

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)

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
(H23-実用化(がん) - 一般-002)

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 吉田 輝彦

平成26年5月

研究報告書目次

目 次

Ⅰ．総括研究報告	
全ゲノム関連 解析、エピゲノム解析、研究総括	1
吉田 輝彦	
Ⅱ．分担研究報告	
1．血液検体のゲノム解析に基づく、肺がん高危険度群の補足のための バイオマーカーの同定に関する研究	11
河野 隆志	
軒原 浩	
渡辺 俊一	
2．血中エクソソームmiRNAに関する研究	13
土屋 直人	
3．遺伝素因と生活習慣等の交互作用の検討、コホート試料等解	15
岩崎 基	
4．PSCA遺伝子多型、ピロリ菌感染、喫煙習慣で層別化した胃がんの 累積リスクに関する研究	24
伊藤 秀美	
5．プロテオーム解析に関する研究	33
尾野 雅哉	
6．血漿アポリポプロテインAIIアイソフォームを用いた膵がん診断法の開発	36
本田 一文	
小林 道元	
鄭 基晩	
金田 隆	
加藤 仁夫	
7．臨床情報管理	38
浅村 尚生	
8．膵がんバイオマーカーの定量質量分析	39
寺崎 哲也	
大槻 純男	
立川 正憲	
内田 康雄	
9．膵臓がん患者における血清メタボローム解析	41
吉田 優	
10．水酸化プロリン修飾フィブリノーゲン の測定キット開発に関する研究	43
宮本 顕友	
品川 真吾	
Ⅲ．研究成果の刊行に関する一覧	44
Ⅳ．研究成果の刊行物・別刷	別紙

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格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、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・健康者の血漿における 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・健康者 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。患者と健康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、健康者と比較して、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思われる 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癌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. 膵管がんが発現が誘導される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. HUPO12th 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

厚生労働科学研究費補助金（研究事業）
（分担）研究報告書

血液検体のゲノム解析に基づく、肺がん高危険度群の補足のための
バイオマーカーの同定に関する研究

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

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について、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。よって、これら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。

上記研究分担者は以下3名の分担研究者と共同で一つの研究を行ったので、本報告書にて共同で報告させて頂く。

軒原 浩
同中央病院・呼吸器腫瘍科 外来医長
渡辺 俊一
同中央病院・呼吸器腫瘍科 医長
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

A. 研究目的

肺がんの遺伝素因を同定し、肺がん、特に肺腺がんに関して、個々人の固定発がんリスクの評価、高危険度群の捕捉のための基盤情報を得ることを目的とする。また、肺腺腫へのリスクについても合わせて検討する。

B. 研究方法

CT検診受診者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合わせて調べる。

（倫理面への配慮）

本研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、倫理審査委員会の承認を得て研究を進めることにより、試料等提供者の人権とプライバシーを十分に擁護する。

C. 研究結果

肺腺腫関連解析に用いる予防検診研究センター検診例1,500例についてDNAサンプルの抽出・収集を完了した。また、年齢・性別・喫煙歴等の診療情報の収集を行った。1500例の内訳は、5mm以上のGGO保有例が500例、それ以外が1000例であった。日本人肺腺がんリスク感受性遺伝子座4座、TERT, TP63, BPTF, BTNL2について、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。

D. 考察

我々が同定した感受性遺伝子の多型はアジア人において肺がんリスクと関連すると考えられた。そのうち、TERT座、TP63座の2座がGGO保有リスクと関連を示したことから肺腺腫発生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、肺発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。

E. 結論

肺腺がん感受性を規定すると考えられる4遺伝子座のうち、TERT座、TP63座の2座がGGO保有リスクと関連した。よって、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。

F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記入する。

G. 研究発表

論文発表

Mizukami T, Shiraishi K, Shimada Y, Ogiwara H, Tsuta K, Ichikawa H, Sakamoto H, Kato M, Shibata T, Nakano T, Kohno T. Molecular mechanisms underlying oncogenic RET fusion in lung adenocarcinoma. *J Thoracic Oncol.* 9 (5):622-630, 2014.

Suzuki T, Shibata T, Takaya K, Shiraishi K, Kohno T, Kunitoh H, Tsuta K, Furuta K, Goto K, Hosoda F, Sakamoto H, Motohashi H, Yamamoto M. Regulatory nexus of synthesis and degradation deciphers cellular Nrf2 expression levels. *Mol Cell Biol.* 2013, 33(12):2402-2412.

Kohno T*, Tsuta K, Tsuchihara K, Nakaoku T, Yoh K, Goto K. RET fusion gene: translation to personalized lung cancer therapy. *Cancer Sci.* 2013, 104

(11): 1396-1400.

Oike T, Ogiwara H, Tominaga Y, Ito K, Ando O, Tsuta K, Mizukami T, Shimada Y, Isomura H, Komachi M, Furuta K, Watanabe SI, Nakano T, Yokota J, Kohno T*. A synthetic lethality-based strategy to treat cancers harborin

g a genetic deficiency in the chromatin remodeling factor BRG1. Cancer Res. 2013, 73(17):5508-5518.

H . 知的財産権の出願・登録状況なし。

厚生労働科学研究補助金（研究事業）
（分担）研究報告
血液検体中のエクソソーム miRNA によるがん存在診断バイオマーカーの同定

分担研究者 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

トランスクリプトーム解析として、早期診断法の開発に資する、血清・血漿中のエクソソーム miRNA の同定を行った。がん細胞株を用いた解析と、患者由来血漿を用いた解析を行い、膵臓がん患者の血漿中で特異的に高値を示す miRNA を同定した。さらに、肺がん患者血漿中から特異的に検出されるエクソソーム miRNA を同定した。

A. 研究目的

難治がんの完治が期待できる治療法である外科的切除には、早期診断が必須である。本研究の目的は、過剰診断を抑制しつつ、根治的局所療法適用可能症例の割合の増加に資する、新たな診断マーカーを単離・同定し、担がん状態を早期に診断する技術を開発することである。検体としては、低侵襲性を引き出しうる情報の豊富さのバランスに優れる末梢血検体に、がんとしては膵臓がん、肺がん等の難治がんを対象を絞り、末梢血多層オミックス解析情報を用いたリスク診断と存在診断を同一プロジェクトの中で並行開発する。特に、本分担研究は、末梢血のエクソソームマイクロ RNA (miRNA) を用いた早期がん診断法の開発に資するバイオマーカーの同定と検証を目的とした。

B. 研究方法

患者血漿検体からのエクソソーム画分の調製を超速心法により行った。得られた画分から RNA を調製し、バイオアナライザーで品質を確認した後、miRNA マイクロアレイ解析を行い、そのプロファイルを取得した。得られたデータは、常法に従い数値化し、GeneSpring ソフトウェアで解析を行った。統計解析は、JMP を用いて検討した。

C. 研究結果

本研究では、予測通りに膵臓がん・肺がんの特異的なエクソソーム miRNA の単離が可能であるか否か、がん細胞株を用いて解析を行い、その後の患者血漿を用いた解析と合わせて、統合的にがん診断バイオマーカーとしてのエクソソーム miRNA の有用性を検討した。

膵臓がん、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常人血漿からエクソソーム画分を調製し、マイクロアレイにより、miRNA のプロファイルを行った結果、健常人と大腸腺腫の患者は層別することは不可能であったが、大腸がん、膵臓がん、肺がん患者を層別することができた。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を明らかにした。従

って、末梢血エクソソーム miRNA は、早期がん診断のバイオマーカーとして、今後開発する価値の高いシーズであること示された。

D. 考察

末梢血エクソソーム miRNA のプロファイルは、がんの病態とも深く連携し変動していることが示唆された。早期診断マーカーとしての応用も期待できる。その理由としては、本研究で用いた臨床検体である膵臓がんや肺がんの患者血漿は早期ステージの症例を含んでいないが、大腸がん患者血清を用いた解析から、ステージ 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同定している。それらは、診断薬としての実用化をめざし、開発研究を展開している。また、症例数は少ないが、大腸がんのステージ 0 の症例における血漿エクソソーム miRNA プロファイルは、大腸腺腫のそれと比べて異なっていた。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。これらの結果も、エクソソーム miRNA が、担がん状態を反映するバイオマーカーとして極めて有用性が高いことを示している。

E. 結論

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エクソソーム miRNA 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。

F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記載する。

G. 研究発表

Ogata-Kawata H, Izumiya M, Kurioka D., Honma Y, Yamada Y, Furuta K, Gunji T, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H, Watanabe M, Nakagama H, Yokota J, Kohno T, Tsuchiya N. (2014) Circulating exosomal miRNAs as biomarkers of colon cancer. Plos One.9(4):e92921,2014

