

膵癌の早期診断に役立つ血中の反復配列 RNA の高感度測定法を開発

1. 発表者：

岸川 孝弘 （東京大学医学部附属病院 消化器内科 特任臨床医）
大塚 基之 （東京大学医学部附属病院 消化器内科 助教（特任講師（病院））
小池 和彦 （東京大学医学部附属病院 消化器内科
／東京大学大学院医学系研究科 内科学専攻 消化器内科学 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆ これまでは測定が困難だった反復配列 RNA とよばれる特殊な RNA の定量法を開発し、これが膵癌患者及び前癌病態患者の血液中に高頻度に検出されることを見出しました。
- ◆ 本研究成果は、反復配列 RNA の定量系を初めて樹立するとともに、血液検査による新たな膵癌スクリーニング法を開発した点で重要な成果です。
- ◆ 本成果は、早期診断が難しく予後不良な膵癌の早期発見に貢献するとともに、反復配列 RNA の発現に関わる疾患メカニズムの研究推進にも寄与することが期待されます。

3. 発表概要：

日本でも罹患数が増え続けている膵癌は、早期診断が現状では困難で高度進行状態で見つかることの多い難治性癌の代表です。このため、膵癌の早期発見を可能にする、検診レベルで導入できるバイオマーカーの開発が急がれています。

東京大学医学部附属病院 消化器内科の岸川孝弘 特任臨床医、大塚基之 助教（特任講師（病院））、小池和彦 教授は、膵癌組織中で多量に発現していることがマサチューセッツ総合病院の研究グループから以前に報告されたものの、簡便な定量が困難であった HSATII RNA とよばれる反復配列 RNA（注1）を、血清から簡便かつ高感度に測定する方法を世界で初めて開発しました。患者血清を用いた検討により、本方法を用いた血中 HSATII RNA の測定は、膵癌患者の早期診断だけでなく前癌病態の囲い込み（注2）にも有用である可能性が示されました。本成果は、今後 さらに多数の検体での検証を重ねることにより、採血による膵癌の簡便な早期診断・前癌病態の囲い込みの実現に道を開く、極めて重要な成果といえます。

なお、本研究は、日本医療研究開発機構（AMED）の「橋渡し研究加速ネットワークプログラム」、日本学術振興会・科学研究費補助金、国際科学技術振興財団などの支援によって行われたものであり、日本時間 6 月 2 日に米国科学雑誌 *JCI Insight* にて発表されました。

4. 発表内容：

【研究の背景】

日本では膵癌の罹患者数が増加傾向にあり、現在 臓器別での癌死因の第 4 位まで上がってきています。膵癌は早期診断が難しく、ほとんどの患者は診断時に高度進行状態で見つかり、外科的切除ができないことが多いのが現状です。治療法の進歩があるとはいえ、現在でも罹患者数と死亡者数がほぼ同数である難治性癌の代表と言えます。このため、発癌の高リスク群を囲い込む、あるいは膵癌早期発見を可能にする高感度かつ検診レベルで導入可能な低侵襲・低コストなバイオマーカーの開発が急務です。

現在 日常臨床で汎用されている膵癌の血中バイオマーカーは糖鎖抗原 CA19-9 あるいは胎児特異抗原 CEA ですが、感度・特異度とも低く満足いくものではありません。そこで、糖鎖

解析やプロテオーム解析などを用いた新規バイオマーカー開発が進められています。血中の癌特異的核酸（注 3）定量もその一つとして注目されており、血中の膵癌特異的 DNA 変異の検出や、癌特異的 microRNA（注 4）や長鎖非コード RNA（注 5）の定量など、癌組織から血中に遊離する核酸を捉えることによる早期診断の可能性が数多く検討されています。

2011 年、マサチューセッツ総合病院の Ting DT らが、次世代シーケンサーを用いて、膵癌およびその前癌病態で HSATII とよばれるゲノム領域から転写される反復配列 RNA が異常高発現していることを報告しました。この領域は現行のシーケンス手法ではノイズとしてマスキングされる部位であり従来の解析手法では見逃されていた可能性が高い領域です。

