

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590701

研究課題名(和文) 血液単球分画由来リボ核酸を使用した肺癌診断

研究課題名(英文) Lung cancer diagnosis by an mRNA assay for genes in peripheral blood mononuclear cells

研究代表者

緒方 衝 (OGATA, Sho)

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・医学教育部医学科専門課程・講師)

研究者番号：00531435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：血中内の単球あるいは血中に循環する腫瘍細胞内の遺伝子断片を測定し、肺癌早期診断への有用性を検討した。肺癌患者65症例と健常者15例の末梢血の単核球分画からRNAを抽出し、96遺伝子を対象としてlow density arrayでPCRを行った。8遺伝子は健常者ではほぼ測定不能であった。腫瘍患者の血中遺伝子量が健常者に比して有意に増加していた遺伝子は FGF2、MMP9、NANOG、PPBP、S100A4、STAT3、TYMPの7遺伝子で、うちPPBPは腫瘍組織遺伝子量とも有意に相関したが、決定係数は小さかった。血中単核球分画のRNA測定は、現時点において肺癌の早期診断に有用でなかった。

研究成果の概要(英文)：To assess whether early lung cancer prediction might be informed by an mRNA assay for various increased genes in peripheral blood mononuclear cells (PBMNCs) and tumor tissues, we examined specimens taken from 65 carcinoma patients and 15 controls. PBMNCs and tumor-tissue specimens were taken for measurement of the mRNAs of 93 genes by TaqMan low density arrays. In the PBMNCs of the controls, 8 genes were not detected. In PBMNCs, FGF2 mRNA/GAPDH mRNA, MMP9 mRNA/GAPDH mRNA, NANOG mRNA/GAPDH mRNA, PPBP mRNA/GAPDH mRNA, S100A4 mRNA/GAPDH mRNA, STAT3 mRNA/GAPDH mRNA, and TYMP mRNA/GAPDH mRNA levels were significantly higher in the carcinoma patients than in the controls. Although the level of PPBP mRNA/GAPDH mRNA in PBMNCs appeared to correlate with that in tumor-tissue specimens, the coefficient of determination was too small (0.087). Unfortunately, measurement of mRNAs in PBMNCs may not be useful for the early diagnosis of lung carcinoma.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学 病態検査学

キーワード：肺癌 リボ核酸 血中単核球分画由来リボ核酸 PCR

1. 研究開始当初の背景

(1) WHO2007年の統計によると、肺癌患者の死亡率は全癌死の約30%を占め、最も多い。肺癌の診断技法は確立したものの、市民等を対象とした集団検診レベルで早期発見を可能とし、より正確でスクリーニングに応用できる、簡便な血液診断法が期待される。

(2) 現在、タンパク質の診断・治療マーカーは多数存在するが、リボ核酸(RNA)の診断応用はない。

2. 研究の目的

肺癌の早期診断には、前癌段階の病態変化も捕捉する必要があり、腫瘍マーカーとしてのRNAは、極めて正確に病態情報を反映すると考えられる。本研究は、腫瘍内で崩壊した細胞から流出したRNAを貪食した後、血中内に遊走する単球中に存在する、あるいは血中に浸潤する腫瘍細胞内の、腫瘍特異的な遺伝子断片を検査対象とした血中遺伝子診断システムの開発である。

3. 研究の方法

(1) 肺癌患者65例(腺癌51例、扁平上皮癌10例、腺扁平上皮癌2例、大細胞癌1例、小細胞癌+大細胞癌1例)の肺癌切除組織と末梢血21 mL、及び健康者15例の末梢血21 mLを使用した。本研究は、防衛医科大学校倫理委員会の審査により「呼吸器・消化器の腫瘍患者血液より抽出したRNA・DNAを用いた疾患特異的診断法の開発研究 特に血液と腫瘍組織・非腫瘍組織の比較検討」(防衛医科大学校第568号)で承認されている。