H. 知的財産権の出願・登録

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：H 2 5 年 6 月 2 6 日

出願番号：PCT/JP2013/67508

出願人：国立がん研究センター

「遺伝素因と生活習慣等の交互作用の検討、コホート試料等解析」

研究分担者 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

研究要旨

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、末梢血白血球 DNA 中のメチル化レベルに注目し、症例対照研究およびコホート内症例対照研究のデータを用いて、規定要因としての環境および遺伝要因の意義を検討し、発がんリスクとの関連を明らかにすることが目的である。さらに前向きコホート研究において収集された血液検体を用いて、末梢血白血球 DNA を用いたゲノム網羅的 SNP 解析およびゲノム網羅的メチローム解析、血漿検体を用いたプロテオーム解析およびメタボローム解析を行い、オミックス情報を取得し、生活習慣情報等との統合解析により高危険度群捕捉指標の確立を目的とする。今年度は乳がんの症例対照研究の対照群のデータを用いて、末梢血白血球 DNA 中のゲノム全体のメチル化レベルの規定要因として血清有機塩素系化合物濃度との関連について検討したところ、*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、*trans*-ヘキサクロロシクロヘキサン、PCB17、PCB52/69、PCB74、PCB114、PCB183 の血清中濃度との間には有意な負の関連が見られた。有機塩素系化合物のうち PCB や DDT は国際がん研究機関の発がん性評価により「発がん性あり」と評価されているが、今回の結果は、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。また、前向きコホート研究のデータを用いて膀胱がんのコホート内症例対照研究のデータセットを構築し、ゲノム網羅的 SNP 解析およびゲノム網羅的メチローム解析を行った。さらに、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、膀胱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観察されなかった。

A. 研究目的

がんの発生と進展においてエピジェネティック異常が重要な役割を果たしていることが指摘されている。がん細胞には、ゲノム全体の低メチル化と局所的な高メチル化と言われる DNA メチル化状態の変化が存在する。特に後者は、癌抑制遺伝子プロモーター領域の CpG アイランドがメチル化された場合、染色体欠失・点突然変異などと同様に、癌抑制遺伝子の不活化の重要な機構と考えられている。またゲノム全体の低メチル化は染色体不安定性を誘発し発がんに関与すると考えられている。

これまでのメチル化に関する研究は、腫瘍組織と非腫瘍組織の間でメチル化レベルの違いを検討したものが主であったが、最近では、末梢血白血球 DNA 中のゲノム全体のメチル化レベルと腫瘍の発生リスクとの関連が報告されている。これまでに大腸腺腫、胃がん、頭頸部がん、乳がん、膀胱がんとの関連が検討され、低メチル化状態がリスク上昇に関連するとの報告がある。

加齢や生活習慣因子はゲノム異常に加え、エピゲノム修飾を通して遺伝子発現や染色体不安定性に影響し、ゲノムストレスを構成する。その多臓器の代替指標として末梢血白血球 DNA 中のメチル化レベルに注目し、

症例対照研究およびコホート内症例対照研究のデータを用いて、メチル化レベルの規定要因としての環境および遺伝要因の意義を検討し、さらに発がんリスクとの関連を明らかにすることが目的である。

一方、本研究班全体の研究目的は、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ことである。そこで前向きコホート研究において収集された血液検体を用いて、末梢血白血球 DNA を用いたゲノム網羅的 SNP 解析およびゲノム網羅的メチローム解析、血漿検体を用いたプロテオーム解析およびメタボローム解析を行い、オミックス情報を取得すると同時に、これらと生活習慣情報等の統合解析により高危険度群捕捉指標の確立を目指す。

今年度は、特に乳がんの症例対照研究の対照群のデータを用いて、ゲノム全体のメチル化レベルの規定要因として血清有機塩素系化合物濃度との関連について検討した（研究 ）。さらに前向きコホート研究から膀胱がんのコホート内症例対照研究のデータセットを構築し、末梢血白血球 DNA を用いたゲノム網羅的 SNP 解析およびゲノム網羅的メチローム解析、血漿検体を用いた絶対

定量プロテオミクス解析を行い、膵がんリスクとの関連を検討した(研究)。

B. 研究方法

【研究】

1. 研究デザイン

長野県内の4病院(長野松代総合病院、長野赤十字病院、長野市民病院、北信総合病院)において多施設症例対照研究を行った。

2. 対象者

初発の膵がんと診断され、上記の4病院に入院した20歳以上75歳未満の女性患者全員を症例とし、400症例を目標に収集した。対照は長野松代総合病院と北信総合病院の人間ドック受診予定者の女性で上記症例に対して年齢(±3歳)と居住地域が一致する者のうち最も年齢に近い1名とした。最終的に症例405例と同数の対照を収集した。本研究では、この症例対照のセットのうち、対照群を解析対象とした。

3. 調査方法

対象者本人による自記式の質問票調査を行った。質問票は、生理・生殖関連、既往歴、職業、居住地、飲酒、喫煙などに関する質問票と食物摂取頻度調査票の2つを用いた。がんの部位、進行度、ホルモンレセプターなどの臨床情報の記載を担当医師に依頼した。また生体試料として7ml EDTA2Na採血管1本(DNA抽出用)および血清9ml用採血管2本分の血液検体を収集した。

4. 栄養素摂取量の計算

食物摂取頻度調査票(138の食品項目で構成)の回答(摂取頻度と1回あたりの目安量)から各食品の1日当たりの摂取量を計算し、食品成分表の成分値を用いて各栄養素の摂取量を算出した。

5. 生体試料の分析

Genomic DNAは、末梢白血球からQIAGEN FlexiGene® DNA Kitsを使って抽出した。末梢血白血球DNA中のゲノム全体のメチル化レベルは、Luminometric Methylation Assay(LUMA法)により定量した。

血清有機塩素系化合物の分析は、血清1.5gを用いて、島津テクノロジーに委託し、ガスクロマトグラフ高分解能質量分析計を用いて測定した。対象物質として、o,p'-dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)、p,p'-DDT、p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE)、ヘキサクロロベンゼン、-ヘキサクロロシクロヘキサン、trans-ノナクロール、cis-ノナクロール、オキシクロルデン、マイレックス、polychlorinated biphenyls (PCBs) (41ピーク)を検出した。PCBについては、少なくとも96%以上の対象者で検出下限値を超えて定量された32ピークを解析対象とした。有機塩素系化合物は高脂溶性のため、測定した濃度 [pg/g wet] を血清中総脂質濃度 [g/L] と血清密度 [g/L] で除して単位脂質重量当たりの量 [ng/g lipid] として解析に用いた。

5. 解析方法

回帰分析を用いて、血清中レベルの4分位カテゴリごとに、年齢、body mass index、喫煙、飲酒で調整したメチル化レベルの平均値を算出した。また、傾向性の検定として回帰係数を算出した。

【研究】

1. 対象者

岩手県二戸、秋田県横手、長野県佐久、沖縄県中部(以上、1990年開始のコホート)、茨城県水戸、新潟県柏崎、高知県中央東、長崎県上五島、沖縄県宮古、大阪府吹田市(以上、1993年開始のコホート)の10保健所管内に研究開始時点で在住していた地域住民約14万人(40~69歳)のうち、ベースライン調査の質問票に回答しかつ血液検体の提供のあった者から、追跡開始後に判明した不適格者(外国人、調査開始前の転出者、対象年齢外の者、重複登録者)、膵がんの既往がある者を除外した対象者をサンプリング対象とした。

症例はベースライン調査後から2009年12月31日までの追跡期間中に診断された初発の膵がん患者のうち、ベースライン調査の質問票に回答しかつ血液検体の提供のあった170人である。対照は、症例の膵がん発症日(診断日)の時点で膵がんにかかっていない者から、症例と性、年齢(5歳階級)、保健所、空腹時間(7時間未満か以上か)の条件でマッチングし、条件にあう対象者の中からさらに無作為に2名を選び対照とした。

血漿検体の分析は、症例群170例、対照群340例のデータが利用可能であるが、大阪吹田地域はDNA検体が利用できないため、SNP解析およびメチローム解析は症例群150例、対照群300例が解析対象者である。

2. 調査方法

ベースライン調査(生活習慣アンケート調査、血液の採取・保存)およびフォローアップ調査(異動、死亡、疾病罹患の把握)は、「厚生省コホート研究班コホートI実施要綱」「厚生省コホート研究班コホートII実施要綱」「多目的コホートに基づくがん予防など健康の維持・増進に役立つエビデンスの構築に関する研究研究計画書-平成22年度改訂・平成24年度修正版-」(国立がん研究センター倫理審査委員会平成22年11月改訂版承認、平成24年8月修正版承認)に基づいて実施してきた。

3. 生体試料の分析

ベースライン調査にて採取したbuffy coat検体よりDNAを抽出し、イルミナ社 Human Omni Expressによるゲノム網羅的SNP解析、イルミナ社 Infinium Human Methylation450 ビーズチップを用いてゲノム網羅的なメチル化レベルの解析を行った。

血漿検体(1mL)をプロテオーム解析およびメタボローム解析用に分注を行った。絶対

定量プロテオミクス解析により、膵がんの早期診断マーカーの候補タンパク 24 種のうち測定系の構築が可能な insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-2、C2a、C2b の 3 種類のタンパクを分析した。さらに、膵がんリスクとの関連が想定されるバイオマーカーのうち測定系の構築が可能である、IGFBP3、アディポネクチン、高感度 C-reactive protein (CRP) を分析した。

