

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(がん関係研究分野)
(総合)研究報告書

血液検体のゲノム・エピゲノム・トランスクリプトーム解析に基づく、膵がん・肺がん等の高危険度群
の捕捉のためのバイオマーカーの同定

研究代表者 吉田 輝彦 国立がん研究センター 研究所 遺伝医学研究分野 分野長

研究要旨 難治がんの完治が期待できる治療法である外科切除には早期診断が必須である。本研究の目的は、バイオマーカー測定用検体として優れる末梢血に対して各種オミックス解析を行い、発がん高危険度群を適切に捕捉する上で有用な情報を探索、的確な指標を確立することである。それにより持続的な一次・二次予防行動を導き、生涯持続型個別化予防医療を目指す。本年度の主な成果は下記の通り：ゲノム解析では、CT 検診受診者 1,500 例の肺野擦りガラス様陰影 (GGO) の有無に関する関連解析を行い、肺腺がん感受性遺伝子の肺腺腫発生リスクへの影響を調べた。TERT・TP63・BPTF・BTNL2 のうち、TERT・TP63 の 2 座のみが、統計学的に有意な関連を示し、肺腺がんのみならず肺腺腫発生の危険因子の可能性がある。コホート内症例対照研究を含む膵がんの GWAS のメタ解析を行ったが、ゲノムワイド有意水準に達する座位は検出されなかった。エピゲノム解析では、JPHC コホート内に膵がんの症例 (142 人) 対照 (277 人) 研究を設定し、Infinium HumanMethylation450 BeadsChip で解析した。顕著な相関がゲノム全域に渡って観察されたため、交絡要因をさらに探索したところ、メチル化データに基づく白血球分画の推定値に明らかな差を認めた。トランスクリプトーム解析では、がん細胞株及び患者血漿を用いた解析から、膵がん・肺がん患者の血漿中で特異的に高値を示す miRNA を同定した。大腸がん・肺がん・膵臓がん・健常人・大腸腺腫の患者を exosome miRNA を用いて層別できることも示した。プロテオーム解析では、JPHC コホート内の膵がんの症例 (170 人) 対照 (340 人) 研究として血漿中の水酸化プロリン α -フィブリノーゲンタンパク質をサンドイッチ ELISA 測定キットを用いて測定した。中・高値群は低値群に比較し、発症 7 年未満の症例でオッズ比が有意に上昇しており、発症危険因子または発症前早期診断マーカーとなる可能性が示された。絶対定量プロテオミクス解析によりアディポネクチン・高感度 CRP・IGFBP3・IGFBP2・C2a・C2b と膵がんリスクとの関連を検討したが、有意な関連は認めなかった。標的絶対定量プロテオミクス (QTAP) において多検体の迅速解析を行うために、自動分注ロボットと microLC を用いて一日 1000 検体以上のスループットを実現した。膵がんでは有意に高値を示す 2 タンパク質のうち 1 つは病期 II の膵がん患者のみならず、難治性がんである胆道がん患者でも有意に上昇しており、早期診断マーカーとしての有用性が期待される。メタボローム解析では、膵臓がん患者血清・健常人血清・慢性膵炎患者血清において、液体クロマトグラフ質量分析計による脂溶性代謝物の網羅的解析を実施し、アラキドン酸・ラウロイルカルニチン等、2 群間で有意な変動を示す複数の代謝物を同定した。

研究分担者

河野 隆志 国立がん研究センター研究所
ゲノム生物学研究分野 分野長

土屋 直人 国立がん研究センター研究所
ゲノム生物学研究分野 ユニット長

軒原 浩 同中央病院 呼吸器内科 外来医長

渡辺 俊一 同中央病院 呼吸器外科
外来・病棟医長

上野 秀樹 同中央病院 肝胆膵内科
外来・病棟医長

片井 均 同中央病院 胃外科・胃外科長

森実 千種 同中央病院 肝胆膵内科 医員

岩崎 基 国立がん研究センターがん予防・
検診研究センター疫学研究部 部長

久保 充明 理化学研究所ゲノム医科学研究
センター 副センター長

伊藤 秀美 愛知がんセンター研究所
疫学予防部 室長

尾野 雅哉 国立がん研究センター研究所
創薬臨床研究分野 ユニット長

本田 一文 国立がん研究センター研究所
創薬臨床研究分野 ユニット長

浅村 尚生 国立がん研究センター中央病院
呼吸器外科 呼吸器外科長

小菅 智男	国立がん研究センター中央病院 副院長
寺崎 哲也	東北大学大学院薬学研究科 教授
大槻 純男	熊本大学大学院生命科学研究部 教授
立川 正憲	東北大学大学院薬学研究科 准教授
内田 康雄	東北大学大学院薬学研究科 助教
吉田 優	神戸大学大学院医学研究科 病因病態解析学分野 准教授
東 健	神戸大学大学院医学研究科 病因病態解析学分野 教授
南 博信	神戸大学大学院医学研究科 病因病態解析学分野 教授
宮川 治彦	株式会社島津製作所分析計測事業部 プロダクトマネージャー
小林 道元	東レ株式会社先端融合研究所 主任研究員
鄭 基晩	東レ株式会社先端融合研究所
宮本 顕友	株式会社トランスジェニック グループリーダー
品川 真吾	株式会社トランスジェニック サブリーダー
金田 隆	日本大学松戸歯学部 放射線学講座 教授
加藤 仁夫	日本大学松戸歯学部 インプラント学講座 准教授

