


# 研究報告書

特定課題：難治がん  
(平成28年度)

平成30年6月12日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 防衛医科大学校 外科  
住 所 埼玉県所沢市並木3-2  
研究者氏名 山本順司 印 

(研究課題)

---

平成29年2月14日付助成金交付のあった標記特定課題：難治がんについて研究が  
終了致しましたのでご報告いたします。

## 1. テーマ 膵癌の早期診断と治療法の開発：包括的高感度遺伝子発現プロファイリング法による膵癌特異的分子の探索と循環膵癌細胞検知への応用

**背景：**膵癌死亡数は癌死全体の8.6%を占め、肺癌、胃癌、大腸癌に次ぐ第4位となっており、罹患数34802人（2012年統計）、死亡者数31866人（2015年統計）で死亡率91.6%であり、致死性固形がんの代表である。現状の臨床検査（血液腫瘍マーカー、画像検査）ではstage I膵癌（径2cm以内の腫瘍、リンパ節転移なし）の割合は1.8%（「膵臓」2017；1：16-22.）であり、しかもその切除後5年生存率は36-54%である。膵癌に対しては、この40年間でごくわずかな治療効果の改善が見られるのみで、米国では2030年には全癌死亡の2位を占める（現在は3位）と予測されている。膵癌に対する有効な低侵襲スクリーニング検査手段がないことに加え、なぜ転移が起こり易いのかといった分子的背景も未解決のままである。HiCEPは遺伝子発現プロファイル観察技術のうち、解析に既存の遺伝子情報を必要としない技術であり、世界中で用いられているマイクロアレイ法やリアルタイムPCR法とは異なり、未知遺伝子の探索を可能とする手法である。擬陽性シグナルの除去、ピーククロウニングの改良や解析の効率化により、従来技術では2倍～3倍の発現変動差のモニタリングが限界であったのに対し1.2倍までの発現差の検出が可能になった。

**研究方法：**膵癌患者の手術検体（癌部と肉眼的非癌部）、血液検体を収集した。血液検体は、担癌状態の有無での差を検討するために、術前、術後約1週間、術後1ヶ月以降に採取した。これら試料からtotal RNAを抽出しcDNAに転写を行い、HiCEP（ATGCの4塩基全ての組み合わせに相当する256対のプライマーを用いてcDNAを網羅的に増幅することにより高感度に漏れなくmRNAの発現量を鋭敏に測定する技術）を用いて、膵癌特異的分子を探索した。

**平成29年度の成果：**1検査あたり膨大な時間と労力を要するため（今年度特定課題「難治がん」研究費を使用して）この1年で4症例を追加解析した（前年度までに2検体解析済み）。計6症例について、切除標本の癌部、非癌部から抽出したRNAを対象に、非癌部に対して癌部で発現が共通して3倍以上増加している4ピークが検出された。うち2つは、チモーゲン酵素前駆体（Zymogen granule protein 16B）とPADI1（Peptidyl arginine deiminase, type I）であった（図1）。また、全6検体で共通して非癌部に対して癌部で発現が3倍以上減少しているものが7ピークあり、そのうち4ピークは同定されている（図2）。また、癌部で1.5倍以上発現量が増加しているピークについて変動率を計算し、6例中予後良好な2症例と不良であった2症例で、癌部での変動率が高くなる4ピークを検出し、そのうち2ピークを同定した。

図1 非癌部に対して癌部で発現が共通して3倍以上増加している4ピーク

| primer | peakid | comment                             |
|--------|--------|-------------------------------------|
| GG-ag  | 162    | Zymogen granule protein 16B         |
| TT-ct  | 174    |                                     |
| CC-cg  | 86     |                                     |
| GG-tc  | 169    | Peptidyl arginine deiminase, type I |