3. 統計解析

ゲノム網羅的 SNP 解析およびゲノム網羅的メチローム解析は、研究代表者の分担課題として報告する。

絶対定量プロテオミクス解析により分析をしたタンパクと膵がんリスクの関連の検討として、対照群の分布をもとに 3 分位をとり、血中レベルの低い群を基準としたオッズ比を条件付きロジステック回帰分析により算出した。オッズ比は、年齢、喫煙、飲酒、body mass index、余暇時の運動、糖尿病の既往で調整した。また観察期間を 8 年未満を前半、8 年以上 13 年未満を中間、13 年以上を後半として 3 つの期間ごとにオッズ比を算出した。観察期間別の解析の目的は、膵がんのリスク要因と早期診断マーカーの違いについて示唆を得るためである。つまり、早期診断マーカーであれば、採血後から比較的短期間に診断された膵がん症例においては、膵がんの存在によりすでに血中濃度が高くリスク上昇として観察されるが、観察期間が長くなるとこの関連は見られなくなると考えらえる。一方、リスク要因であれば観察期間に関わらず、リスク上昇が見られると想定される。今回は、対象者数を考慮し、それらがほぼ均等になるように前述のように観察期間を 3 つに分けて検討することとした。

(倫理面への配慮)

長野における乳がん症例対照研究および多目的コホート研究は、国立がん研究センター研究倫理審査委員会の承認を得ている。なお、各研究集団の取り扱いについては、関連する倫理指針を遵守し、個人情報保護に関して細心の注意を払いながら研究を実施している。

C. 研究結果

【研究】

対照群のメチル化レベルの平均値は 70.1%で、範囲は 59.0%から 81.2%であった。

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、 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(表 1)。しかし、cis-ノナクロール、マイレックス、総 PCBs の血清中濃度との間には有意な関連は見られなかった。

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(表 2)。

【研究】

ゲノム網羅的 SNP 解析およびゲノム網羅的メチローム解析は、研究代表者の分担課題の報告を参照されたい。

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(表 3)。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。高感度 CRP については有意でないがリスク上昇の傾向であった。観察期間別では、前半(観察期間 8 年未満)で有意なリスク上昇が見られたが、中間(観察期間 8 年以上 13 年未満)、後半(観察期間 13 年以上)ではリスク上昇は見られなかった。

C2b について有意でないがリスク上昇の傾向であった。観察期間別では、特に中間で有意なリスク上昇がみられたが、前半および後半では関連は見られなかった。

D. 考察

【研究】

有機塩素系化合物のうち PCB や DDT は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。今回の検討において、これらの化学物質を含め、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メチル化レベル(Alu)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。

本研究の方法論上の問題点は、断面研究であるため、原因か結果かの区別ができないことである。つまり血清中有機塩素系化合物濃度が高い結果としてメチル化レベルが低くなるのか、メチル化レベルが低い結果として血清中濃度が高くなるのかは、研究デザイン上、区別することはできない。また本研究では、末梢血白血球中 DNA のメチル化レベルを測定しているが、白血球の分画の情報はなく、構成される細胞の割合による影響は考慮できていない。

【研究】

絶対定量プロテオミクス解析により、測定系の構築が可能であった 6 つのタンパクを定量した。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。今回の検討においては、膵がんリスクと関連するバイオマーカーを見出すことはできなかった。

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。全観察期間を対象とする解析では、統計学的に有意なリスク上昇は観察されなかったが、観察期間別の解析において、前半で有意なリスク上昇が見られたが、中間、後半ではリスク上昇が観察されなかった。この結果は、膵がんの存在による高感度 CRP 値の上昇を示唆しており、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。

C2b については、高感度 CRP 同様に全観察期間を対象とする解析では、統計学的に有意ではないがリスク上昇の傾向が見られた。観察期間別の解析では、特に中間で有意なリスク上昇が見られた。また感度解析として、血中濃度の 4 分位を用いて膵がんリスクとの関連を検討したところ、各群のオッズ比 (95% 信頼区間) は、1.00、1.07 (0.55-2.08)、1.86 (0.98-3.51)、1.76 (0.92-3.39) であり、傾向性の検定の p 値は 0.03 で、有意なリスク上昇が観察された。これらの結果は C2b が膵がんのリスク要因である可能性を示唆している。しかしながら、もともと早期診断マーカーの候補として選択されたものであるため、膵がんリスクに關与するメカニズム等に関する検討が必要である。

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。

E. 結論

今年度は乳がんの症例対照研究の対照群のデータを用いて、末梢血白血球 DNA 中のゲノム全体のメチル化レベルの規定要因として血清有機塩素系化合物濃度との関連について検討したところ、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、ヘキサクロロシクロヘキサン、PCB17、PCB52/69、PCB74、PCB114、PCB183 の血清中濃度との間には有意な負の関連が見られた。また、前向きコホート研究のデータを用いて膵がんのコホート内症例対照研究のデータセットを構築し、ゲノム網羅的 SNP 解析およびゲノム網羅的メチローム解析を行った。さらに、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観察されなかった。

G. 研究発表

1. Pandey JP, Namboodiri AM, Kistner-Griffin E, Iwasaki M, Kasuga Y, Hamada GS, Tsugane S. Racially restricted contribution of immunoglobulin Fcγ3 and Fcγ3 receptor genotypes to humoral immunity to human epidermal growth factor receptor 2 in breast cancer. Clin Exp Immunol. 2012;171:273-7.

2. Shi J, Sung H, Zhang B, Lu W, Choi JY, Xiang YB, Kim MK, Iwasaki M, Long J, Ji BT, Park SK, Zheng Y, Tsugane S, Yoo KY, Wang W, Noh DY, Han W, Kim SW, Lee MH, Lee JW, Lee JY, Shen CY, Matsuo K, Ahn SH, Gao YT, Shu XO, Cai Q, Kang D, Zheng W. New breast cancer risk variant discovered at 10q25 in East Asian women. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2013;22:1297-303.

3. Zheng W, Zhang B, Cai Q, Sung H, Michailidou K, Shi J, Choi JY, Long J, Dennis J, Humphreys MK, Wang Q, Lu W, Gao YT, Li C, Cai H, Park SK, Yoo KY, Noh DY, Han W, Dunning AM, Benitez J, Vincent D, Bacot F, Tessier D, Kim SW, Lee MH, Lee JW, Lee JY, Xiang YB, Zheng Y, Wang W, Ji BT, Matsuo K, Ito H, Iwata H, Tanaka H, Wu AH, Tseng CC, Van Den Berg D, Stram DO, Teo SH, Yip CH, Kang IN, Wong TY, Shen CY, Yu JC, Huang CS, Hou MF, Hartman M, Miao H, Lee SC, Putti TC, Muir K, Lophatananon A, Stewart-Brown S, Siriwanarangsana P, Sangrajrang S, Shen H, Chen K, Wu PE, Ren Z, Haiman CA, Sueta A, Kim MK, Khoo US, Iwasaki M, Pharoah PD, Wen

W, Hall P, Shu XO, Easton DF, Kang D. 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.* 2013;22:2539-50.

4. Pandey JP, Kistner-Griffin E, Black L, Namboodiri AM, Iwasaki M, Kasuga Y, Hamada GS, Tsugane S. IGKC and FcγR genotypes and humoral immunity to HER2 in breast cancer. *Immunobiology.* 2014;219:113-7.

5. Kuchiba A, Iwasaki M, Ono H, Kasuga Y, Yokoyama S, Onuma H, Nishimura H, Kusama R, Tsugane S, and Yoshida T. 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)

2. 学会発表

1. 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

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1. Mean global methylation level in leukocyte DNA (%) by quartile of serum lipid-adjusted organochlorine level (n=399).

Serum organochlorine		Global methylation level of leukocyte DNA (%)			
Quartile Median ^a	No. of	Crude	Multivariate-adjusted ^b		P-value
category (ng/g lipid)	subjects	Mean	Mean (95% CI)	(95% CI)	
<i>o,p'</i> -DDT					
Lowest	0.9	79	70.9	71.2 (70.4, 72.1)	
Second	1.3	102	70.6	70.6 (69.8, 71.3)	
Third	2.0	109	69.9	69.8 (69.1, 70.5)	
Highest	4.1	109	69.4	69.0 (68.2, 69.7)	
Continuous (per quartile category)				-0.75 (-1.11, -0.40)	<0.0001*
<i>p,p'</i> -DDT					
Lowest	5.6	98	71.4	71.6 (70.8, 72.3)	
Second	8.5	99	70.3	70.1 (69.4, 70.8)	
Third	12	95	69.7	69.7 (68.9, 70.4)	
Highest	23	107	69.2	68.9 (68.2, 69.6)	
Continuous (per quartile category)				-0.83 (-1.17, -0.49)	<0.0001*
<i>p,p'</i> -DDE					
Lowest	160	95	70.8	71.0 (70.3, 71.8)	
Second	300	98	70.7	70.5 (69.8, 71.3)	
Third	490	102	70.2	70.1 (69.4, 70.8)	
Highest	1100	104	68.9	68.6 (67.8, 69.3)	
Continuous (per quartile category)				-0.77 (-1.12, -0.42)	<0.0001*
<i>trans</i> -Nonachlor					
Lowest	13	89	70.8	71.0 (70.1, 71.9)	
Second	20	100	70.0	69.9 (69.2, 70.6)	
Third	27	103	70.1	70.2 (69.4, 70.9)	
Highest	41	107	69.8	69.3 (68.5, 70.1)	
Continuous (per quartile category)				-0.44 (-0.84, -0.04)	0.030*
<i>cis</i> -Nonachlor					
Lowest	2.0	94	70.7	70.6 (69.8, 71.5)	
Second	3.3	104	70.0	69.9 (69.2, 70.6)	
Third	4.7	95	70.1	70.2 (69.4, 71.0)	
Highest	7.0	106	69.8	69.6 (68.8, 70.3)	
Continuous (per quartile category)				-0.28 (-0.67, 0.11)	0.16
Oxychlorane					
Lowest	5.4	99	70.8	70.9 (70.1, 71.7)	
Second	7.8	94	70.3	70.4 (69.6, 71.1)	
Third	9.7	91	69.7	69.5 (68.7, 70.3)	
Highest	15	115	69.9	69.4 (68.7, 70.2)	
Continuous (per quartile category)				-0.53 (-0.90, -0.15)	0.006*
HCB					
Lowest	20	94	70.5	70.7 (69.9, 71.5)	
Second	25	85	70.3	70.2 (69.5, 71.0)	
Third	30	118	70.2	69.9 (69.2, 70.6)	