A. 研究目的

難治がんには完治が期待できる治療法の外科切除には早期診断が必須であることから、末梢血検体に焦点を絞ったオミックス情報と生活習慣情報等との統合解析により精密検査が必要となる高危険度群捕捉指標を確立する。それにより継続的な一次・二次予防行動を導くための発がん高危険度群を捕捉し、生涯持続型個別化予防医療を目指す。具体的には、スクリーニングに適している末梢血検体に焦点を当てて、多層的オミックス解析により複合的な情報を引き出す。我が国を代表する全国型疫学コホート研究、大規模受診者・検診受検者コホートバイオバンクの協力を得るとともに、基礎及び臨床系研究者と疫学・公衆衛生研究者の協同により予防医学への着実な橋渡しを目指す。

本研究が対象とする難治がんとしては、膵が

ん・肺がん・スキルス胃がんを含む未分化型胃腺がん等を選択する。

分子情報と生活習慣情報等との統合的解析により高危険度群を捕捉し、画像診断等による精密検査を組み入れた検診プログラム等の有効な予防手段を、それを必要とする人々に生涯を通して継続的・重点的に届ける次世代型個別化がん予防医療技術を提案する。

B. 研究方法

末梢血の多層的オミックス解析を、A) リスク診断系と B) 存在診断系に大別し、A) をさらにゲノム(個人の固定発がんリスクとしての多型)、エピゲノム(ゲノムへの加齢・生活習慣等の影響を反映する指標としての末梢血 DNA のゲノム全体のメチル化レベル)に、B) を トランスクリプトーム(血中 exosome miRNA プロファイル)、プロテオームと メタボロームに分ける。各オミックス解析の 3 年間を通しての研究手法の概要は前年度から大きな変更は無く、以下の通り：

肺がん・胃がん・膵がんの先行 GWAS の多段階スクリーニングを進め、遺伝子型オッズ比 1.2 以上、P 値 10^{-5} 以下、リスクアレル頻度 0.2 以上の遺伝素因を各がん 3 個程度同定し、組合せオッズ比を計算する。バイオバンクジャパンや愛知県がんセンター受診者コホートの解析、女性非喫煙者肺がん・EGFR 変異肺腺がん等の層別化解析、CT 検診すりガラス陰影(GGO)を指標とした肺腺腫リスクに関する関連解析を行い、遺伝素因の検証を行う。

末梢血 DNA のゲノム全体のメチル化レベルを定量してがん罹患や生活習慣要因等との関連を解析、ゲノムストレス指標としての評価を行う。具体的にはがん罹患のない対照群について、アレイ技術を用いて末梢血 DNA のメチル化レベルを定量し、年齢や生活習慣因子等との関連を調べる。ついで適切な症例対照セットを用いて、がん罹患との関連を解析する

血漿・血清中 exosome に含まれる miRNA のプロファイリング並びに候補 miRNA の定量を行い、早期がん存在指標としての有用性等を評価する。具体的には膵がんと肺がん等の培養細胞株と臨床検体を用いて miRNA アレイ等により exosome miRNA をプロファイリングし、がん種特異的な miRNA セット(約 10 miRNA)の絞込みと multiplex qRT-PCR による検出特異性・感度の検証・最適化を行う。

多目的コホート研究等で大規模に蓄積してきた血漿試料に加え、新規に非がん患者等の血清・血漿バンクを構築し、定量質量分析及び

ロテオームバイオマーカー候補分子に対する特異的抗体作成・測定系構築等を行う。具体的に JPHC コホート内において、140 例の膵がん症例の発症前検体の解析を行う。採血・保存方法を標準化し、膵がん患者および対照として人間ドックや歯科を受診する健康者、慢性膵炎患者等の検体を収集し、プロテオーム解析を行う。

修飾アポリポ A2 及びフィブリノーゲンタンパク質に対して、特異的抗体の工業的作成やサンドイッチアッセイ構築を行い、測定系を確立し、体外薬診断薬として承認申請の準備を行う。

また、必ずしも特異抗体が得られないタンパク質に対する方法として、MRM (Multiple Reaction Monitoring) による絶対定量系を構築、血液検体の前処理方法及び分離条件を最適化し、バイオマーカーの 2 次スクリーニングを行う。

がん患者・非がん患者等の血清・血漿バンクを構築し、メタボローム測定系の検討を行う。具体的には血清からメタノール・クロロホルムを用いて水溶性代謝物を抽出し、各種質量分析計を用いた独自開発の血清中の水溶性・脂溶性代謝物の網羅的解析技術・統計解析手法を用いて、がん患者特異的な変動を明らかにする。

C . 研究結果

ゲノム解析では、予防検診研究センター検診例 1,500 例 (5mm 以上の GGO 保有例が 500 例、それ以外が 1000 例) について、日本人肺腺がんリスク感受性遺伝子座 4 座 (TERT・TP63・BPTF・BTNL2) と GGO 保有との関連解析を行った。その結果、TERT・TP63 の 2 座のみが、統計学的に有意な関連を示した。また、危険アレルは肺腺がんと一致していた。

未分化型胃がんについては、地域がん登録のデータを用いて累積リスクを推定した。PSCA 及び MUC1 のリスクアレルの数が 0-2、3、4 個のグループに分けたところ、それぞれ症例の 32、43、25% を占め、累積リスクが約 2、4、5.5% と、明らかに層別化されることがわかった。また、PSCA、MUC1 の 2 座位に加えて、BBJ との共同研究による GWAS で第 3 の座位を検証した。

膵がんについては、先行 GWAS の NCC 症例 665 人・同数の対照群のデータと、JPHC コホート内症例 (144 人)・対照 (299 人) 研究のデータのメタ解析を行った。染色体 1 番に関連する座位の集積が見られたが、ゲノムワイドの有意水準 (5×10^{-8}) に達する SNP は認められなかった。