HSATII RNA の発現は、正常組織ではほとんど見られないのに対して膵癌では高度と極めて特異性が高く、これを血中で検出することができれば、有力なバイオマーカーとなると考えられました。しかしながら、反復配列 RNA の定量は、その反復性ゆえに従来の PCR 法（注 6）による増幅が難しく、簡便かつ正確な定量は困難でした。

【研究の内容】

本研究では、HSATII RNA を高感度に定量するための方法として、TRAP 法（Tandem Repeat Amplification 法）を考案しました（図 1）。この方法は、1) 反復配列 RNA のコアとなっている 21 塩基の繰り返し配列に相補的なビオチン化 probe を作製し、採取した RNA とこの probe を混合することで、まずコアとなる繰り返し配列に probe をハイブリダイズ（核酸の分子が相補的にくっつく性質を利用して結合させること）させます。2) そこに RNaseA/T1 と呼ばれる二重鎖 RNA 以外の RNA を切断・分解する酵素で処理することにより、二重鎖を作っている probe とコア配列以外の、余分な配列と余分な probe を除去します。3) 次に、得られたビオチン化プローブとそれがハイブリダイズしているコア配列 RNA を集めます。4) さらにこのサンプルを、微量検体を正確に増幅して定量できる droplet digital PCR 法（注 7）を用いて定量します。

このように TRAP 法と digital PCR 法を組み合わせた TRAP-ddPCR 法で、1 pg の HSATII RNA でもそのコア配列の定量が可能となり、血中を流れる癌由来の微量な HSATII RNA をも、正確に検出できるようになりました。

次に、この方法を用いて、実際の膵癌患者の血清 400 μ l からの HSATII RNA の検出について検討を進めました（図 2）。まず、最初の検討対象として膵癌患者 20 人と、明らかに癌の無い健常人 20 人の血清を用いて TRAP-ddPCR 法により HSATII RNA を定量したところ、血中 HSATII RNA は膵癌患者で有意に多く検出され（血清 1 μ l あたりの中央値で健常人 3 コピーに対して膵癌患者 15 コピー）、HSATII RNA を用いた膵癌患者診断の感度・特異度とも、従来用いられている血中バイオマーカーの糖鎖抗原 CA19-9 を上回る結果でした。さらに、この方法の有用性を確認するために、別の新たな膵癌患者 10 人と健常人 10 人、および膵癌の前癌病態（年率約 1%で膵癌を発生する）と考えられている膵管内乳頭粘液性腫瘍（Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm: IPMN、注 8）を持つ患者 10 人の血清を用いて、TRAP-ddPCR 法による血中 HSATII RNA の検出を行いました。その結果、やはり膵癌患者の血中で HSATII RNA は健常人に比べ有意に高いレベルで検出されました（血清 1 μ l あたり、中央値で健常人 3 コピーに対して膵癌患者 17 コピー）。特筆すべきことに、膵癌患者のうち外科切除ができた 2 例では、手術後の血中 HSATII RNA が術前に比べ有意に低下したことも確認できました。それだけでなく、IPMN 患者の血中でも既に HSATII RNA は健常人に比べて高値であり、血中 HSATII RNA の測定は膵癌患者の早期診断を目的としたスクリーニングだけでなく、膵癌の前癌病態の囲い込みにも有用である可能性が示唆されました。

【社会的意義・今後の予定】

本研究は従来測定が困難であった反復配列 RNA の定量系を新たに開発することによって血液を用いた膵癌患者および前癌病態のスクリーニング法を確立した点で社会的にも臨床的にも重要な発見です。また、基礎的な見地から、HSATII RNA を含むさまざまな反復配列 RNA が惹起する可能性のある発癌機構やさまざまな病気のメカニズムの解明研究の推進においても、今回開発した定量法の貢献が期待されます。今後は、今回開発した HSATII RNA 検出法のキット化等による本方法の普及と、多数の臨床例での有効性・特異性の検証を続け、早期診断が困難で難治癌の代表でもある膵癌の早期診断・前癌病態の囲い込みの実現を通して、生命科学研究の社会への還元を目指していきます。