(2) 末梢血単核球分画内と腫瘍組織内からRNAを抽出した。腫瘍で増加すると文献的に考えられている93遺伝子(増殖因子・アポトーシス・細胞間

質関連等: *ABCB1, ADAM12, BCL2, BCL2L1, BIRC5, CCNB1, CCND1, CCNE1, CD44, CDC25A, CDC25B, CDC6, CDCP1, CDK2, CDK4, CDK5, CDT1, CTNNB1, CYP2A6, DPYD, DSG3, DYRK2, E2F1, E2F3, EGFR, ENO2, EPHA2, ERBB2, ERBB3, ERBB4, FGF2, FGF9, FGFR2, FLT4, FOXA1, FOXM1, GLI1, GPR87, GRP, HIF1A, HMGA2, HNRNPA2, KIT, KRT14, KRT19, KRT20, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT7, MAGEA1, MAGEA12, MAGEA3, MAGEA4, MDM2, MET, MKI67, MMP11, MMP2, MMP7, MMP9, MSLN, MUC1, MUC4, MUC5AC, MYBL2, MYBL2, MYC, MYCL1, MYCN, NANOG, NKX2-1, NOTCH3, PAX9, PCNA, PDGFB, PIK3CA, POLK, PPBP, PRDX1, PRKCI, PTGS2, RAD17, RAPGEF1, S100A2, S100A4, SOX4, STAT3, TERT, TYMP, TYMS, VEGFA, VEGFC, WNT1, WT1, YWHAZ, GAPDH*の96遺伝子; 内在性コントロール遺伝子を含む)を対象としてTaqMan low density arrayを用いて検索した。その後、臨床所見、予後の相関を検討した。

4. 研究成果

(1) 担癌患者65症例と健康者15例から採取された血液から単核球分画のみを取り出し、その単核球分画からRNAを抽出した。RNAの抽出量はばらつきがみられた。50 μ Lで最終的に抽出すると、RNAは74~880 ng/ μ Lで、平均360 ng/ μ Lであった。

(2) 症例毎に400 ngをcDNAとした後、density arrayトレイに注入し、PCRを行った。健康者では96遺伝子のうち、8遺伝子がほとんど測定できなかった。

(3) 細胞内では恒常的に一定とされる*GAPDH*遺伝

子を使用し、各遺伝子 mRNA / GAPDH mRNA を計算した。各遺伝子 mRNA / GAPDH mRNA では、*YWHAZ* mRNA / GAPDH mRNA が平均 1.06 と最も高く、続いて *S100A4*、*SOX4* で高い値を示した。

(4) 各遺伝子 mRNA / GAPDH mRNA の検討で、担癌患者の血中遺伝子量が健常者に比して有意に多かった遺伝子は *FGF2* (図 1)、*MMP9* (図 2)、*NANOG* (図 3)、*PPBP* (図 4)、*S100A4* (図 5)、*STAT3* (図 6)、*TYMP* (図 7) であった。担癌患者において、血中遺伝子量と腫瘍組織内遺伝子量に有意の相関が *PPBP* に認められたものの、その決定係数 R^2 は小さかった (図 4)。また、*KRT19* の血液内 RNA が高くなることと担癌患者で報告されているが、今回のデータで相関はみられなかった (図 8)。