エピゲノム解析では、JPHC 多目的コホート研究の中から、膵がんのコホート内症例対照研

究として症例 (142 人)・対照 (277 人) の末梢血全血のメチローム解析データを確保した。喫煙・年齢との強い相関を見出したほか、それらの要因でも調整しきれない有意差を症例・対照間で見出した。しかし相関はゲノム全域に渡ったため、交絡要因のさらなる探索にむけて各種生活習慣・環境要因等とメチル化指標との関連解析を進めた。多くのコホート研究の試料と同様、全血の buffy coat から抽出した DNA を用いたメチローム解析の場合、最も大きな交絡要因候補は白血球分画比の違いである。そこで、Houseman (BMC Bioinformatics, 13:86, 2012) の原理を用いて、日本人健康成人 4 名の血液から顆粒球・単球・T 細胞・B 細胞を分画し、それぞれから DNA を抽出して HM450 BeadChip にてメチロームプロファイルを取得、そのデータに基づいて膵がんの症例と対照の間の成分比の差の検定を行ったところ、顆粒球と T 細胞の P 値がそれぞれ 0.0068、0.0098 となった。

乳がんの症例対照研究の対照群の末梢血白血球 DNA のゲノム全体のメチル化レベルを LUMA 法により測定したところ、平均値は 70.1% で、範囲は 59.0% から 81.2% であった。血清有機塩素系化合物濃度との関連を解析し、o,p'-DDT、p,p'-DDT、p,p'-DDE、trans-ノナクロール、オキシクロルデン、ヘキサクロロベンゼン、 γ -ヘキサクロロシクロヘキサンの血清中濃度とメチル化レベルの間に有意な負の関連が観察された。PCBs の異性体別の解析では PCB17・PCB52/69・PCB74・PCB114・PCB183 の血清中濃度とメチル化レベルの間に有意な負の関連が観察されたが、それ以外の異性体では有意な関連は見られなかった。

トランスクリプトーム解析においては、予定通りに膵がん・肺がんの特異的な exosome miRNA の単離の可能性を、がん細胞株及び患者血漿を用いて解析と合わせて、統合的にがん診断バイオマーカーとしての exosome miRNA の有用性を評価した。がん細胞を用いた結果から、膵がん及び肺がん細胞株に共通して積極的に exosome を介して、細胞外へと分泌される miRNA が存在することを見出した。これらは、大腸がん細胞株ならびに大腸がん患者血清中の exosome から検出されるが、健康人の血清からは検出されないものであった。

一方、膵がん・肺がん患者血漿と大腸がん・大腸腺腫の患者血漿ならびに健康人血漿から exosome 画分を調製し、マイクロアレイにより、miRNA のプロファイルを行った結果、健康人と大腸腺腫の患者は層別することはできなかったが、大腸がん・膵臓がん・肺がん患者を層別することが可能であった。それらを詳細に解析す

ると、肺がん患者の血漿中で特異的に検出される miRNA や膵臓がん患者でのみ検出されるもの、さらには、消化器がんでは共通で検出されるもの等が存在することが明らかになった。

プロテオーム解析では、ApoAII-2 の C 末端に特異的に反応する特異抗体を作製し、apoAII-2 を定量的に測定するサンドイッチ ELISA 検査系を構築した。ELISA の結果と、質量分析を用いて測定した結果の相関係数は 0.82 を超え、同等な結果であった。また、500 例を超える早期膵がんを含む消化器がん・消化器良性疾病・健常者の血漿における apoAII-2 濃度を、ELISA キットで再測定した。ApoAII-2 ELISA キットの血漿内濃度は、判別性能は ROC 解析における AUC 値で 0.9 を上回った。ApoAII-2 の血漿内発現は、CA19-9 とは相補的になり、CA19-9 と apoAII-2 の組み合わせは、膵がん患者を捕捉するバイオマーカーとして有用であった。

JPHC コホート内に設定した膵がんの症例対照研究において、膵がん発症までの時間で区分し、水酸化プロリン - フィブリノーゲン濃度の低値群 (0.23-76.0 μ g/ml)、中等度群 (76.1 - 151 μ g/ml)、高値群 (152 - 2178 μ g/ml) に分類して、低値群に対するオッズ比 (OR) を条件付きロジスティック回帰分析で解析した。中等度群・高値群では発症 7 年未満・5 年未満のいずれの症例群でも調整後 OR は有意に上昇した。一方、同症例対照集団において、絶対定量プロテオミクス解析により分析したアディポネクチン、高感度 CRP、IGFBP3、IGFBP-2、C2a、C2b の 6 つの血中濃度と膵がんリスクとの関連を検討した。その結果、全観察期間を対象にした解析において、いずれのバイオマーカーも膵がんリスクとは有意な関連は観察されなかった。

標的絶対定量プロテオミクスの手法を用いて多数検体の迅速定量解析を行うために、血液の前処理を自動分注ロボットを用いて高精度に 1 日 192 検体処理できるように最適化し、通常は 1~2 時間を要する解析を UPLC/microLC を用いて 10min 以内にできるように最適化することで、1000 例以上の検体のハイスループット定量解析を実現した。昨年度までに同定した膵がん有意に高値を示すタンパク質のうちの 1 つが病期 II の早期から有意に上昇しており、早期診断マーカーとしての有用性が示された。このマーカーは難治性がんである胆道がん患者でも有意に上昇しており、胆道がんマーカーとしても有用である可能性が示された。

メタボローム解析では、昨年度構築した液体クロマトグラフ質量分析計による脂溶性代謝物 (脂質代謝物) 網羅的解析システムを用いて、

膵がん患者の血清中脂溶性代謝物を分析した。はじめに 209 種類の代謝物について、ヒト血清分析において安定に検出できることを確認した。次に、これらの血清中脂溶性代謝物について、膵がん患者 35 名・健常者 35 名の血清を分析し、膵がんのバイオマーカーを探索した。患者と健常者の血清中代謝物レベルの変動について有意差検定を行い、その結果、膵がん患者では、健常者と比較して、アラキドン酸・ラウロイルカルニチン・99 種類のリン脂質の減少、ならびに、オクタデセノイルカルニチンの増加を確認した。

