

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670386

研究課題名(和文)末梢血中のフコシル転位酵素mRNA検出による新規膵癌迅速診断法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel pancreatic cancer rapid diagnostic method by the fucosyltransferases mRNA detection in peripheral blood

研究代表者

加藤 淳二(Kato, Junji)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：20244345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん診療において、末梢血液を用いて癌細胞やそれに由来する蛋白や核酸を高感度で迅速に測定することが可能であれば、がんの診断や治療効果のモニタリングに大変有用である。現在CA19-9の様な多くのフコシル化抗原が膵癌の診断に汎用されている。申請者らはフコース転移酵素に着目し、末梢血から抽出した核酸分画から ddPCR を用いてそれぞれのフコース転位酵素 mRNA を検出する、膵癌の新規 MRD検出法を開発した

研究成果の概要(英文)：It is very useful for the diagnosis of cancer and monitoring of the curative effect if we can rapidly measure protein and a nucleic acid from cancer cell in the peripheral blood with high sensitivity. Numerous fucosylated antigens in sera like CA19-9 serve as tumor markers for pancreatic cancer. We developed a novel pancreatic cancer rapid diagnostic method by the fucosyltransferases mRNA detection in peripheral blood using Droplet Digital PCR (ddPCR).

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 フコース転移酵素 digital PCR

1. 研究開始当初の背景

膵癌は、現在本邦における癌死亡原因の第5位であり、年間約 25,000 人を超える死亡数が推計されており、年々増加の一途を辿っている。膵癌は浸潤性が高く、早期に転移しやすいことから極めて予後不良な癌の一つであり早期診断法の開発が期待されている。現状では、膵癌の診断には腫瘍マーカー (CA19-9, SLX) による血清診断, CT, 超音波診断に加え、超音波内視鏡下吸引細胞診 (EUS-FNA) を用いて確定診断を行っている。しかしながら、何れの検査も正診率や感度が低いなどの問題もあり、より精度の高い、優れた modality の開発が期待されている。さらに、より早期に MRD を検出し、治療効果をモニタリングできる biomarker も必要である。

2. 研究の目的

近年, CTC, 末梢血遊離 DNA や miRNA を高感度 PCR により検出し MRD の検出に用いる試みがなされているが、腫瘍特異性に乏しく満足すべき結果が得られていない。一方、申請者は膵癌で CA19-9 や SLX といった臓器特異的な腫瘍マーカーを産生することが知られていることに着目し、経静脈的に膵癌細胞に特異的に取り込ませる、新たな標的抗がん療法を開発した (Yoshida M, Takimoro R, Kato J, PLoS ONE 2012)。即ち、これらの腫瘍マーカーはそれぞれ I 型, II 型糖鎖であり、癌細胞表面の糖タンパク上の carbohydrate へのフコシル化で生じる。つまり膵癌細胞では fucosyltransferase (FUT) 活性が高く (Mas, et al., Glycobiology, 1988), かつフコースを積極的に取り込み、上述したようなフコシル化糖鎖抗原を血中

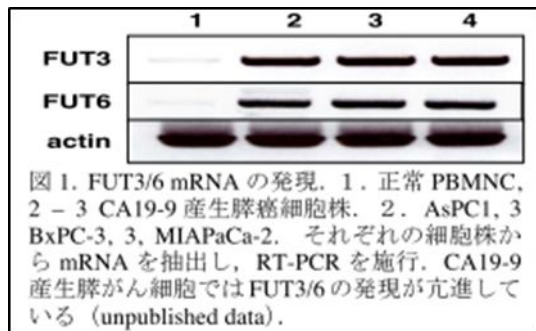


図 1. FUT3/6 mRNA の発現。1. 正常 PBMNC, 2-3 CA19-9 産生膵癌細胞株。2. AsPC1, 3 BxPC-3, 3. MIAPaCa-2。それぞれの細胞株から mRNA を抽出し、RT-PCR を施行。CA19-9 産生膵がん細胞では FUT3/6 の発現が亢進している (unpublished data)。

に放出すると考えられる (図 1)。更に、上記腫瘍マーカー産生に必須な酵素である FUT3 および FUT6 が、癌の転移・浸潤に寄与する上皮間葉移行 (EMT) の促進分子である TGF- β の活性を制御しているこ

