が存在しない。さらに腎癌と診断された場合にも、術後の再発予測、再発後の病勢の把握、予後予測には、未だにヘモグロビン値や LDH 値、カルシウム値などの古典的な血液生化学的マーカーが用いられているのが現状である。このような問題点を克服するためには、不鮮明で不確実性の高い画像診断に頼ることなく、非侵襲的に早期の膵癌・腎癌を鋭敏にスクリーニングできる技術開発や、術後予後マーカーの探索が求められる。

包括的高感度転写産物プロファイリング（High Coverage Expression Profiling; HiCEP、「ハイセップ」と読む）法は、本邦発の遺伝子発現解析技術（Fukumura *et al. Nucleic Acids Res*, 2003）であり、cDNA を網羅的に増幅したもの（“HiCEP フラグメント”と呼ばれる）から、高感度に、かつ漏れなく mRNA の発現量を鋭敏に測定する技術である。ただし、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。“NGS-HiCEP 法”と名付けられたこの解析方法の開発は、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。

我々は、前述の命題に立ち向かうに当たり、膵癌・腎癌組織に加えて末梢血中に存在する特異的な転写産物に着目し、NGS-HiCEP 法による早期診断技術の開発を行うという着想に至った（**図 1**）。

## 2. 研究の目的

膵癌が「21 世紀に残された癌」と呼ばれる理由の一つは、膵癌の二次予防、すなわち早期発見や再発の早期検知に有効な診断法が存在しないことによる。本研究では、自覚症状に乏しく早期診断が困難である膵癌と腎癌を取り上げ、その二次予防に向けた診断



**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。

技術の開発・発展を目的とする。

我々はこれまでに、これらの癌患者の手術検体と末梢血検体を用いて、HiCEP法とNGSを組み合わせた高感度発現解析を行うことにより、膵癌や腎癌に特異的な分子の探索を行ってきた。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、これらの癌の非侵襲的二次予防が血液情報からも可能となる。

### 3. 研究の方法

本研究では、手術検体に対してHiCEP法とNGS法を組み合わせ、長短を問わない全発現分子を分子疫学的手法により網羅的にカタログ化・データベース化し、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(図1)。

#### <1> 手術検体の採取

膵癌または腎癌の手術組織検体を肉眼的に癌部と非癌部に分けて採取する。血液検体は担癌状態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。各検体は、total RNAを抽出後にcDNAに逆転写する。

#### <2> HiCEP法

前述のように、HiCEP法は本邦発の遺伝子発現解析技術(Fukumura et al. *Nucleic Acids Res*, 2003)であり、ATGCの4塩基全ての組み合わせ(4<sup>4</sup>=256通り)に相当する256対のプライマーを用いてcDNAを網羅的に増幅したHiCEPフラグメントから、高感度に、かつ漏れなくmRNAの発現量を鋭敏に測定する技術である。これまで膵癌、腎癌とも6症例分についてHiCEPフラグメントの作成が完了している。

#### <3> NGSを組み合わせたHiCEPフラグメントのカタログ化・データベース化

従来、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、このフラグメントの一部を 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。“NGS-HiCEP 法”と名付けられたこの解析方法の開発は、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。

HiCEP 法によるスクリーニングは、DNA マイクロアレイや RNA シークエンス法などの既存の実験方法と比較して、極めて高感度かつ網羅的・定量的に発現解析が実行可能であり、低発現の遺伝子においても癌特異性を検出できている。また、これまでの予備的研究により、担癌動物モデルを用いた同様の解析で、血液マーカーの検出にも成功している。

#### 4. 研究成果

これまで膵癌は約 90 症例、腎癌は約 100 症例を収集することができており、うち膵癌、腎癌とも 6 症例分について HiCEP フラグメントの作成が完了した。この結果と NGS 法から、長短を問わない全発現分子を分子疫学的手法により網羅的にカタログ化・データベース化し、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、膵癌及び腎癌から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し (図 2、3)、この結果は他の症例検体でも再現可能であったことから、この手法の開発についての論文を現在準備中である。

さらに、膵癌及び腎癌のそれぞれ 2 症例に対し、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」解析を実施した (図 4)。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。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、今後の NGS-HiCEP 法の益々の発展が期待される。