Highest	38	102	69.7	69.4 (68.6, 70.2)		
Continuous (per quartile category)					-0.41 (-0.79, -0.03)	0.034*
Mirex						
Lowest	1.4	86	70.6	70.4 (69.6, 71.3)		
Second	1.9	96	69.6	69.6 (68.9, 70.4)		
Third	2.4	112	70.3	70.3 (69.6, 71.0)		
Highest	3.5	105	70.1	69.8 (69.0, 70.6)		
Continuous (per quartile category)					-0.09 (-0.46, 0.28)	0.63
-HCH						
Lowest	26	96	70.8	71.3 (70.4, 72.1)		
Second	52	102	70.3	70.2 (69.4, 70.9)		
Third	82	89	70.1	69.9 (69.1, 70.6)		
Highest	160	112	69.5	68.9 (68.2, 69.7)		
Continuous (per quartile category)					-0.73 (-1.11, -0.35)	0.0002*
Total PCBs						
Lowest	110	98	70.4	70.5 (69.7, 71.3)		
Second	160	82	69.8	69.7 (68.9, 70.6)		
Third	200	116	70.3	70.2 (69.5, 70.9)		
Highest	290	103	70.0	69.7 (68.9, 70.5)		
Continuous (per quartile category)					-0.19 (-0.59, 0.20)	0.33

CI, confidence interval.

DDT, dichlorodiphenyltrichloroethane.

DDE, dichlorodiphenyldichloroethylene.

HCB, hexachlorobenzene.

-HCH, -hexachlorocyclohexane.

PCB, polychlorinated biphenyl.

^aData from Itoh et al. (2009).

^bAdjusted for age (continuous), body mass index (continuous), smoking habit (ever, never) and drinking habit (non-drinker, occasional drinker, regular drinker).

* $P < 0.05$.

表2. Association between quartile levels of serum individual PCBs and mean global methylation level in leukocyte DNA.

Serum PCB congener (nanograms per gram lipid)	Multivariate-adjusted ^a	
	β (95% CI)	<i>P</i> -value
PCB17	-0.43 (-0.78, -0.08)	0.015*
PCB28	-0.23 (-0.59, 0.12)	0.20
PCB52/69	-0.33 (-0.67, -0.0007)	0.0495*
PCB48/47	-0.07 (-0.42, 0.29)	0.71
PCB74	-0.64 (-1.08, -0.20)	0.004*
PCB66	-0.23 (-0.58, 0.12)	0.20
PCB90/101	-0.29 (-0.63, 0.04)	0.085
PCB99	-0.35 (-0.72, 0.02)	0.061
PCB118	-0.26 (-0.64, 0.12)	0.18
PCB114	-0.46 (-0.88, -0.05)	0.030*
PCB105	-0.27 (-0.66, 0.12)	0.17
PCB146	-0.30 (-0.69, 0.10)	0.14
PCB153	-0.27 (-0.66, 0.12)	0.17
PCB164/163	-0.17 (-0.56, 0.22)	0.38
PCB138	-0.33 (-0.71, 0.05)	0.086
PCB128/162	-0.03 (-0.38, 0.32)	0.87
PCB167	-0.29 (-0.68, 0.11)	0.15
PCB156	-0.28 (-0.67, 0.11)	0.16
PCB182/187	-0.22 (-0.60, 0.15)	0.24
PCB183	-0.45 (-0.82, -0.07)	0.022*
PCB177	-0.29 (-0.68, 0.09)	0.14
PCB180	-0.16 (-0.55, 0.22)	0.40
PCB170	-0.22 (-0.58, 0.14)	0.24
PCB189	-0.15 (-0.53, 0.23)	0.43
PCB202	-0.09 (-0.47, 0.28)	0.62
PCB198/199	-0.12 (-0.50, 0.26)	0.53
PCB196	-0.009 (-0.38, 0.36)	0.96
PCB203	-0.09 (-0.48, 0.29)	0.63
PCB194	-0.11 (-0.48, 0.26)	0.56
PCB208	-0.11 (-0.49, 0.28)	0.58
PCB206	-0.09 (-0.44, 0.27)	0.64
PCB209	-0.08 (-0.45, 0.29)	0.67

PCB, polychlorinated biphenyl.

CI, confidence interval.

^aAdjusted for age (continuous), body mass index (continuous), smoking habit (ever, never) and drinking habit (non-drinker, occasional drinker, regular drinker).

**P*<0.05.

表3. Association between plasma levels of biomarkers and the risk of pancreatic cancer according to follow-up periods.

Category	All follow-up period						Follow-up period: less than 8 years			Follow-up period: 8-13 years			Follow-up period: more than 13 years		
	Median	case	control	OR ^a	95% CI	P for trend	OR ^a	95% CI	P for trend	OR ^a	95% CI	P for trend	OR ^a	95% CI	P for trend
Adiponectin															
Lowest	206	59	113	1.00		0.23	1.00		0.09	1.00		0.85	1.00		0.55
Middle	339.2	67	113	1.17	(0.70 , 1.93)		0.63	(0.24 , 1.65)		1.61	(0.51 , 5.03)		1.22	(0.42 , 3.60)	
Highest	569.9	44	114	0.69	(0.37 , 1.29)		0.36	(0.11 , 1.17)		1.33	(0.34 , 5.16)		0.64	(0.17 , 2.43)	
CRP															
Lowest	27.3	44	112	1.00		0.23	1.00		0.04	1.00		0.69	1.00		0.71
Middle	52.1	63	114	1.47	(0.87 , 2.47)		3.09	(1.07 , 8.92)		1.83	(0.63 , 5.35)		0.36	(0.11 , 1.16)	
Highest	135.7	63	114	1.43	(0.83 , 2.49)		3.07	(1.10 , 8.60)		1.42	(0.46 , 4.42)		0.94	(0.27 , 3.20)	
IGFBP3															
Lowest	120.5	52	113	1.00		0.37	1.00		0.70	1.00		0.11	1.00		0.23
Middle	151.6	57	113	1.30	(0.78 , 2.14)		0.72	(0.29 , 1.81)		4.06	(1.20 , 13.76)		2.21	(0.67 , 7.24)	
Highest	187.3	61	114	1.29	(0.73 , 2.27)		0.83	(0.27 , 2.56)		3.41	(1.00 , 11.70)		1.88	(0.47 , 7.49)	
IGFBP2															
Lowest	13.1	69	111	1.00		0.24	1.00		0.35	1.00		0.86	1.00		0.06
Middle	19.8	48	115	0.74	(0.45 , 1.22)		1.14	(0.41 , 3.16)		0.40	(0.13 , 1.26)		0.70	(0.26 , 1.89)	
Highest	29.6	53	114	0.72	(0.42 , 1.26)		1.68	(0.56 , 5.05)		0.82	(0.31 , 2.21)		0.24	(0.06 , 1.03)	
C2a															
Lowest	273.9	58	112	1.00		0.89	1.00		0.83	1.00		0.23	1.00		0.86
Middle	319	47	114	0.76	(0.44 , 1.32)		0.84	(0.27 , 2.67)		1.04	(0.36 , 3.04)		0.61	(0.20 , 1.84)	
Highest	372.5	65	114	1.01	(0.58 , 1.76)		0.88	(0.31 , 2.50)		1.85	(0.62 , 5.48)		0.90	(0.29 , 2.73)	
C2b															
Lowest	263.7	53	113	1.00		0.10	1.00		0.58	1.00		0.01	1.00		0.77
Middle	319	42	113	0.86	(0.49 , 1.50)		0.72	(0.27 , 1.94)		1.34	(0.39 , 4.58)		1.21	(0.38 , 3.81)	
Highest	377.4	74	114	1.50	(0.88 , 2.56)		1.35	(0.48 , 3.76)		4.08	(1.35 , 12.38)		1.21	(0.36 , 4.05)	

^a Adjusted for matching variable (sex, age group, area, fasting status), age, body mass index, smoking status, alcohol intake, physical activity in leisure time, history of diabetes mellitus.