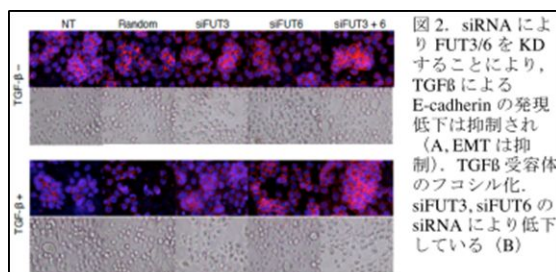


図 2. siRNA により FUT3/6 を KD することにより、TGF β による E-cadherin の発現低下は抑制される (A. EMT は抑制)。TGF β 受容体のフコシル化、siFUT3, siFUT6 の siRNA により低下している (B)

とも報告した (Hirakawa M, Takimoto R, Kato J, Br J Cancer in press, 図 2)。

つまりこれらの事実から CA19-9 などのフコシル化腫瘍マーカー産生癌においては、フコース転位酵素が癌特異的に発現しており biomarker となる可能性があると考えられる。そこで本研究では、フコース転位酵素の末梢血遊離核酸を ddPCR により検出する、膵癌における新規 MRD 検出法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 対象症例の規定: S-1, Gemcitabine など化学療法レジメン対象患者から化学療法開始前 4 週間以内にベースラインの病変の評価 (RECIST v1.1 および膵癌取り扱い規約に準ずる) および原発巣の治療前生検組織採取ならびに血漿の採取を行う。化学療法後に病変が縮小し根治切除が可能と判断され、手術を行った症例に対してはその原発巣または転移巣の新鮮材料とその時点での血漿も採取する。末梢血液は分離後、生検・手術材料はただちに液体窒素により凍結し、-80 °C で保存する。副作用 (Common Toxic Criteria for Adverse Events ver4.0 にて評価) や患者希望によるプロトコール治療の中止等で治療を完遂できなかった症例については解析対象から除外する。すべての患者に対し、インフォームドコンセントを取るとともに、内部の倫理審査委員会の同意を得る。化学療法前生検や CT については不必要な患者負担を避けるため、原則として通常癌診療にてルーティンに行われる治療前内視鏡観察・生検診断および画像検査の一環として行う。

2) 手術施行例の解析: 手術施行例では手術直近の画像所見を用いた RECIST ver1.1 判定基準による最良総合効果および切除標本の病理組織像から、非切除例では化学療法 2 コース終了以降の画像所見を用いた RECIST 判定基準により各化学療法の効果判定を行い、全症例を奏効群 (膵癌各取り扱い規約、組織学的効果判定基準準じて作成した効果判定基準で Grade1b 以上、または RECIST にて最良総合効果 PR または CR) と非奏効群 (組織学的効果判定基準で Grade0 または 1a、または RECIST にて最良総合効果 PD または SD) の 2 群に分類する

3) 各種膵癌細胞の Fucosyltransferase mRNA 発現の検討: 各種膵癌樹立細胞株 (AsPC-1, PANC-1, MIAPaCa-2, KP-4, PK45H, BxPC-3 など) 5 x 10⁶ 個の細胞から total RNA を抽出し、cDNA を合成後、FUC1-11 までの isozyme について RT-PCR を行い陽性コントロールとしてそれらの発現を確認する。なお、いずれの isozyme も cDNA sequence が同定されており、primer の設計は可能である (Mas, et al., Glycobiology, 1988)。

4) 各種膵癌細胞の糖鎖関連分子発現の網羅的解析: 各種樹立細胞株 (AsPC-1, PANC-1,

MIAPaCa-2, KP-4, PK45H, BxPC-3 など) 5×10^6 個の細胞から total RNA を抽出し, RT2-Profiler PCR Array システムを用いて, FUT を中心とした糖鎖修飾関連分子の発現を RT-PCR を行いそれらの発現を確認する.

5) 各種膵癌細胞の Fucosyl transferase (FUT) 蛋白発現の解析: 各種樹立細胞株 (AsPC-1, PANC-1, MIAPaCa-2, KP-4, PK45H, BxPC-3 など) 1×10^6 個の細胞を可溶化し蛋白を抽出し, ウェスタンブロット解析を行なう. FUT に対する各種抗体を 1 次抗体として, 既報に基づきその発現を解析する. 更に, 上記 2 の結果で, 新たな候補因子が同定されれば, これに対するウェスタンブロットも行ない, 蛋白レベルでの発現亢進あるいは低下を精査する.