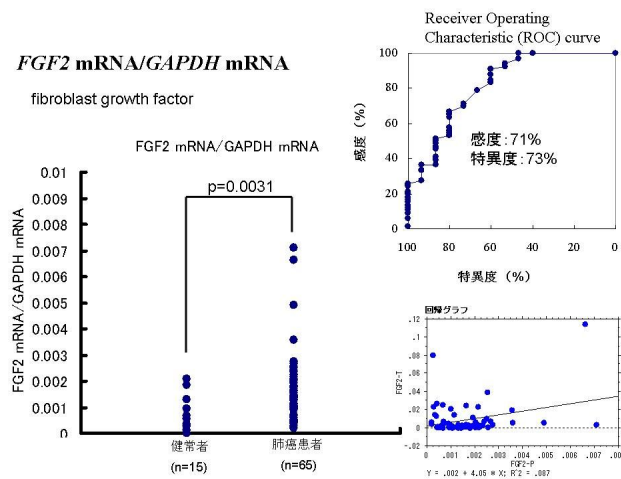


図 1 健常者(n=15)と肺癌患者(n=65)の比較：末梢血単核球分画内 *FGF2* mRNA / GAPDH mRNA とその receiver operating characteristic curve、腫瘍組織内と末梢血単核球分画内 *FGF2* mRNA / GAPDH mRNA 相関

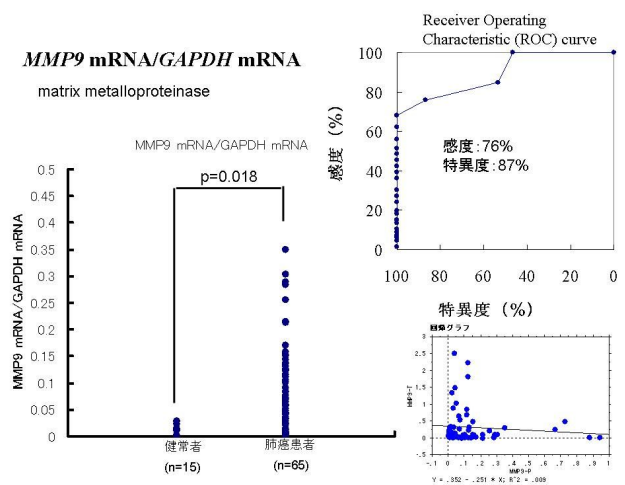


図 2 健常者(n=15)と肺癌患者(n=65)の比較：末梢血単核球分画内 *MMP9* mRNA / GAPDH mRNA とその receiver operating characteristic curve、腫瘍組織内と末梢血単核球分画内 *MMP9* mRNA / GAPDH mRNA 相関

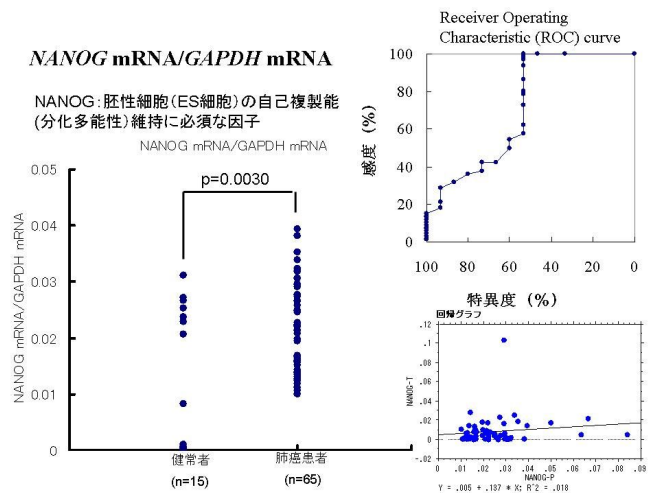


図 3 健常者(n=15)と肺癌患者(n=65)の比較：末梢血単核球分画内 *NANOG* mRNA / GAPDH mRNA とその receiver operating characteristic curve、腫瘍組織内と末梢血単核球分画内 *NANOG* mRNA / GAPDH mRNA 相関