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))
 分担研究報告書

PSCA 遺伝子多型、ピロリ菌感染、喫煙習慣で層別化した胃がんの累積リスクに関する研究

研究分担者 伊藤 秀美
 愛知県がんセンター研究所 疫学・予防部 室長

研究要旨

確立されたリスク要因を用いて生涯リスクを正しく評価することは、がん予防行動を促進するひとつのシンプルな方法である。我々は、PSCA 遺伝子多型-rs2294008、ピロリ菌感染と喫煙習慣といった遺伝的あるいは環境要因、生活習慣で層別化した累積リスクを、胃がん症例 697 例と非がん対照者 1372 例の症例対照研究を用いて評価した。これらのリスク要因と胃がんリスクとの関連を、性、年齢、胃がん家族歴、野菜・果物摂取を調整したロジスティック回帰モデルを使い、オッズ比と 95%信頼区間で評価した。さらに、Peto らの方法により、オッズ比と日本人の 5 歳年齢階級別罹患率等を組み合わせ、累積リスクを算出した。75 歳までの累積リスクは、0.9% (95% CI, 0.3%-3.3%) から 13.4% (95% CI, 13.3%-13.4%) まで、リスクに応じて大きく異なっていた。PSCA 遺伝子多型のリスクアレルの保有者では、ピロリ菌感染陽性で喫煙習慣のある人の累積リスクは 13.4%であったが、ひとつでもリスク要因が除かれると、累積リスクは 2.0% (95% CI, 1.9%-2.0%、ピロリ菌陰性、非喫煙)、3.9% (95% CI, 3.8%-3.9%、ピロリ菌陰性、喫煙歴あり)、9.4% (95% CI, 9.4%-9.5%、ピロリ菌陽性、非喫煙) と低くなることが分かった。本研究では、遺伝的要因と環境要因を組み合わせることで正確に高危険度群を補足することが可能であることが分かった。また、本研究成果は、リスクに応じた胃がんの一次予防、二次予防の促進に重要な示唆を与えるものであった。

A. 研究目的

日本において胃がんの年齢調整罹患率は減少に転じているものの、いまだ頻度の高いがんであり、胃がん対策は我が国の重要課題の一つである。

これまでの Genome-wide association study (GWAS) において、胃がんリスクと関連する遺伝子多型が同定されている。しかし、胃がんにおいて、これらの遺伝子多型と既知の生活習慣や環境要因とを組み合わせた場合の影響については検討されていない。さらに、次ステップとして、これらの知見をがん予防への応用することが必要である。つまり、胃がんリスクに関連する遺伝的な情報を胃がん予防介入へ応用する“トランスレーション”が必要である。

本研究では、確立されたリスク要因を用いて生涯リスクを正しく評価することは、がん予防行動を促進するひとつのシンプルな方法であると考え、遺伝的要因や環境要因で層別化された胃がん累積リスクを評価した。

B. 研究方法

対象は、2001 年から 2005 年に愛知県がんセンター中央病院で実施されている病院疫学研究に参加した対象者の中から選択した。参加者のうち、697 名の初発胃がん患者と、同時期に受診し、年齢を適合させた 1,372 名の非がん対照者を用いた症例対照研究を実施した。

受診時に自記式の質問票により、喫煙状況、野菜、果物摂取、胃がんの家族歴等を、参加者より聴取している。また同時に提供を受けた血液検体より DNA を抽出し、PSCA 遺伝子多型

(PSCA-rs2294008) の測定に用いた。遺伝子多型の決定には、TaqMan 法を用いた。また、ピロリ菌感染について、血清を用いて、ピロリ菌 IgG 抗体を測定して決定した。

遺伝子多型、ピロリ菌感染、喫煙習慣と胃がんリスクとの関連の指標として、条件付き多変量ロジスティック回帰モデルを用いたオッズ比とその 95%信頼区間を用いた。多変量解析モデルには、既知の交絡要因を調整因子として投入した。対照群において、各遺伝子座の Hardy-Weinberg 連鎖不平衡からの乖離を検討した。

PSCA 遺伝子多型、ピロリ菌感染、喫煙習慣を用いて構築されたリスク予測モデルの正確性について、ROC 解析で遺伝的リスク要因のみ、年齢、ピロリ菌感染、喫煙習慣からなる既知のリスク要因のみ、遺伝的+既知のリスク要因による 3 つのモデルの曲線下面積 (AUC) を比較することで、検討した。

PSCA 遺伝子多型、ピロリ菌感染、喫煙で層別化した累積リスクについては、Peto らの方法 (BMJ 2000) により、リスクグループのオッズ比、対照群におけるリスクグループの頻度分布、2003 年日本人人口、2003 年胃がん 5 歳階級別罹患率 (国立がん研究センター提供) を用いて算出した。

また、PSCA 遺伝子多型、ピロリ菌感染、喫煙によるリスク予測の正確性について、ROC 解析による AUC (area under the curve) により評価した。

(倫理面への配慮)

この研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づき計画され、愛知県がんセンターのヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会にて「初診患者を対象とした癌遺伝子多型と環境要因の交互作用の研究」として承認を受けている。実施においては、研究対象者よりインフォームドコンセントを行った上で安全に実施された。

C. 研究結果

表1に対象者の特性を示す。胃癌症例は、対照者に比べて、喫煙経験者(禁煙者、現喫煙者)が多く、ピロリ菌感染陽性者が多かった。ピロリ菌感染陰性者に比べ、陽性者のオッズ比は、3.07(95%CI, 2.34-4.02)で、非喫煙者と比べた場合のオッズ比は、喫煙経験者で1.09(0.79-1.50)、現喫煙者で1.91(1.42-2.57)と、胃癌と喫煙の間には統計学的有意な関連が認められた(表2)。ピロリ菌感染と喫煙習慣は、それぞれ胃癌の独立したリスク要因であったが、両者の間に交互作用は認められなかった(P for interaction, 0.389)。表3に示すとおり、PSCA 遺伝子多型-rs22940008 と胃癌リスクとの間には、統計学的有意な関連が認められた。

次に、PSCA 遺伝子多型のリスクアレル数(0, 1-2)、ピロリ菌感染の有無、喫煙経験の有無により、8つのリスクグループを作成し、PSCA 遺伝子多型のリスクアレル0、ピロリ菌感染陰性、非喫煙者に対する、その他7つのリスクグループのオッズ比を算出し、それを元に累積リスクを算出した。75歳までの累積リスクは、0.9%(95% CI, 0.3%-3.3%) から 13.4%(95% CI, 13.3%-13.4%)まで、リスクに応じて大きく異なっていた。PSCA 遺伝子多型のリスクアレルの保有者では、ピロリ菌感染陽性で喫煙習慣のある人の累積リスクは13.4%であったが、ひとつでもリスク要因が除かれると、累積リスクは2.0%(95% CI, 1.9%-2.0%、ピロリ菌陰性、非喫煙)、3.9%(95% CI, 3.8%-3.9%、ピロリ菌陰性、喫煙歴あり)、9.4%(95% CI, 9.4%-9.5%、ピロリ菌陽性、非喫煙)と低くなることが分かった。(表4, 図1)

図2に、PSCA 遺伝子多型、ピロリ菌感染、喫煙によるリスク予測モデルのROC曲線を示す。遺伝子多型だけのモデルのAUCは0.617、既知のリスク要因(ピロリ菌感染と喫煙習慣)によるAUCは0.725であった。さらに、遺伝的要因と環境要因によるモデルのAUCは0.742と、統計学的有意に他の2つのモデルよりも予測能が優れていた(p, 9.60×10^{-34})

D. 考察

胃癌がんの遺伝的リスク予測モデルを構築した。本研究の結果より、胃癌リスク予測には、遺伝的要因のみでは不十分で、環境要因や生殖要因といった既知のリスク要因と合わせて予測する必要があることが分かった。

また、PSCA 遺伝子多型、ピロリ菌感染、喫煙習慣によって、胃癌罹患累積リスクが大きくなったことから、遺伝的リスクごとに個別化

された一次予防(リスク評価とリスク変容)や二次予防(検診頻度や強度等)の重要性が示唆された。

本研究で用いた遺伝的がんリスク予測モデル構築やがん罹患累積リスク算出の手法は、びまん型胃癌、肺がん、膵がん等の難治性のがんにも適用することができ、これらのがんにおける遺伝的リスク予測マーカーの同定や高危険群の捕捉に役立つものと考えられた。

E. 結論

PSCA 遺伝子多型、ピロリ菌感染、喫煙習慣で層別化した胃癌累積リスク算出と、3要因によるリスク予測モデルを構築した。本研究の成果は、個別化乳がん予防の重要性を示唆するものであった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ito H. et al. Time to first cigarette and lung cancer risk in Japan. *Ann Oncol.*24(11)2870-2875,2013

2. 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), 1510-115, 2013

3. Pelucchi C, Ito H .et al. The stomach cancer pooling (StoP) project: study design and presentation. *Eur J Cancer Prev*, 2014