6) 膵癌患者血漿 DNA の digital PCR による解析: Digital PCR は QX100 droplet PCR system (Bio-Rad) を用いて行なう. 前記 2 で得られた血漿中 DNA は QIAamp MinElute virus spit kit を用いて抽出する. FUT に対する primer 45nM に対して probe は 12.5nM に設定し, $10 \mu\text{L}$ の master mix に懸濁し QX100 droplet generator で分画後, 96 well プレートを用いて G-Strom GS4 thermal cycler で PCR 反応を行なう. プレートは Bio-Rad QX100 droplet reader にかき QuantaSoft v1.2 で解析する.

7) 膵癌患者における糖鎖関連分子の発現の解析: 前記 2) より得られた治療前材料から遺伝子数 38500 のオリゴ型マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行う. 血漿 DNA, 生検組織から腫瘍成分をマイクロダイセクター LM100 (OLYMPUS) にて正確に採取する. 次いで RNeasy Plus Micro kit (Qiagen) を用い, 癌部組織からトータル RNA の抽出を行う. 夾雑物である DNA は RNase-free DNase (Qiagen) を用いて除去する. 全量 RNA を用い, two-cycle target labeling and control reagents kit (Affymetrix) を用いて cRNA を合成する. HG-U133 Plus 2.0 マイクロアレイ (Affymetrix) のハイブリダイゼーション, 洗浄, 抗体によるシグナル増幅は Affymetrix 社のプロトコルに従う (GeneChip Technical Manual). Quantile normalization 法を用いて, マイクロアレイデータのノーマライズを行う. ノーマライズ計算には統計処理ソフトウェア R 2.8.1 および BioConductor パッケージを用いる. 得られた遺伝子発現量を \log_2 値に変換するとともに, コントロール用プローブセットを除去. HG-U133 Plus 2.0 の 54,613 プローブセットの発現強度に対して, 治療奏効群と非奏効群の 2 群における幾何平均値の倍差である fold-change (FC) を求めるとともに, Wilcoxon 順位和検定を用いて遺伝子発現量の差に対する統計的検定を行う. その後, FC が 2 群間で 10 倍以上となり, かつ Wilcoxon 順位和検定で $p < 0.001$ となるプローブセットのみを抽出する. 選択された遺

伝子を用い, R ソフトウェアにより階層的クラスタリングを行う. 距離法にはピアソンの相関係数を用い, クラスタリングには完全連結法を用いる. クラスタリングに先立ち, 遺伝子発現データは各プローブセットに対して z 変換により標準化を行なう.

8) MRD 検出マーカーとしての検証: 上記で明らかとなった糖鎖関連分子, ならびに FUT の癌組織における発現を膵癌患者由来癌組織において免疫染色で検討する. 更に血中 DNA を用いて RT-PCR あるいは ddPCR を行ないその発現を検討する. Preliminary な解析として, retrospective な検討を行い予後, 治療反応性などを検証する.

4. 研究成果

1) 対象症例の規定: 方法に示した通り, 化学療法レジメン対象患者から化学療法開始前 4 週間以内にベースラインの病変の評価および原発巣の治療前生検組織採取ならびに血漿の採取を行った. 末梢血液は分離後, 生検・手術材料はただちに液体窒素により凍結し, -80°C で保存した.

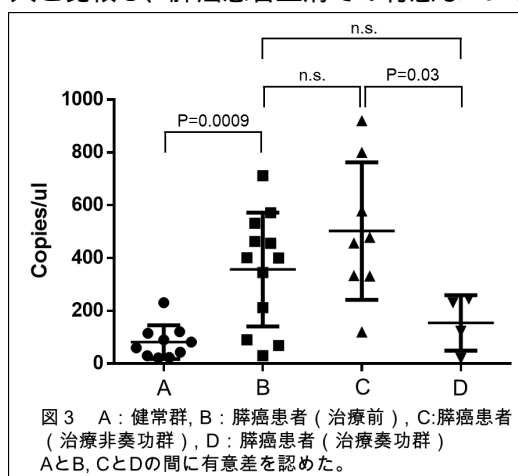
2) 手術施行例の解析: 方法に示した通り手術施行例と非施行例に分けて, 効果判定を行い, 全症例を奏効群と非奏効群の 2 群に分類した.