D . 考察

肺腺がんについては、本研究を含めて同定された 4 つの肺腺がん感受性遺伝子のうち、TERT・TP63 座の 2 座は GGO 保有リスクと関連を示したことから肺腺腫発生の危険因子となる可能性がある。今後は、個別化予防の実現へ向け、GGO から肺腺がんに移行した検診例でのアレル保有状態や、生活習慣要因との関わりを明らかにすることで、肺がん早期での高危険度群の捕捉について研究を進展させたい。

一方、未分化型胃腺がんの高危険度群捕捉のための固定リスクマーカーとして、PSCA 遺伝子多型は多くの研究グループによる追試がなされるなど、高い信頼性があると考えられるが、さらに積極的な予防の分子標的探索のためには、発がん過程における機能の解明が必須である。これは難易度の高い課題となっているが、胃粘膜以外の細胞におけるがん抑制遺伝子的機能を見出しており、その観点からの研究をさらに粘り強く継続する。

膵がんについては、未分化型胃がんの PSCA や MUC1 のレベルのリスク比とアレル頻度を持つ common SNP は存在しない可能性があり、より大規模な GWAS やそのプール解析、あるいはより低頻度でリスク比の大きな遺伝素因の探索に進む必要があると考えられた。特に後者については、若年性・家族性発症例の解析を行うなど、戦略の修正も検討すべきであろう。

膵がんのコホート内症例対照研究において Infinium HumanMethylation450 BeadsChip (HM450) により取得されたメチロームデータと膵がん発症との顕著な相関がゲノム全域に渡って観察された。そこで交絡要因をさらに探索したところ、メチル化データに基づく白血球分画の推定値に明らかな差を認めた。理想的には、特定の分化段階にある白血球を均一な集団として分離し、そのメチローム情報を取得・解析する必要があるが、少なくとも現時点においては特定の白血球分画分取は現実的でないと考えら

れる。そこで、データ解析において、臨床検査としての分画比のデータ（但し、T細胞・B細胞の割合も必要）を用いた調整などの方法が想定される。そのためには十分なサイズの、日本人の白血球分画別メチローム情報のリファレンスデータベースの構築が必要である。また、正常白血球のメチル化レベルの変動幅は一般に小さく、解析には高い精度の定量性が求められる。現在のアレイ技術によるメチローム解析では、様々な実験バイアスが結論を攪乱し得る。採血の時点からの各工程の標準化や同時解析、症例・対照でランダム配置された測定手順、できるだけ同時に行う測定などの基本操作により、測定バイアスの抑制に十分配慮する必要がある。

断面研究による、LUMA法で測定した末梢白血球のゲノム全体のメチル化レベルを規定する各種要因探索においては、血清有機塩素系化合物濃度との関連について、国際がん研究機関の発がん性評価により「発がん性あり」と評価されているPCBやDDTを含めて解析を行った。o,p'-DDT、p,p'-DDT、p,p'-DDE、trans-ノナクロール、オキシクロルデン、ヘキサクロロベンゼン、 α -ヘキサクロロシクロヘキサン、PCB17、PCB52/69、PCB74、PCB114、PCB183の血清中濃度とメチル化レベルの間には有意な負の関連が見られた。この結果は、これらの化学物質が発がんリスクに関連するメカニズムの一つとして、メチル化レベルの変化を介するものがあることを示唆している。これまでに3件の先行研究があるが、グリーンランドのイヌイットを対象にした研究（*Environ Health Perspect* 2008;116:1547-52）および韓国人を対象とした研究（*Environ Health Perspect* 2010;118:370-4）の2件において、本研究と同様に有機塩素系化合物濃度とAlu配列のメチル化レベルとの間に有意な負の関連が報告されている。一方、スウェーデン人を対象にした研究（*Environ Int* 2013;59:456-61）では、本研究と同じLUMA法によりメチル化レベルを定量し、有機塩素系化合物濃度との関連を検討しているが、基本的には有意な関連は観察されず、逆にp,p'-DDEは正の関連が見られた。研究間の結果を比較するうえで考慮すべき要因としては、メチル化レベルの定量方法の違い、有機塩素系化合物の曝露レベルが異なること（他の集団に比べグリーンランドのイヌイットが高い）、本研究は女性のみを対象としていること、などがあり、これらは結果の違いに影響していると考えられる。

本研究の結果から、血漿中 exosome miRNA 診断マーカーとしての有用性が示された。本研究で用いた臨床検体である膵がんや肺がんの患者血漿は早期の症例を含んでいないが、これま

での研究分担者らによる大腸がん患者血清を用いた解析から、病期 I および II でも、効率よく検出される診断マーカー候補を得ている。症例数は少ないが、大腸がんの病期 0 の症例における血漿 exosome miRNA プロファイルは、大腸腺腫のそれとは異なっていた。一方、大腸腺腫と健常人の血漿に関しては区別することができなかった。これらの結果からも、exosome miRNA が、膵がん状態を反映するバイオマーカーとして、早期診断マーカーとしても有用性が高いことが示唆される。Exosome miRNA は、がんの病態とも深く連携していることが示されており、がん種に依存しない、膵がん状態を広く検出可能なマーカーと、特定がん種を検出するバイオマーカーの両者が確立できる可能性を示し、がん検診などのスクリーニングから、診断までを対象としたバイオマーカーとして有用であると期待される。