2. 学会発表

伊藤秀美ら。日本人におけるPSCA 遺伝子多型、ピロリ菌感染、喫煙状況別の累積胃癌リスク。第72回日本癌学会学術総会、2013年10月3日-5日、横浜。

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 いが対象者の特性

Overall		Cases n=697		Controls n=1372	
			%		%
Sex					
	Males	521	74.8	1,028	74.9
	Females	176	25.2	344	25.1
Age (years)					
	<40	34	4.9	146	10.6
	40-49	72	10.3	154	11.2
	50-59	245	35.2	429	31.3
	60-69	210	30.1	435	31.7
	>70	136	19.5	208	15.2
Smoking Status					
	Never	222	31.9	538	39.2
	Former	181	26.0	403	29.4
	Current	294	42.2	430	31.3
	Unknown	0	0.0	1	0.1
Alcohol drinking					
	Never	228	32.7	452	33.0
	Former	16	2.3	39	2.8
	Current	452	64.9	881	64.2
	Unknown	1	0.1	0	0.0
Fruit/Vegetable intake					
	Lowest tertile (less than 114.0g/day)	263	37.7	446	32.5
	Middle tertile (< 199.96g/day)	208	29.9	445	32.4
	Highest tertile (199.96g/day or more)	209	30.0	445	32.4
	Unknown	17	2.4	36	2.7
Family history of gastric cancer					
	Yes	153	22.0	239	17.4
	No	544	78.0	1,133	82.6
H.pylori IgG test					
	Negative	124	17.8	628	45.8
	Positive	573	82.2	744	54.2
AG defined by PG testing					
	Negative	262	37.6	893	65.1
	Positive	434	62.3	479	34.9
	Unknown	1	0.1	0	
Histologic classification					
	Diffuse	379	54.4		
	Intestinal	305	43.7		
	Unknown	13	1.9		

表2 胃がんリスクとピロリ菌感染、喫煙習慣との関連

			Case	Control	Model 1 OR ^a (95% CI)	Model 2 OR ^b (95% CI)
H.pylori infection						
	Negative		124	628	Reference	Reference
	Positive		573	744	3.81 (3.00 - 4.83)	3.07 (2.34 - 4.02)
				p for trend	2.90 x 10 ⁻²⁸	4.38 x 10 ⁻¹⁶
Smoking ^c						
	Never		222	538	Reference	Reference
	Former		181	403	1.20 (0.91 - 1.59)	1.09 (0.79 - 1.50)
	Current		294	430	2.09 (1.60 - 2.70)	1.91 (1.42 - 2.57)
				p for trend	3.88 x 10 ⁻⁹	3.39 x 10 ⁻⁶
	Ever		475	833	1.66 (1.31 - 2.12)	1.50 (1.15 - 1.95)
				p for trend	3.15 x 10 ⁻⁵	2.86 x 10 ⁻³
H.pylori infection and smoking						
	Negative	Never	40	264	Reference	Reference
	Negative	Ever	84	363	2.02 (1.28 - 2.18)	1.80 (1.11 - 2.89)
	Positive	Never	182	274	4.64 (3.09 - 6.99)	3.56 (2.30 - 5.53)
	Positive	Ever	391	470	6.78 (4.48 - 10.3)	5.11 (3.27 - 7.98)
				p for trend	1.14 x 10 ⁻³²	4.09 x 10 ⁻¹⁸
				p for interaction	0.196	0.389

^a ORs by the conditional logistic regression model adjusted for age.

^b ORs were calculated by a conditional logistic regression model adjusted for smoking status or H.pylori infection status, and other potential confounding factors such as age fruit/vegetable intake, family history of cancer, gastric atrophy defined by serological PG testing and drinking habit.

^c One control subject was excluded because Information on smoking status was unknown.

表3 胃がんリスクと PSCA 遺伝子多型との関連

Chromosome /Gene/ SNP	Genotype	Case	Control	Model 1		Model 2	
				OR ^a (95% CI)	p	OR ^b (95% CI)	p
8q24.3 PSCA rs2294008							
	CC	48	190	Reference		Reference	
	CT	327	660	1.94 (1.36 - 2.74)	2.10 x 10 ⁻⁴	1.94 (1.29 - 2.89)	1.31 x 10 ⁻³
	TT	322	522	2.39 (1.69 - 3.39)	8.23 x 10 ⁻⁷	2.56 (1.72 - 3.83)	4.45 x 10 ⁻⁶
	MAF	0.303	0.379				
			Per allele model	1.42 (1.23 - 1.64)	1.74 x 10 ⁻⁶	1.49 (1.26 - 1.76)	4.13 x 10 ⁻⁶
			Dominant model	2.16 (1.55 - 3.01)	6.38 x 10 ⁻⁶	2.23 (1.52 - 3.28)	4.29 x 10 ⁻⁵
			Recessive model	1.40 (1.16 - 1.69)	4.09 x 10 ⁻⁴	1.50 (1.20 - 1.87)	3.08 x 10 ⁻⁴

^a Crude OR by the conditional logistic regression model

^b ORs were calculated by a conditional logistic regression model adjusted for smoking habit, fruit/vegetable intake, family history of cancer, gastric atrophy defined by serological PG testing, H.pylori infection status and drinking habit.

表4 胃がんリスクにおける、PSCA 遺伝子多型、ピロリ菌感染、喫煙習慣の共同効果

# of risk alleles	H.pylori infection	Smoking	Cases	Controls	OR ^a (95% CI)	Cumulative risk (%) by age 75 years (95% CI)
0	Negative	Never	3	31	1.00 (reference)	1.17 (0.32 - 4.23)
0	Negative	Ever	7	40	2.53 (0.52 - 12.4)	2.95 (2.21 - 3.90)
0	Positive	Never	10	42	3.04 (0.69 - 13.3)	3.53 (2.96 - 4.18)
0	Positive	Ever	28	76	4.90 (1.24 - 19.2)	5.63 (5.22 - 6.00)
1-2	Negative	Never	37	233	2.19 (0.60 - 8.04)	2.56 (2.54 - 2.55)
1-2	Negative	Ever	77	323	3.82 (1.04 - 14.0)	4.42 (4.40 - 4.41)
1-2	Positive	Never	172	232	8.17 (2.24 - 29.8)	9.21 (9.15 - 9.22)
1-2	Positive	Ever	363	394	11.64 (3.19 - 42.5)	12.9 (12.8 - 12.9)
			P for interaction ^b		0.612	

^a ORs were calculated by a conditional logistic regression model adjusted for fruit/vegetable intake, family history of cancer, gastric atrophy defined by serological PG testing and drinking habit.

^b P for interaction was calculated to assess the effect modification by rs2294008 on the combined effect of HP infection and smoking