3) 各種膵癌細胞の Fucosyltransferase mRNA 発現の検討: AsPC-1, PANC-1, MIAPaCa-2, KP-4, PK45H, BxPC-3 (各々 5×10^6 個) から total RNA を抽出し, cDNA を合成後, FUC1-11 の発現を確認した.

4) 各種膵癌細胞の糖鎖関連分子発現の網羅的解析: AsPC-1, PANC-1, MIAPaCa-2, KP-4, PK45H, BxPC-3 の FUT を中心とした糖鎖修飾関連分子の発現を RT-PCR を行いそれらの発現を確認した.

5) 各種膵癌細胞の FUT 蛋白発現の解析: AsPC-1, PANC-1, MIAPaCa-2, KP-4, PK45H, BxPC-3 においてウェスタンブロット解析を行ない, FUT 蛋白発現を確認した.

6) 7) 8) 膵癌患者血漿, 組織を使用し, DNA の digital PCR と免疫染色による検討をおこなった. その結果図 3 に示すように健常人と比較し, 膵癌患者血清での有意な FUT 発



現の上昇を認めた。さらにその治療反応性を見たところ、奏功群において低下傾向を認めた。これにより患者血清を使用する事で簡便で尚且つ高感度に膵癌患者の治療前後の評価が出来る可能性が示唆された。今後も症例数を増やし、統計学的な有意差が得られるかどうかを検討したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計13件)

1. Osuga T, Takimoto R, Ono M, Hirakawa M, Yoshida M, Okagawa Y, Uemura N, Arihara Y, Sato Y, Tamura F, Sato T, Iyama S, Miyanishi K, Takada K, Hayashi T, Kobune M, Kato J. Relationship Between Increased Fucosylation and Metastatic Potential in Colorectal Cancer. J Natl Cancer Inst. 2016 Apr 13;108(8). 査読あり

2. Hashimoto A, Sato T, Iyama S, Yoshida M, Ibata S, Tatekoshi A, Kamihara Y, Horiguchi H, Murase K, Kawano Y, Takada K, Miyanishi K, Kobune M, Ichimiya S, Kato J. Narrow-Band Ultraviolet B Phototherapy Ameliorates Acute Graft-Versus-Host Disease of the Intestine by Expansion of Regulatory T Cells. PLoS One. 2016 Mar 31;11(3) 査読あり

3. Horiguchi H, Kobune M, Kikuchi S, Yoshida M, Murata M, Murase K, Iyama S, Takada K, Sato T, Ono K, Hashimoto A, Tatekoshi A, Kamihara Y, Kawano Y, Miyanishi K, Sawada N, Kato J. Extracellular vesicle miR-7977 is involved in hematopoietic dysfunction of mesenchymal stromal cells via poly(rC) binding protein 1 reduction in myeloid neoplasms. Haematologica. 2016 Apr;101(4):437-47. 査読あり

4. Kubo T, Kawano Y, Himuro N, Sugita S, Sato Y, Ishikawa K, Takada K, Murase K, Miyanishi K, Sato T, Takimoto R, Kobune M, Nobuoka T, Hirata K, Takayama T, Mori M, Hasegawa T, Kato J. BAK is a predictive and prognostic biomarker for the therapeutic effect of docetaxel treatment in patients with advanced gastric cancer. Gastric Cancer 2015 in press. 査読あり

5. Koike K, Terui T, Nagasako T, Horiuchi I, Machino T, Kusakabe T, Hirayama Y, Mihara H, Yamakage M, Kato J, Nishisato T, Ishitani K. A new once-a-day fentanyl citrate patch (Fentos®Tape) could be a new treatment option in patients with end-of-dose failure using a 72-hour transdermal fentanyl matrix patch. Support Care Cancer 2015 in press. 査読あり

6. Hoki T, Miyanishi K, Tanaka S, Takada

K, Kawano Y, Sakurada A, Sato M, Kubo T, Sato T, Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Kato J. Increased duodenal iron absorption through upregulation of DMT1 due to enhancement of IRP1 activity in patients with NASH. Hepatology 2015 in press. 査読あり