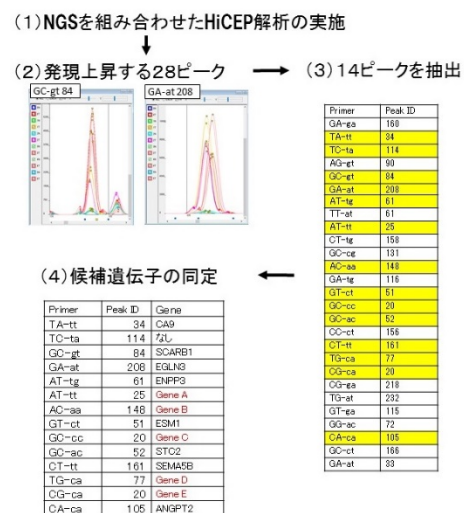
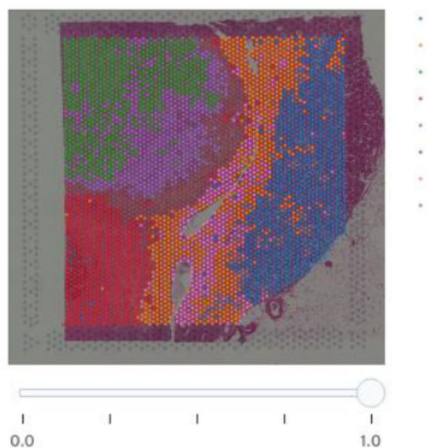


図 2 新規腎癌マーカー候補分子 NGS-HiCEP 法により、癌部において発現が増加している候補分子を複数同定した。

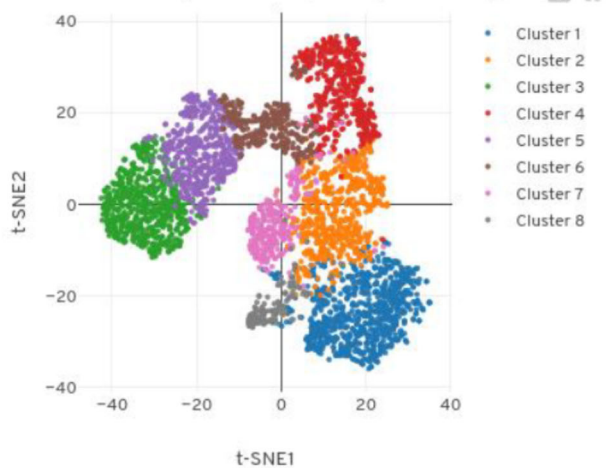
A			B		
Primer	Peak ID	Gene	Primer	Peak ID	Gene
CT-aa	6	Gene F	AA-ga	52	Gene H
AG-cc	63	Gene G	GG-tt	89	Gene I
TT-ct	174	GPRC5A	AA-ca	103	Gene J
AT-ga	46	AKR1B10	CA-ca	140	CCL18
GA-ct	133	CEACAM5	AG-tg	88	ICAM1
CT-ga	50	FBXO32			
GA-ct	274	FN1			

図 3 新規膵癌マーカー候補分子 A) 癌部と非癌部との比較。 B) 再発 2 症例と非癌部 2 症例の癌部での比較。

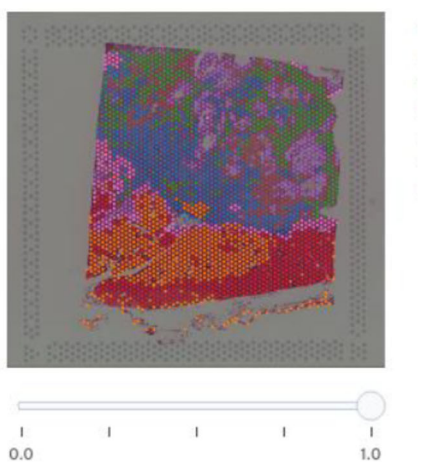
Tissue Plot with Spots Colored by Cluster



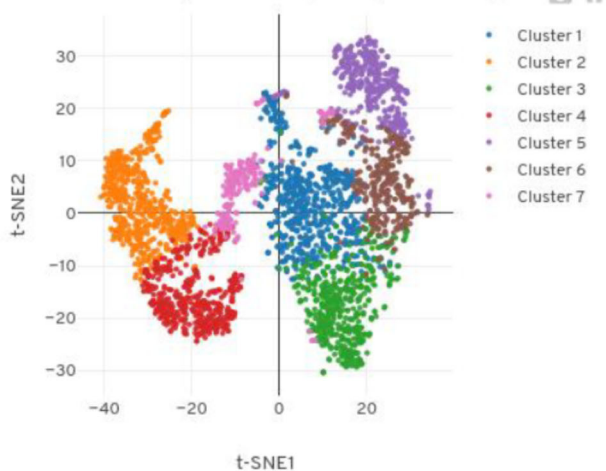
t-SNE Projection of Spots by Clustering



Tissue Plot with Spots Colored by Cluster



t-SNE Projection of Spots by Clustering



#### 図4 膵癌と腎癌の空間トランスクリプトーム解析

現在、膵癌と腎癌それぞれにおいて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0件

〔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 <a href="http://ndmc-ipb.browse.jp/">http://ndmc-ipb.browse.jp/</a>
--

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	中岡 博史  (Nakaoka Hirofumi)  (70611193)	公益財団法人佐々木研究所・附属研究所・部長    (72609)	
研究分担者	永生 高広  (Einama Takahiro)  (70421964)	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・講師)    (82406)	

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