図1 PSCA 遺伝子多型、ピロリ菌感染、喫煙習慣による層別化累積リスク

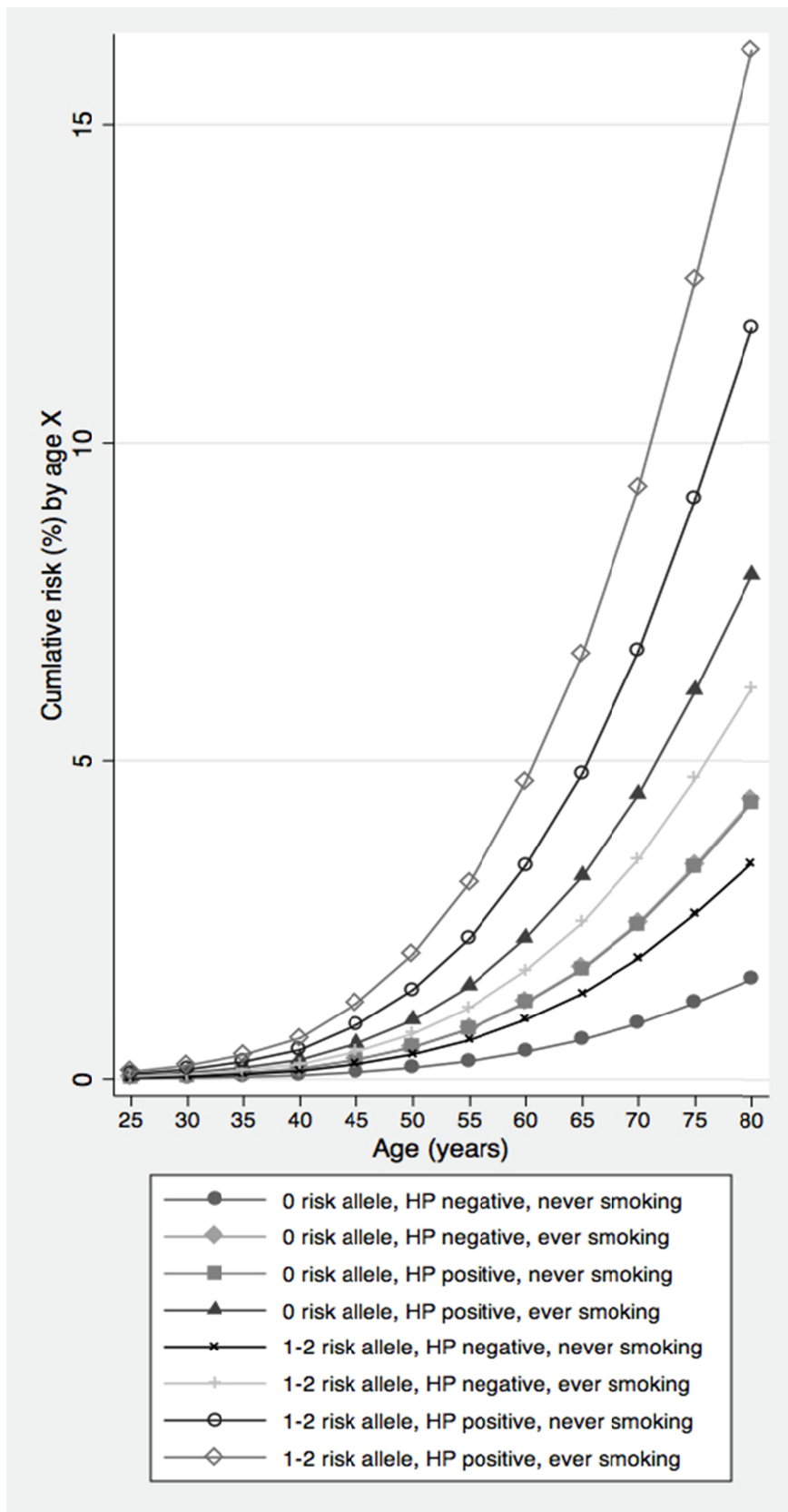
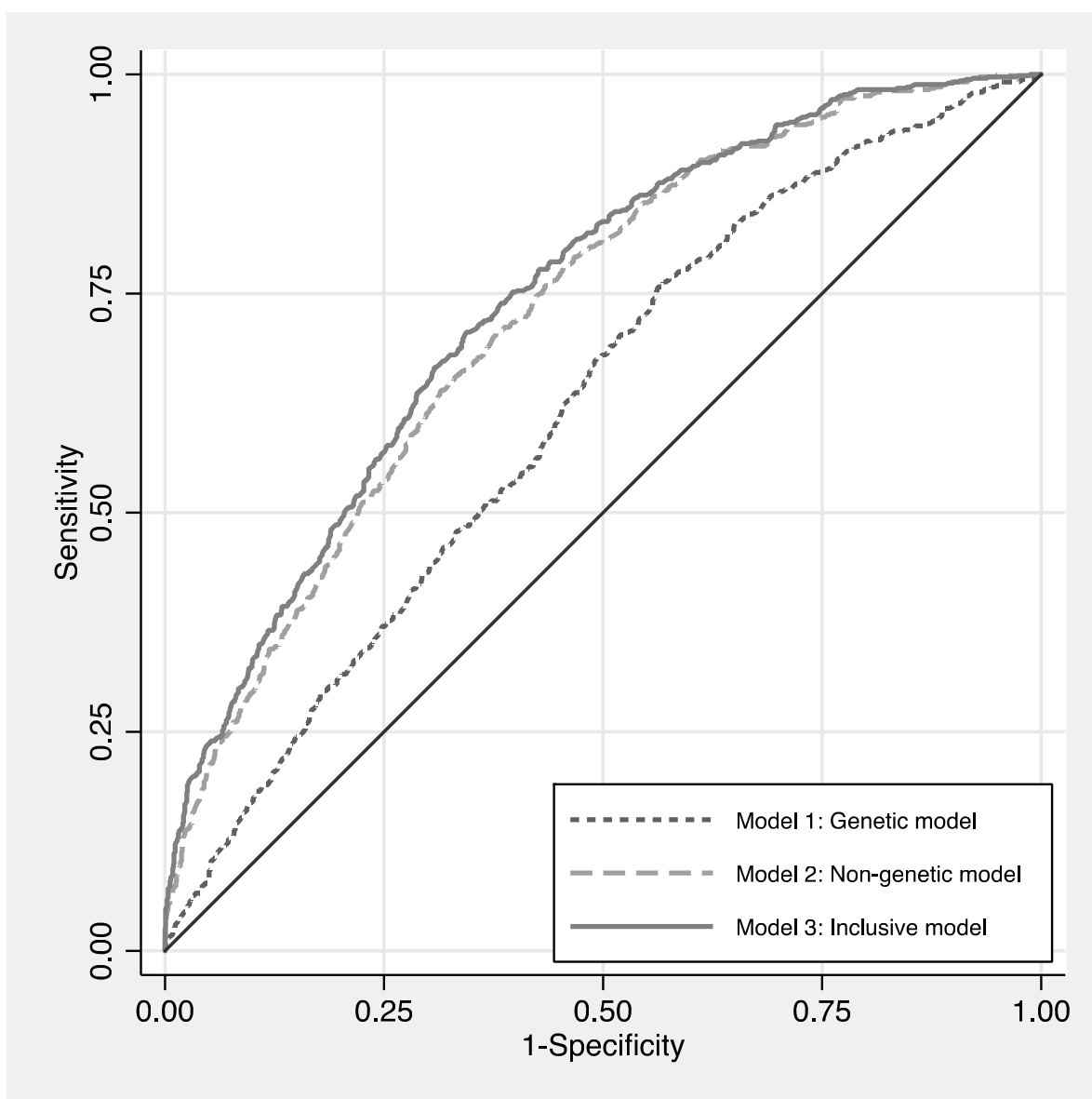


図2 PSCA 遺伝子多型、ピロリ菌感染、喫煙習慣による胃がんリスク予測モデルの精度評価



Prediction model (Predictors)	Area under the curve (95% CI) ^a	Integrated discrimination improvement (p) ^b
Genetic model (rs2294008)	0.617 (0.592 - 0.642)	0.01396 (<0.00001)
Non-genetic model (HP infection & smoking)	0.725 (0.703 - 0.747)	0.07756 (<0.00001)
HP infection model	0.703 (0.680 - 0.726)	0.06501 (<0.00001)
Smoking model	0.628 (0.603 - 0.652)	0.0088 (0.00008)
Inclusive model (rs2294008, HP infection, smoking)	0.742 (0.720 - 0.764)	-
p values for comparing three models	9.60 x 10 ⁻³⁴	

P values for comparing non-genetic model and inclusive model

3.40×10^{-4}

「プロテオーム解析に関する研究」

分担研究者 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

研究要旨

本年度は、われわれが開発した 2DICAL (2 Dimensional Image Converted Analysis of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry(LC/MS))によって発見された水酸化プロリン□-フィブリノーゲンタンパク質が膵がん発症危険因子となりうるかを検討するために、6万人コホートより発症した膵がん 170 症例と年齢、性別を一致させた対照 340 症例、計 510 例の血液サンプルの水酸化プロリン□-フィブリノーゲンタンパク質濃度をトランスジェニック社が開発したサンドイッチ ELISA 測定キットを用いて測定した。水酸化プロリン□-フィブリノーゲンタンパク質濃度の中・高値群は低値群と比較し、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が、前向き試験を含め、さらなる症例での検証が必要であることが結論された。

A. 研究目的

2DICAL は、複数のスペクトラムからなる液体クロマトグラフィー質量分析計(LCMS)データを、各スペクトラムの相関係数から LC の時間変動を補正して、質量電荷比(m/z)、保持時間(RT)の 2 軸を持つ平面に描出する手法を基本とする。この手法により同一ペプチド由来のピークが、強度(Intensity)を変数に持つ m/z 、RT 座標に変換され、複数サンプル間での無標識定量比較解析をショットガンプロテオミクスで可能にした。同時にサンプル(S)をもうひとつの次元ととらえ、同一 m/z のピークを RT、サンプルの 2 軸の平面で描出することができ、多数検体間の定量比較も可能としている。

この技術の開発により、LCMS で作成される膨大なピークデータから効率よくかつ定量的に多数検体解析が可能となり、ショットガンプロテオミクスにおける血中腫瘍マーカー開発が可能となった。本研究では、本技術を用いて発見された新規の膵がんマーカーである水酸化プロリン□-フィブリノーゲンタンパク質が膵がん発症危険因子となりうるかの検討を目的とする。

B. 研究方法

1) 膵がん発症危険因子の検討

約 6 万人のコホートより発症している 170 例の膵がん症例の発症前検体を、膵がん発症危険因子探索の対象とした。この血液検体に対して血液採取時期、年齢、性別を一致させたがん未発症 340 例を対照とした。

2) 腫瘍マーカー実用化に向けた技術開発

2DICAL で発見された腫瘍マーカー候補である水酸化プロリン□-フィブリノーゲンタンパク

質に対するサンドイッチアッセイ系で、多数症例の水酸化プロリン□-フィブリノーゲンタンパク質を測定した。

(倫理面への配慮)

国立がん研究センター、その他連携各施設の倫理委員会による審査で承認された方法で採取保管され、検体の個人情報が出ることが無いように匿名化が厳重に行われるように配慮した患者、健常者より得られた血漿検体を用いた。

C. 研究結果

1) 膵がん発症危険因子の検討

6万人コホートより発症した膵がん 170 症例と年齢、性別を一致させた対照 340 症例、計 510 例の血液サンプルの水酸化プロリン□-フィブリノーゲンタンパク質濃度測定を行った。膵がん発症までの時間で区分し、水酸化プロリン α -フィブリノーゲン濃度の低値群(0.23-76.0 $\mu\text{g/ml}$)、中等度群(76.1 - 151 $\mu\text{g/ml}$)、高値群(152 - 2178 $\mu\text{g/ml}$)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。

2) 腫瘍マーカー実用化に向けた技術開発

水酸化プロリン□-フィブリノーゲンタンパク質に対してトランスジェニック社が開発したサンドイッチ ELISA 測定キットを用いて、510 症例の血漿を測定した。

D. 考察

水酸化プロリン□-フィブリノーゲンタンパク質に対するサンドイッチ ELISA キットにより 510 例の血漿水酸化プロリン□-フィブリノー

ゲンタンパク質濃度を測定した。水酸化プロリン□-フィブリノーゲンタンパク質濃度が中等度群・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、膵がんの発症危険因子となりうる可能性が示唆されたが、前向き試験を含め、さらなる症例での検証が必要である。

E. 結論

サンドイッチ ELISA 測定キットを用いて、6万人コホートより発症した膵がん170症例と年齢、性別を一致させた対照340症例、計510例の血液サンプルの水酸化プロリン□-フィブリノーゲンタンパク質濃度測定を行った。

水酸化プロリン□-フィブリノーゲンタンパク質濃度の中・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が、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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

(2013年4月1日から2014年3月31日まで)

1. 論文発表

Taira, N., Yamaguchi, T., Kimura, J., Lu, Z. G., Fukuda, S., Higashiyama, S., Ono, M., Yoshida, K.