7. Hirayama Y, Ishitani K, Sato Y, Iyama S, Takada K, Murase K, Kuroda H, Nagamachi Y, Konuma Y, Fujimi A, Sagawa T, Ono K, Horiguchi H, Terui T, Koike K, Kusakabe T, Sato T, Takimoto R, Kobune M, Kato J. Effect of duloxetine in Japanese patients with chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a pilot randomized trial. Int J Clin Oncol 2015 in press. 査読あり

8. Miyanishi K, Hoki T, Tanaka S, Kato J. Prevention of hepatocellular carcinoma: Focusing on antioxidant therapy. World J Hepatol 2015 27:593-599. 査読あり

9. Sato Y, Ohnuma H, Hirakawa M, Takahashi M, Osuga T, Okagawa Y, Murase K, Takada K, Kawano Y, Iyama S, Hayashi T, Sato T, Miyanishi K, Takimoto R, Kobune M, Okita K, Mizuguchi T, Furuhashi T, Hirata K, Kato J. A dose-escalation study of oxaliplatin/capecitabine/irinotecan(XELOXIRI) and bevacizumab as a first-line therapy for patients with metastatic colorectal cancer. Cancer Chemoth Pharm 2015;75:587-594. 査読あり

10. Mitsui Y, Sato Y, Miyamoto H, Fujino Y, Takaoka T, Miyoshi J, Kagawa M, Ohnuma H, Hirakawa M, Kubo T, Osuga T, Sagawa T, Sato Y, Takahashi Y, Katsuki S, Okuda T, Takimoto R, Kobune M, Nobuoka T, Hirata K, Kato J, Takayama T. Trastuzumab in combination with docetaxel/cisplatin/S₁ (DCS) for patients with HER2-positive metastatic gastric cancer: feasibility and preliminary efficacy. Cancer Chemoth Pharm 2015;76:375-382. 査読あり

11. Ishiwatari H, Hayashi T, Yoshida M, Ono M, Sato T, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Masuko H, Miyamoto A, Sonoda T, Kato J. EUS-guided celiac plexus neurolysis by using highly viscous phenol-glycerol as a neurolytic agent (with video). Gastrointest Endosc 2015;81:479-483. 査読あり

12. Ishiwatari H, Hayashi T, Yoshida M, Ono M, Sato T, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Kato J. Phase I trial of oral S₁ combined with hepatic arterial infusion of gemcitabine in unresectable biliary tract cancer. Cancer Chemother Pharmacol 2015;75:805-812. 査読あり

13. Ohnuma H, Sato Y, Hirakawa M, Okagawa Y, Osuga T, Hayashi T, Sato T,

Miyanishi K ,Kobune M ,Takimoto R ,Sagawa T , Masakazu Hori , Someya M , Nakata K , Sakata K-i ,Takayama T ,Kato J .A Phase 1/2 Study of Definitive Chemoradiation Therapy Using Docetaxel, Nedaplatin, and 5-Fluorouracil (DNF-R) for Esophageal Cancer . Int J Radiat Oncol Bio Phys 2015;93:382-390 . 査読あり

〔学会発表〕(計3件)

国際学会

1 . Kato J , Takimoto R , Osuga T , Ono M , Okagawa Y , Uemura N , Arihara Y , Sato Y , Fumito Tamura . Accumulation of L-Fucose Is a Functional Target for Colorectal Cancer Therapy . The American Association for the Study of Liver Diseases–Digestive Disease Week 2015(DDW 2015): 2015 May 16-19 : Washington DC, U.S.A

2 . Kato J , Takimoto R , Osuga T , Ono M , Hirakawa M , Yoshida M , Sato Y , Tamura F . Targeting SN38 delivery to gastrointestinal cancer cells using a fucose-bound nanoparticle approach . AACR Annual Meeting 2014 : 2014 Apr 5-9 : San Diego, USA

3 . Takimoto R , Hirakawa M , Tamura F , Yoshida M , Ono M , Sato Y , Osuga T , Kato J .Fucosylated TGF- receptors transduces a signal for epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells . AACR Annual Meeting 2014 : 2014 Apr 5-9 : San Diego, USA

6 . 研究組織

(1)研究代表者

加藤淳二 (Kato Junji)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 20244345

(2)研究分担者

瀧本理修 (Takimono Risyu)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 10333699

大須賀崇裕 (Osuga Takahiro)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号 : 40619714

岡川泰 (Okagawa Yutaka)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号 : 50722386