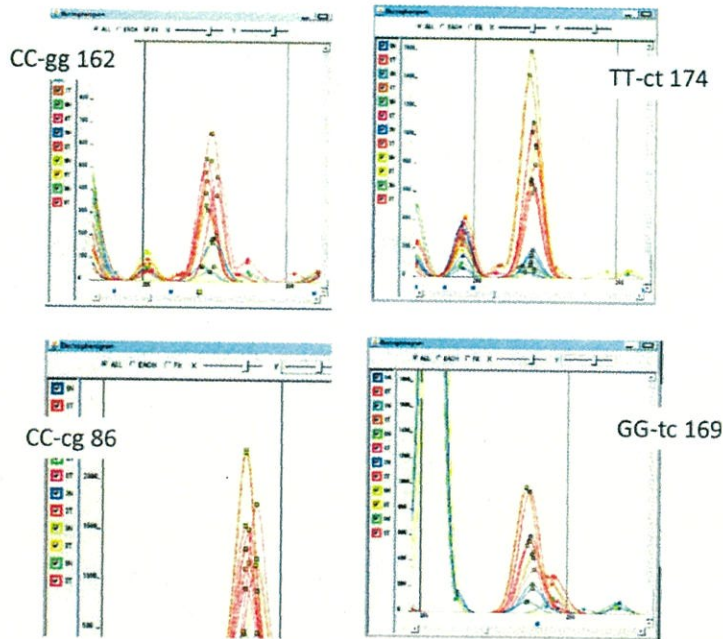
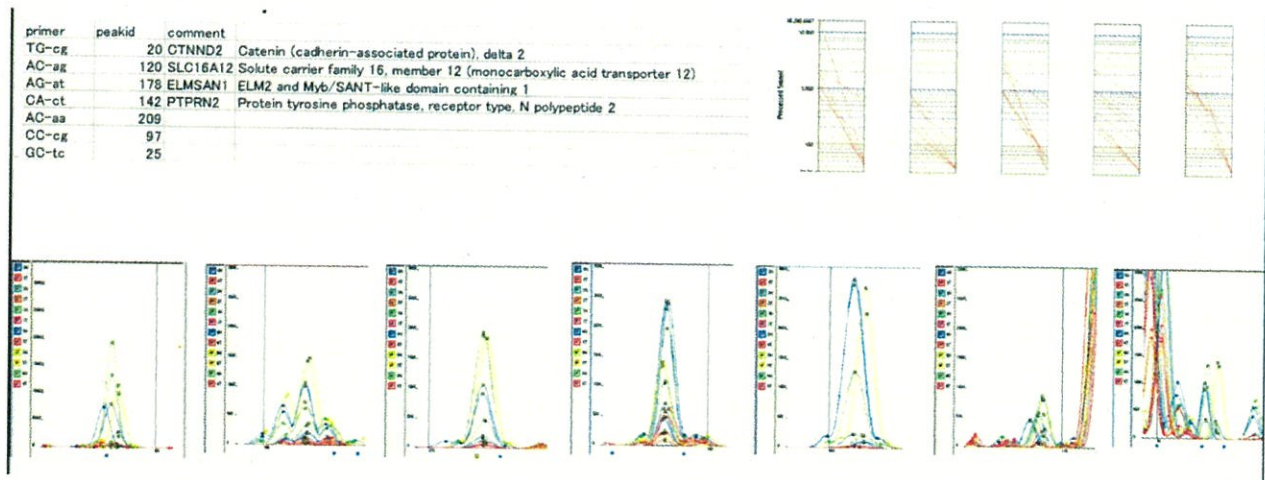


図2 非癌部に対して癌部で発現が3倍以上減少している7ピーク





#### 今後の研究予定：

- ・ 標本の HiCEP を施行し情報を得た症例で術前後に採取した末梢血循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cells: CTC) に対して HiCEP を行い、切除前後で変動する遺伝子の検索を行う。
- ・ HiCEP の解析結果を同じ臨床病期で切除後 2 年以上無再発の例と半年以内に再発 (死亡) した症例とで比較し、候補分子の中から悪性度 (転移、病期の進行) に関与するものを絞り込み、さらに血液検体から分離した CTC 中での発現を確認する。
- ・ CTC での上記候補分子の発現状況と臨床病期進行との関連性について検討する。また、他の臨床情報との比較も行う。
- ・ 膵癌症例の血液検体 CTC における候補分子発現を先に調べ、同じ分子が膵癌病巣においても発現するかどうか確認する。また、候補分子の生理学的、病態学的位置づけについて解析する。
- ・ HiCEP 探索各候補分子について、CTC の情報が膵癌の臨床病期と連関しているのか prospective study を開始する。