5. 発表雑誌：

雑誌名 : *JCI Insight*

論文タイトル : Quantitation of circulating satellite RNAs in pancreatic cancer patients

著者 : 岸川孝弘、大塚基之*、吉川剛史、大野元子、山本恵介、山本夏代、幸谷愛、小池和彦 (* 責任著者)

DOI 番号 : 10.1172/jci.insight.86646

6. 問い合わせ先：

<研究内容に関するお問い合わせ先>

東京大学医学部附属病院 消化器内科

特任臨床医 岸川 孝弘 (きしかわ たかひろ)

電話 : 03-5800-8812 E-mail : tkishikawa-tky@umin.ac.jp

助教 (特任講師 (病院)) 大塚 基之 (おおつか もとゆき)

電話 : 03-5800-8812 E-mail : otsukamo-tky@umin.ac.jp

<取材に関するお問い合わせ先>

東京大学医学部附属病院 パブリック・リレーションセンター

担当 : 渡部、小岩井

電話 : 03-5800-9188 (直通) E-mail : pr@adm.h.u-tokyo.ac.jp

7. 用語解説：

(注1) **反復配列 RNA**：ゲノム DNA の中心領域に密集して存在する、一定の塩基配列が数多く反復する領域から主に転写されて出てくる RNA。通常の状態ではほとんど RNA には転写されていないが、発生過程や癌などの異常に伴って RNA として発現することがある。

(注2) **囲い込み**：癌の早期発見のためには、発癌しやすい集団について集中的に経過を追うことが効率的である。このような発癌リスクの高い集団を何らかの形で同定する(囲い込む)ことが臨床的に重要である。

(注3) **核酸**：細胞内にある DNA あるいは RNA。癌特異的な DNA 変異や、癌特異的に転写されて発現量が変化する RNA などの検出が、バイオマーカーとして着目されている。

(注4) **microRNA**：蛋白に翻訳されない短い RNA。主に、他の mRNA から蛋白への翻訳の調節に関わっている。癌特異的に発現量が変化する microRNA を見だし、それを定量することで診断に用いることが研究されている。

(注5) **長鎖非コード RNA**： microRNA と同様に蛋白に翻訳されないが、長い配列を持つ RNA。

主に核内でゲノム DNA から RNA への転写を調節する等の機能を持つ。microRNA と同様に癌特異的に発現変動するものが知られており、診断マーカーとしての有用性が検討されているものもある。

(注6) **PCR 法**： Polymerase chain reaction。増幅したい配列に対する primer を二方向で設定してその間を DNA ポリメラーゼ酵素で倍々に増幅していく方法。原理上、反復配列が対象の場合、primer の設定次第では反復配列のいたるところに priming してしまい、一定の長さのものを特異的に増幅することが困難になる。

(注7) **Droplet digital PCR 法**：微量サンプルを 2 万の droplet に分けて PCR を行い、増幅物が得られた droplet の数を数えることによって測定対象の絶対定量(何 μl 中に何コピーあるかを知る)ができる PCR 法。

(注8) **膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN)**：膵管内にできたポリープが多量の粘液を産生し膵管が拡張する疾患。主膵管にできる主膵管型と分枝膵管にできる分枝型がある。膵癌の前癌病変として知られる。