膵がん血漿バイオマーカー候補として、apolipoprotein AII C 末端に対する優れた ELISA キットを開発し、先行研究で基本理論を構築した質量分析検査系から、臨床検査に特化した ELISA 検査系への移行が完了した。質量分析検査系では、血漿内濃度を定量的に測定することは困難であったが、apoAII-2 ELISA 検査の開発により、絶対定量系での測定が可能になった。質量分析に比較して、コスト面での削減と測定時間の短縮が期待できる。さらに、500 例を超える早期膵がんを含む消化器がん・消化器良性疾患・健常人の血漿における apoAII-2 濃度を ELISA キットで再測定したところ、膵がん患者で顕著な減少が認められ、膵がんと健常人における判別性能は ROC 解析における AUC 値で、0.9 を上回った。この AUC 値は、既存の膵がんの血漿バイオマーカーである CA19-9 の AUC 値と比較しても遜色のない結果であった。ApoAII-2 の血漿内発現は、CA19-9 とは相補的になり、CA19-9 と apoAII-2 の組み合わせは、CA19-9 に反応しない膵がん患者を捕捉するバイオマーカーとしても有用であった。

同様に、もう一つの膵がんの診断マーカー候補である水酸化プロリン α -フィブリノーゲンタンパク質濃度を測定するサンドイッチ ELISA キットを開発し、JPHC コホート内症例対照研究で検証した。測定値が中等度群・高値群では発症 7 年未満・5 年未満のいずれの症例群でも調整後 OR は有意な上昇を示したことから、膵がんの発症危険因子となりうる可能性が示唆された。前向き試験を含め、さらなる症例での検証が必要であると考えられる。一方、同症例対照集団において、絶対定量プロテオミクス解析により 6 タンパク質を定量した。このうち IGFBP-2・

C2a・C2b は、膵がんの早期診断マーカーの候補タンパク質であり、IGFBP3・アディポネクチン・高感度 CRP は先行する疫学研究より、膵がんリスクとの関連が想定されるバイオマーカーである。しかし今回の検討においては、いずれも膵がんリスクとの関連は認めなかった。慢性炎症状態は膵がんリスク上昇と関連することが想定されることから、高感度 CRP に着目し解析を行ったが、統計学的に有意なリスク上昇は観察されなかった。この結果は、高感度 CRP 値の上昇は、膵がんリスクよりも膵がんの存在を反映した結果と考えられる。但し、本研究の方法論上の課題としては、サンプルサイズの問題があげられる。本研究では 170 症例が解析対象となっているが、対象集団における膵がんの罹患率、コホートの大きさ、観察期間等を考慮すると決して少ない数ではない。しかし、膵がんのリスク要因および早期診断マーカーの同定を目的に、観察期間別の検討を行うには十分なサンプルサイズではない。この点は、本研究の結果を解釈する上で重要な点である。

技術開発においては、標的絶対定量プロテオミクス (QTAP) 技術に対し、新たに自動分注ロボットとマイクロ LC を導入することによって、高精度かつハイスループットなタンパク質定量法を確立した。従来から、バイオマーカータンパク質の定量的な検証に用いられてきた ELISA 法はスループット性が高いとの利点がある一方で、一度の測定で 1 分子のみしか定量ができないとの欠点も存在していた。そこで、本研究では QTAP 技術の欠点であったスループット性の低さを解決し、複数のマーカーの同時定量を実現することで、ELISA 法の欠点も同時に克服した。すなわち、本研究成果は、QTAP 技術を用いた次世代の臨床診断への基盤を築いたといえる。

本研究で同定されたバイオマーカー候補タンパク質に対しては、膵がんの早期診断に応用可能と考えられ、ハイスループット定量技術を用いた実用化が強く望まれる。さらに、複数のマーカータンパク質を同時に組み合わせることで、より高い精度で膵がんを早期に識別診断することにつながると期待される。

メタボローム解析では、血清メタボロミクスを用いた診断的手法が膵がん患者をより正確に発見できる可能性を持つ有用な方法であることを示唆した。さらに脂溶性代謝物 (脂質代謝物) においても、膵がんマーカー候補を見出すことができた。しかし、問題点として、膵がんの場合、特に早期の段階での発見が重要であるものの、早期膵がん患者血清の収集は、困難を極め、収集検体数が他の病期と比較して少なかったことが挙げられる。そのため、今後も、早期膵がん

患者血清の収集を継続的に行い、より確実かつ詳細な検証が必要だと考えられる。多施設共同研究によって採取条件を統一した大規模な前向き検体収集を行い、他の膵疾患や他臓器がんとの比較も含めて厳格な検証を行うことが求められる。検証された代謝物バイオマーカーに対しては、その分析システムの自動化 (オートメーション化) なども検討し、実用化に向けた研究・開発への進展が期待される。

上記 ~ の各種オミックスバイオマーカー情報と、コホート研究による生活習慣因子等との交互作用の解析結果等を勘案することで、高危険度群を定量的に捕捉するオミックス及び生活習慣情報の複合的な指標が開発可能となる。網羅的解析から抽出される複合診断指標は前向き研究による検証と、指標の生物学的意義の解明・説明が重要である。本研究の研究者らが進めている分子疫学的住民コホートや患者バイオバンクキング、あるいは内外の利用可能なバイオリソースをさらなる検証セットとして今後も本研究成果の改訂を重ねて行きたいと考える。

E. 結論

末梢血検体を用いて、各種オミックス解析を行い、早期診断に基づく適切な早期治療の実現に資するリスク層別化と、がん存在診断のためのスクリーニングに有用なバイオマーカーの開発を行った。各オミックス毎の結論は下記の通り：

ゲノム解析では、肺腺がん感受性を規定すると考えられる 4 遺伝子座を同定した。そのうちの 2 座、TERT 座・TP63 座は、肺腺がんのみならず肺腺腫発生危険因子となる可能性がある。未分化型胃がんについて、PSCA・MUC1 座を含む、GWAS で同定された複数の遺伝素因の組合せにより、累積リスクを少なくとも 3 群に層別化できることを示した。膵がんについてはゲノムワイド水準で有意になる遺伝素因の同定に至らず、より大規模な GWAS やそのメタ解析、より低頻度・高リスク比の多型・変異の探索などが必要である。