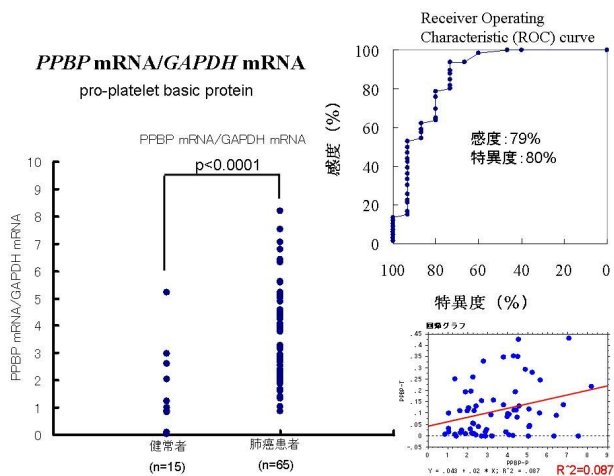


図 4 健康者(n=15)と肺癌患者(n=65)の比較：末梢血単核球分画内 *PPBP mRNA/GAPDH mRNA* とその receiver operating characteristic curve、腫瘍組織内と末梢血単核球分画内 *PPBP mRNA/GAPDH mRNA* 相関

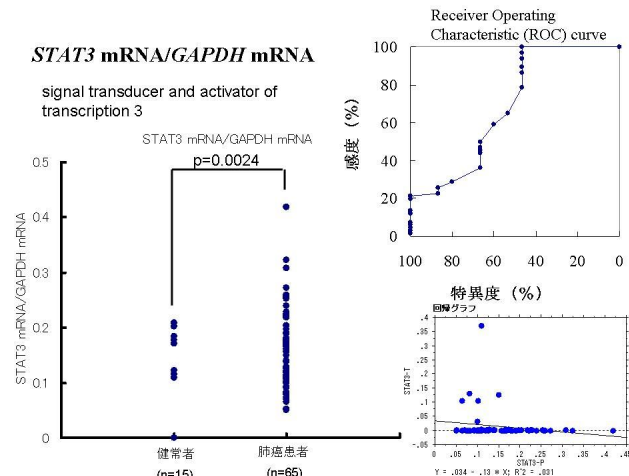


図 6 健康者(n=15)と肺癌患者(n=65)の比較：末梢血単核球分画内 *STAT3 mRNA/GAPDH mRNA* とその receiver operating characteristic curve、腫瘍組織内と末梢血単核球分画内 *STAT3 mRNA/GAPDH mRNA* 相関

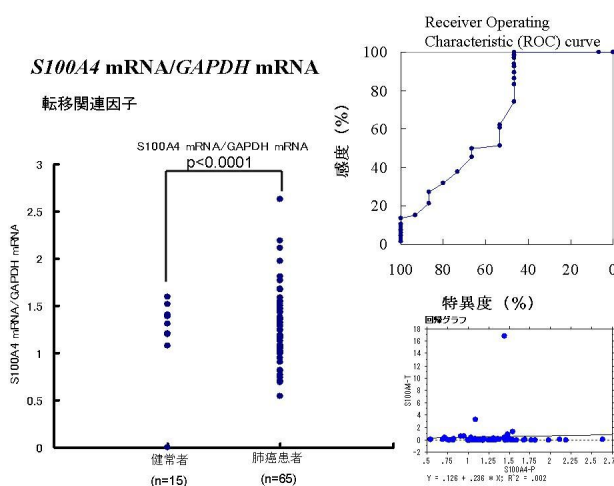


図 5 健康者(n=15)と肺癌患者(n=65)の比較：末梢血単核球分画内 *S100A4 mRNA/GAPDH mRNA* とその receiver operating characteristic curve、腫瘍組織内と末梢血単核球分画内 *S100A4 mRNA/GAPDH mRNA* 相関