8. 添付資料：

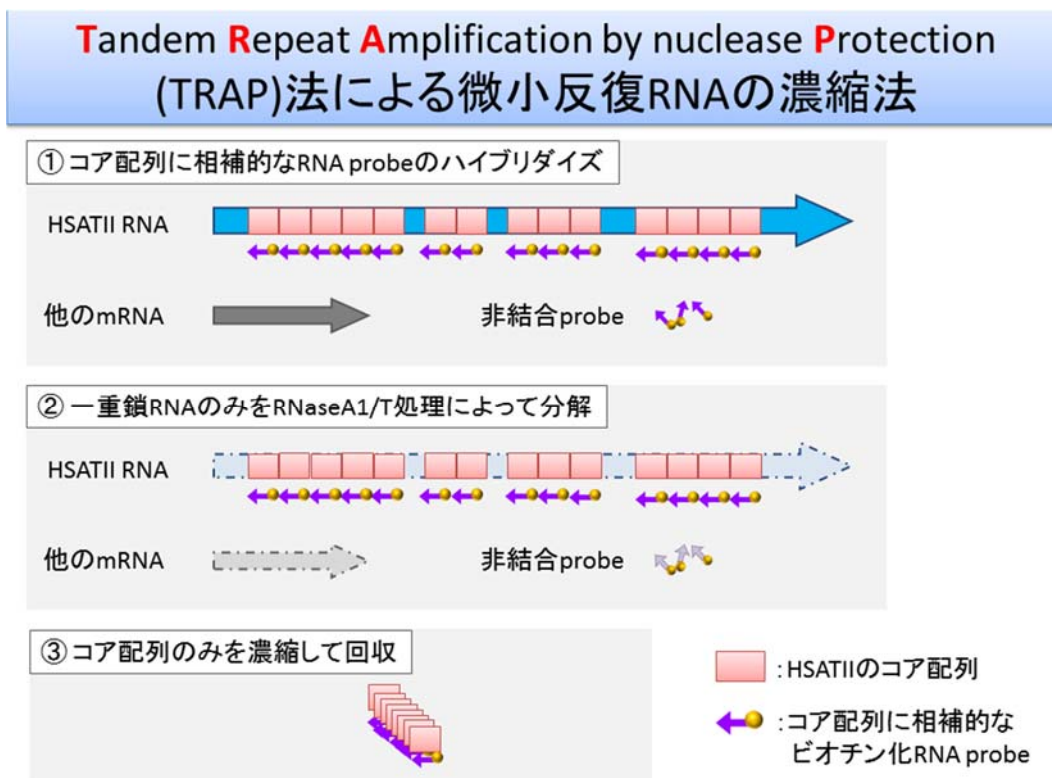


図 1. TRAP 法の原理

反復配列 RNA のコアとなる配列に相補的な probe をハイブリダイズさせた後に、二重鎖以外の RNA を分解し、コア配列のみを濃縮し回収する。

癌の診断マーカーとしての血中RNAの検出

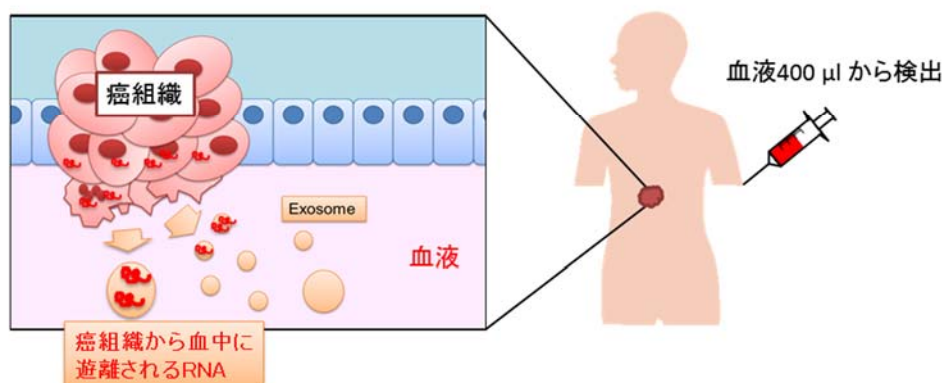


図 2. 癌の診断マーカーとしての血中 RNA の検出

癌が特異的に発現し血中に放出される RNA を高感度に捉えることで、診断に有用なマーカーとなる可能性がある。