エピゲノム解析では、JPHC コホート内に設定した膵がん症例対照研究において、末梢血白血球のゲノム全体のメチロームプロファイルとの顕著な相関を認めたと、白血球分画比の変動などの交絡の影響が示唆された。長野県内 4 病院で実施した乳がんの症例対照研究の対照群の女性約 400 人の DNA 試料を用いて、LUMA 法によりゲノム全体のメチル化レベルを定量し、有機塩素系化合物の濃度との関連を検討したと

ころ、有機塩素系化合物濃度が低い群において、高メチル化レベルとの関連が観察された。

トランスクリプトーム解析では、担がん状態を早期に診断する新規のバイオマーカーとして exosome miRAN を複数同定した。これらは、肺がんの特異的、あるいは膵臓がんの特異的なものが存在することから、難治固形がんを診断方法の確立に極めて有用な情報・シーズを提供することができた。

プロテオーム解析では、膵がんの新規マーカー-ApoAIIIC 末端のサンドイッチ ELISA を開発し、優れた感度・特異度を示すことを確認した。質量分析に頼らない、臨床検査に適した測定系が構築できた。

JPHC コホート内に設定した膵がんの症例対照研究において、独自に開発したサンドイッチ ELISA 測定キットを用いて、水酸化プロリン α -フィブリノーゲンタンパク質濃度測定を行ったところ、中・高値群は低値群に比較し、発症7年未満の症例でオッズ比が有意に上昇しており、発症危険因子または発症前早期診断マーカーとなりうる可能性が示された。検証のためには、前向き試験を含め、さらなる症例での検証が必要である。また、絶対定量プロテオミクス解析によりアディポネクチン・高感度 CRP・IGFBP3・IGFBP-2・C2a・C2b を分析し、膵がんリスクとの関連を検討したが、いずれのバイオマーカーも有意な関連は示さなかった。

血液試料のプロテオミクス解析の技術開発では、QTAP 技術に、自動化及びスループット化を導入し、新たな多検体血漿バイオマーカー一斉定量技術を確立した。膵がん病期 II から上昇しているタンパク質を見出し、早期診断マーカーとしての有用性が示された。

メタボローム解析では、液体クロマトグラフ質量分析計を用いた脂溶性代謝物（脂質代謝物）網羅的解析システムを構築し、膵がん患者に特異的な血清代謝物の変動を明らかにした。これらの結果から、血清メタボロミクスを用いた診断的手法は、膵がん患者をより正確かつ早期に発見できる可能性を持つ有用な方法であることを示した。今後、さらに検証および詳細な検討を重ねる必要があるが、早期膵がんの血液試料の収集が研究の隘路となっており、試料収集に関する組織的な取り組みが必須である。

F . 健康危険情報

特記すべき事項無し。

G . 研究発表

1 . 論文発表

1. Saeki N, Yoshida T. et.al. Genetic factors related to gastric cancer susceptibility identified using a genome-wide association study. *Cancer Sci.*, 104:1-8, 2013
2. Fujita T, Yoshida T. et.al. Intraperitoneal delivery of a small interfering RNA targeting NEDD1 prolongs the survival of scirrhous gastric cancer model mice. *Cancer Sci.*, 104(2):214-222, 2013
3. Takahashi H, Yoshida T. et.al. Identification of a candidate single-nucleotide polymorphism related to chemotherapeutic response through a combination of knowledge-based algorithm and hypothesis-free genomic data. *J Biosci Bioeng.* 2013
4. Takahashi H, Yoshida T. et.al. Hasegawa T. Macrophage migration inhibitory factor and stearyl-CoA desaturase 1: Potential prognostic markers for soft tissue sarcomas based on bioinformatics analyses. *PLoS ONE*, 8(10), e78250, 2013
5. Udagawa T, Yoshida T. et.al. Vascular endothelial growth factor-D-mediated blockade of regulatory T cells within tumors is induced by hematopoietic stem cell transplantation. *J Immunol*, 191(6):3440-3452, 2013
6. Oike T, Watanabe SI, Kohno T. et. al. A synthetic lethality-based strategy to treat cancers harboring a genetic deficiency in the chromatin remodeling factor BRG1. *Cancer Res.*, 73(17):5508-5518, 2013
7. Kohno T. et. al. RET fusion gene: translation to personalized lung cancer therapy. *Cancer Sci.*, 104 (11): 1396-1400, 2013
8. Suzuki T, Kohno T. et.al. Regulatory nexus of synthesis and degradation deciphers cellular Nrf2 expression levels. *Mol Cell Biol.* 33(12):2402-2412, 2013
9. Mizukami T, Kohno T. et. al. Molecular mechanisms underlying oncogenic RET fusion in lung adenocarcinoma. *J Thoracic Oncol.*, 9(5):622-630, 2014.