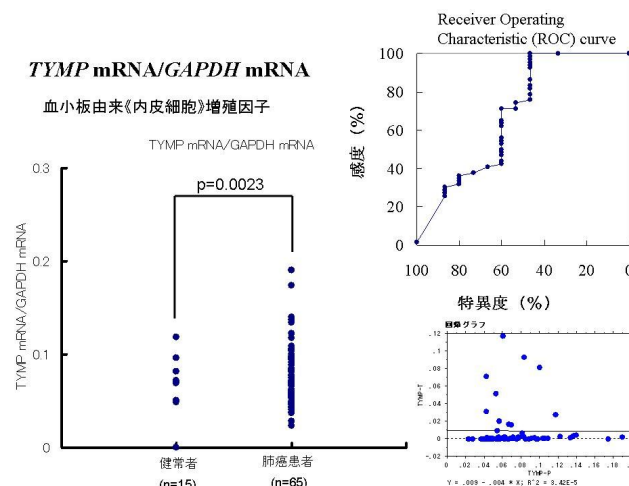


図 7 健康者(n=15)と肺癌患者(n=65)の比較：末梢血単核球分画内 *TYMP mRNA/GAPDH mRNA* とその receiver operating characteristic curve、腫瘍組織内と末梢血単核球分画内 *TYMP mRNA/GAPDH mRNA* 相関

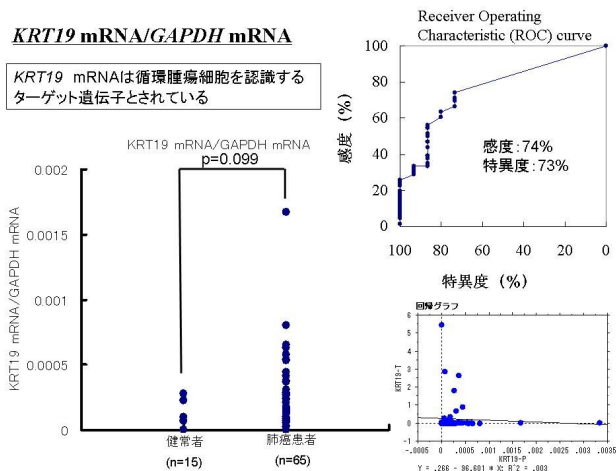


図 8 健康者(n=15)と肺癌患者(n=65)の比較：末梢血単核球分画内 *KRT19 mRNA/GAPDH mRNA* とその receiver operating characteristic curve、腫瘍組織内と末梢血単核球分画内 *KRT19 mRNA/GAPDH mRNA* 相関

このように TaqMan low density array 解析のデータを基に、93 遺伝子を対象に検討したところ、一部の遺伝子では腫瘍細胞内と末梢血単核球分画内で緩やかな相関を有しており、検索外の遺伝子群により強い相関を持つものがある可能性も示唆された。健康者に比して担癌症例で増加していた腫瘍関連遺伝子は少数であったため、当初計画していた数式モデル化は今回の検討ではできなかった。

本研究では、肺癌患者における腫瘍特異的な遺伝子断片を検査対象とした血中遺伝子診断システムの開発を目指したが、現時点において、血中単核球分画由来の RNA は早期診断に有用でないものと考えられた。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

緒方衝、中西邦昭、島崎英幸、廣井禎之、玉井誠一。肺癌患者における血液単核球分画中 mRNA の検討。第 60 回日本臨床検査医学会学術

集会、平成 25 年 10 月 31 日～11 月 3 日、神戸国際会議場(兵庫県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

緒方 衝 (OGATA, Sho)

防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・講師

研究者番号：0 0 5 3 1 4 3 5

(2) 研究分担者

尾関 雄一 (OZEKI, Yuichi)

防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・准教授

研究者番号：8 0 5 1 0 6 2 7

中西 邦昭 (NAKANISHI, Kuniaki)

防衛医科大学校・病院・准教授

研究者番号：6 0 5 2 3 1 1 5

田中 文啓 (TANAKA, Fumihiro)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：1 0 2 8 3 6 7 3

三尾 直士 (MIO, Tadashi)

独立行政法人国立病院機構 (京都医療センター臨床研究センター)・その他部局等・研究員

研究者番号：9 0 2 4 3 0 9 7