10. Ogata-Kawata H, Tsuchiya N.et. al. Circulating exosomal miRNAs as biomarkers of colon cancer, *Plos One*, 9(4):e92921, 2014
11. Zheng W, Iwasaki M.et. al. Common genetic determinants of breast-cancer risk in East Asian women: a collaborative study of 23 637 breast cancer cases and 25 579 controls. *Hum Mol Genet.*,22:2539-2550,2013
12. Shi J, Iwasaki M. et. al. New breast cancer risk variant discovered at 10q25 in East Asian women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 22:1297-1303,2013
13. Pandey JP, Iwasaki M. et. al IGKC and FcgammaR genotypes and humoral immunity to HER2 in breast cancer. *Immunobiology*, 219:113-117, 2014
14. Kuchiba A, Iwasaki M, Yoshida T. et. al .Global methylation levels in peripheral blood leukocyte DNA by LUMA and breast cancer: a case-control study in Japanese women. *Br J Cancer*. (in press)
15. Ito H. et .al. Time to first cigarette and lung cancer risk in Japan . *Ann Oncol.*, 24(11):2870-2875,2013
16. Matsuo K,Ito H.et. al. The aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) Glu504Lys polymorphism interacts with alcohol drinking in the risk of stomach cancer. *Carcinogenesis*,34(7):1510-1515,2013
17. Pelucchi C,Ito H .et. al. The stomach cancer pooling (StoP) project: study design and presentation. *Eur J Cancer Prev.*,2014
18. Honda, K, Ono M. et. al. Proteomic Approaches to the Discovery of Cancer Biomarkers for Early Detection and Personalized Medicine. *Jpn J Clin Onco.*, 43, 103-109, 2013
19. Nakano T. Ono M. et. al. ADP-ribosylation of guanosine by SCO5461 protein secreted from *Streptomyces coelicolor*. *Toxicon*,63, 55-63, 2013
20. Makuuchi Y, Honda K,Ono M. et. al. Soluble interleukin-6 receptor is a serum biomarker for the response of esophageal carcinoma to neoadjuvant chemoradiotherapy. *Cancer Sci.*, 104,1045-1051,2013
21. Singh S, Ono M. et. al. GANP regulates recruitment of AID to immunoglobulin variable regions by modulating transcription and nucleosome occupancy. *Nat Commun*, 4, 1830, 2013
22. Takahashi, R, Ono M. et. al. Ribophorin II regulates breast tumor initiation and metastasis through the functional suppression of GSK3beta. *Scientific reports*,3,2474.2013
23. Yoneyama. T, Ono M Tachikawa, M. et. al. Quantitative targeted absolute proteomics-based large-scale quantification of proline-hydroxylated alpha-fibrinogen in plasma for pancreatic cancer diagnosis. *J Proteome Res.*, 12, 753-762,2013
24. Masuda, M, Ono M. et. al. Alternative mTOR signal activation in sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma cells revealed by array-based pathway profiling. 2014Epub ahead of print
25. Kobayashi E, Ono M.et .al. MicroRNA expression and functional profiles of osteosarcoma. *Oncology*,86, 94-103,2014
26. Matsukawa S, Ono M.et. al. Galectin-7 as a potential predictive marker of chemo- and/or radio-therapy resistance in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Med.*,3,349-361, 2014
27. Taira N, Ono M. et. al. Induction of amphiregulin by p53 promotes apoptosis via control of microRNA biogenesis in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111,717-722, 2014
28. Miyanaga A, Honda K. et. al. Diagnostic and prognostic significance of the alternatively spliced ACTN4 variant in high-grade neuroendocrine pulmonary tumours. *Ann Oncol.*, 24(1):84-90,2013
29. Noro R, Honda K. et. al. Distinct outcome of stage I lung adenocarcinoma with ACTN4 cell motility gene amplification. *Ann Oncol.*, 24(10):2,594-600, 2013
30. Watabe Y, Honda K. et. al. Copy number increase of ACTN4 is a prognostic indicator in salivary gland carcinoma. *Cancer Med.*, doi: 10.1002/cam4.214,2014
31. Asamura H. et. al. Radiographically determined noninvasive adenocarcinoma of the lung: Survival outcomes of Japan

Clinical Oncology Group 0201. J Thorac Cardiovasc Surg, 146(1):24-30, 2013

32. Kobayashi T, Yoshida M, et. al. A novel serum metabolomics-based diagnostic approach to pancreatic cancer. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 22(4):571-579, 2013

2. 学会発表

1. 吉田輝彦. 第3次対がん10か年総合戦略を振り返って：今後の課題. 東海大学大学院医学研究科主催 研究者教養セミナー第2回. 東海大学伊勢原校舎1号館. 6/11/2013.
2. 吉田輝彦. 次世代シーケンサーを用いたがんの生殖細胞系列ヒトゲノム・遺伝子解析の経験：その様々な側面. 第19回日本家族性腫瘍学会学術集会. ランチョンセミナー1. 別府国際コンベンションセンター ビーコンプラザ. 7/27/2013
3. 青柳一彦、三梨桂子、小島隆嗣、矢野友規、西村公男、玉置将司、小松崎理絵、大津敦、吉田輝彦、山田康秀、武藤学、佐々木博己. 食道がん治療前生検の遺伝子発現プロファイルを用いた教師無しサブタイプ分類による化学放射線療法感受性予測. 第72回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜 (口演 J-1046) 10/3/2013.
4. 白石航也、坂本裕美、久保充明、醍醐弥太郎、松尾恵太郎、吉田輝彦、中村祐輔、横田淳、河野隆志. 肺腺がん感受性を規定する遺伝要因の解明. 第72回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜(シンポジウムS4-2) 10/3/2013.
5. 牛尼美年子、中島健、関根茂樹、奥山美鈴、三戸沙耶香、坂本裕美、菅野康吉、吉田輝彦. 遺伝相談外来の日常診療におけるマイクロサテライト不安定性検査の評価. 第72回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜 (示説P-1144) 10/3/2013.
6. 新井恵史、坂本裕美、尾野雅哉、高橋順子、宮田彩香、藤元博行、渋谷亜矢子、後藤政広、山田哲司、吉田輝彦、金井弥栄. CpG アイランドメチル化形質腎細胞がんの多層的オミックス解析. 第72回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜 (口演 J-2096) 10/4/2013.
7. 黒坂功、加藤譲、中村浩実、市川仁、水上達治、鈴木穰、坂本裕美、松本慎吾、吉田輝彦、中釜斉、土原一哉、河野隆志、柴田龍弘. クリニカルシーケンスのためのコンピュータシステム. 第72回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜 (示説P-2071) 10/4/2013.
8. 三谷幸代、坂本裕美、柴徳生、林泰秀、吉田輝彦、市川仁. RNA シークエンシングによる小児 AML の融合遺伝子探索. 第72回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜 (示説P-2077) 10/4/2013.
9. 千脇史子、鈴木雅美、澤田祐美、濱口哲弥、山田康秀、島田安博、柳原五吉、坂本裕美、松崎圭祐、上園保仁、吉田輝彦、佐々木博己. マウス腹膜中皮細胞とヒト未分化型胃がん細胞の異種間細胞相互作用系の評価. 第72回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜 (示説P-2161) 10/4/2013.
10. 鳴海兼太、宮川玲奈、上田亮介、橋本尚佳、吉田輝彦、青木一教. 自家造血幹細胞移植後のS100A8 / A9による抗腫瘍免疫の誘導. 第72回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜 (示説P-2187) 10/4/2013.
11. 小野弘恵、坂本裕美、吉田輝彦、佐伯宣久. 膵管がんで発現が誘導されるPSCA 遺伝子は正常膵臓のランゲルハンス島で発現している. 第72回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜 (示説P-2282) 10/4/2013.
12. 山本由姫、三浦和樹、後藤尚子、鳴海兼太、大浪俊平、吉田輝彦、田川雅敏、青木一教. 腫瘍標的リガンドによる腫瘍溶解ウイルスの効果の増強. 第72回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜 (English Oral Sessions E-3037) 10/5/2013.
13. 青木一教、相田紘一郎、鳴海兼太、宮川玲奈、後藤尚子、橋本尚佳、上田亮介、五十嵐美德、大浪俊平、吉田輝彦. GITR 抗体とIFN-alpha遺伝子導入による腫瘍内制御性T細胞の減少が、膵がんに対する強力な腫瘍免疫を誘導する. 第72回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜 (English Oral Sessions E-3039) 10/5/2013.
14. 小松崎理絵、千脇史子、渡辺寛、外村修一、西村公男、玉置将司、青柳一彦、日月裕司、吉田輝彦、佐々木博己. 胸管リンパ液からの食道がん細胞株の樹立. 第72回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜 (示説P-3257) 10/5/2013.
15. 玉置将司、西村公男、三梨桂子、小松崎理絵、千脇史子、吉田輝彦、坂井義治、武藤学、青柳一彦、佐々木博己. SIX1は治療抵抗性食道癌症例においてTGFB シグナル経

路を介したがん幹細胞の自己複製を促進している。第72回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜(示説P-3267)10/5/2013。

16. 小川俊夫、祖父江友孝、喜多村祐里、今村知明、山本精一郎、吉田輝彦、堀田知光。国際分類Common Scientific Outline (CSO)を用いたがん研究費の分析:第3次対がん総合戦略研究事業の例。第72回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜(示説P-3479)10/5/2013。
17. Sakamoto H. Saeki N. Itoh H. Matsuo K. Yamada H. Sugimura H. Ichikawa H. Sasaki H. Yoshida T. Towards the genetics and genomics of diffuse gastric cancer. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference. The Latest Advances in Gastric Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics. Maihama, Chiba. December 16-18, 2013.
18. 吉田輝彦。バイオバンク連携に関する論点について～ナショナルセンターバイオバンクネットワーク(NCBN)の例を中心に。京大病院がんセンターバイオバンクシンポジウム。京都大学医学部附属病院第一臨床講堂。2/3/2014。
19. 道川武紘、井上真奈美、澤田典絵、岩崎 基、田中靖人、島津太一、山地太樹、笹月静、溝上雅史、津金昌一郎。肝炎ウイルス感染と生活習慣による肝がん発生の予測:多目的コホート研究。第23回日本疫学会学術総会、大阪府吹田市、2013年
20. 岩崎 基、津金昌一郎。移民研究から推定されるがん予防効果。第72回日本癌学会学術総会、神奈川県横浜市、2013年
21. Ono M, Kamita M, Yamada T. A new diagnostic biomarker for prostate cancer patients revealed by 2DICAL、9th AACR-JCA Joint Conferences. ポスター、2013年2月, Maui, USA
22. Ono M. Kamita M, Yamada T. Comparative phosphoproteomic analysis of 106 human liver tissues by 2-dimensional image-converted analysis of liquid chromatography and mass spectrometry (2DICAL)、61th Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics. ポスター、2013年6月, Minneapolis, USA
23. Ono M. Kamita M. Yamada T. et al. Phosphoproteomics of human liver cancer analyzed by 2DICAL、Hupo 2013 12th Annual World Congress. 口演、2013年

9月, 横浜

24. Ono M, Kamita M, Yamada T. et al. Proteomic approach to adenoma-carcinoma sequence of colorectal cancer by 2DICAL、第72回日本癌学会学術総会、口演、2013年10月、横浜市
25. Kobayashi T. et al. Serum metabolomics as the diagnostic application for early diagnosis of pancreatic cancer. Orlando, USA. AGA-DDW2013. 2013.5.18-21.
26. Kobayashi T. et al. Serum Metabolomics as a Screening Method for Pancreatic Cancer. HUP012th Annual World Congress. Yokohama, Japan. 2013.9.14-18.

H .知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1 . 特許取得

発明名称： 膵臓がんの検査方法および検査キット

発明者： 土屋直人、緒方広子、奥坂拓氏、中釜斉

PCT 出願日： H25 年 6 月 26 日

出願番号： PCT/JP2013/67508

出願人： 国立がん研究センター

発明の名称： -アクチニン-4 遺伝子のコピー数または発現レベルを指標とした膵癌の検出を補助する方法および診断のためのキット

特許番号： 第 5391400 号

特許登録日： 平成 25 年 10 月 25 日

発明者： 本田一文 他 7 名

2 . 実用新案登録

無し

3 . その他

無し