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, 717-22 (2014).

Matsukawa, S., Morita, K. I., Negishi, A., Harada, H., Nakajima, Y., Shimamoto, H., Tomioka, H., Tanaka, K., Ono, M., Yamada, T., Omura, K.

Galectin-7 as a potential predictive marker of chemo- and/or radio-therapy resistance in oral squamous cell carcinoma.

Cancer Med 3, 349-61 (2014).

Kobayashi, E., Satow, R., Ono, M., Masuda, M., Honda, K., Sakuma, T., Kawai, A., Morioka, H., Toyama, Y., Yamada, T.

MicroRNA expression and functional profiles of osteosarcoma.

Oncology 86, 94-103 (2014).

Masuda, M., Chen, W. Y., Miyanaga, A., Nakamura, Y., Kawasaki, K., Sakuma, T., Ono, M., Chen, C. L., Honda, K., Yamada, T.

Alternative mTOR signal activation in sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma

cells revealed by array-based pathway profiling.

Mol Cell Proteomics, Epub ahead of print (2014).

Takahashi, R. U., Takeshita, F., Honma, K., Ono, M., Kato, K., Ochiya, T.

Ribophorin II regulates breast tumor initiation and metastasis through the functional suppression of GSK3beta.

Scientific reports 3, 2474 (2013).

Singh, S. K., Maeda, K., Eid, M. M., Almofty, S. A., Ono, M., Pham, P., Goodman, M. F., Sakaguchi, N.

GANP regulates recruitment of AID to immunoglobulin variable regions by modulating transcription and nucleosome occupancy.

Nat Commun 4, 1830 (2013).

Makuuchi, Y., Honda, K., Osaka, Y., Kato, K., Kojima, T., Daiko, H., Igaki, H., Ito, Y., Hoshino, S., Tachibana, S., Watanabe, T., Furuta, K., Sekine, S., Umaki, T., Watabe, Y., Miura, N., Ono, M., Tsuchida, A., Yamada, T.

Soluble interleukin-6 receptor is a serum biomarker for the response of esophageal carcinoma to neoadjuvant chemoradiotherapy .

Cancer Sci 104, 1045-51 (2013).

2. 学会発表

61th Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics

平成25年6月13日 (Minneapolis Convention Center, Minneapolis, USA)

Ono M., Kamita M, Sakuma T, Banno M, Yamada T

Comparative phosphoproteomic analysis of 106 human liver tissues by 2-dimensional image-converted analysis of liquid chromatography and mass spectrometry (2DICAL)

Hupo 2013 12th Annual World Congress

平成25年9月16日 (パシフィコ横浜、横浜市)

Ono M., Kamita M, Sakuma T, Gomi M, Banno M, Yamada T

Phosphoproteomics of human liver cancer analyzed by 2DICAL

第72回日本癌学会学術総会

平成25年10月4日 (パシフィコ横浜、横浜)

市)

Ono M, Kamita M, Miyamoto Y, Otake Y,
Sakamoto T, Nakajima T, Matsuda T, Saito
Y, Yamada T

Proteomic approach to adenoma-carcinoma
sequence of colorectal cancer by 2DICAL

特許

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

別紙 3

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）（分担）研究報告書 平成 25 年度

血漿アポリポrotein AII アイソフォームを用いた膵がん診断法の開発

研究分担者 本田一文 国立がん研究センター研究所 ユニット長
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 主席研究員
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科 教授

研究要旨

早期膵がんを検出する血漿診断マーカーを開発し、膵がんの死亡率の改善を目的とする。アポリポrotein AII (apoAII) 2 量体中の C 末端に変化を受けた 5 種類のアイソフォームが膵がん血漿中に循環していることを先行研究で同定した。apoAII の 2 量体の片側鎖の C 末端からグルタミンが欠失したタイプのアイソフォーム (apoAII-2) の減弱が早期膵がんから認められ、質量分析用いた膵がん血漿解析により早期膵がん診断マーカーとしての有用性を明らかにしてきた。

本年度の研究では、apoAII-2 を定量的に測定するサンドウィッチ ELISA キットの開発を進め、早期膵がんを含む消化器がん、消化器疾患、健常者の血漿を用いて、臨床性能を評価した。ELISA キットの性能は、先行研究である質量分析で行われた結果と遜色がないことを証明し、臨床検査として実用化への道筋をつけた。

A. 研究目的

早期膵がんを低侵襲な方法で検出する血漿バイオマーカーは、膵がん死亡率を改善する。本研究の目的は、血漿・血清を用いて早期膵がんを診断するバイオマーカーを開発することである。

B. 倫理面の配慮

研究を進めるにあたり、国立がん研究センター及び東レ株式会社の倫理審査委員会の承認を受けた。

C. 研究結果

1) apoAII-2 に対するサンドウィッチ ELISA キットの構築

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ウィッチ ELISA 検査系を構築した (apoAII-2 サンドウィッチ ELISA)。

apoAII-2 サンドウィッチ ELISA を使用して、先行研究で質量分析を用いて測定した apoAII-2 の結果と比較した。200 例以上の健常者と膵がんを含む血漿検体を用いて、質量分析結果と ELISA による apoAII-2 の血漿中の量比を比較したが、相関係数は 0.82 を超え、ELISA の結果と質量分析の結果は、apoAII-2 を測定する上で同等な結果であった。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、apoAII-2 の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、apoAII-2 の血漿内濃度を絶対定量系で測定

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。

2) apoAII-2 サンドウィッチ ELISA キットの臨床性能

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、健常者の血漿における apoAII-2 濃度を、apoAII-2 ELISA キットで再測定した。

apoAII-2 ELISA キットの血漿内濃度は、先行研究で示された質量分析で測定された時の結果と同様に、膵がん患者で顕著な減少が認められ、膵がんと健常者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。

3) 【検体収集プロジェクト】

日本大学松戸歯学部から血液収集プロトコールに従い 85 例の健常者血漿・血清の登録がされた。

E. 結論

1) 質量分析に頼らない apoAII-2 の血漿濃度測定法を考案した。

2) 臨床検査に特化した測定系の考案により、膵がん診断を目指した検査系構築への道筋をつけた。

G. 研究発表
(論文)

1: Masuda M, Chen WY, Miyanaga A, Nakamura Y, Kawasaki K, Sakuma T, Ono M, Chen CL, Honda K, Yamada T. Alternative mTOR signal activation in sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma cells revealed by array-based pathway profiling. Mol Cell Proteomics. In press

2: Watabe Y, Mori T, Yoshimoto S, Nomura T, Shibahara T, Yamada T, Honda K. Copy number increase of ACTN4 is a prognostic indicator in salivary gland carcinoma. Cancer Med. 2014 Feb 27.

3: Kobayashi E, Satow R, Ono M, Masuda M, Honda K, Sakuma T, Kawai A, Morioka H, Toyama Y, Yamada T. MicroRNA Expression and Functional Profiles of Osteosarcoma. Oncology. 2014 Jan 18;86(2):94-103. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24457375.

4: Sakane A, Alamir Mahmoud Abdallah A, Nakano K, Honda K, Kitamura T, Imoto I, atsushita N, Sasaki T. Junctional Rab13-binding protein (JRAB) regulates cell preading via filamins. Genes Cells. 2013 Sep;18(9):810-22. doi:10.1111/gtc.12078. Epub 2013 Jul 25. PubMed PMID: 23890175.

5: Noro R, Honda K, Tsuta K, Ishii G, Maeshima AM, Miura N, Furuta K, Shibata T, Tsuda H, Ochiai A, Sakuma T, Nishijima N, Gemma A, Asamura H, Nagai K, Yamada T. Distinct outcome of stage I lung adenocarcinoma with ACTN4

cell motility geneamplification. Ann Oncol. 2013 Oct;24(10):2594-600. doi: 10.1093/annonc/mdt293. Epub 2013 Jul 30. PubMed PMID: 23899839.

6: Makuuchi Y, Honda K, Osaka Y, Kato K, Kojima T, Daiko H, Igaki H, Ito Y, Hoshino S, Tachibana S, Watanabe T, Furuta K, Sekine S, Umaki T, Watabe Y, Miura N, Ono M, Tsuchida A, Yamada T. Soluble interleukin-6 receptor is a serum biomarker for the response of esophageal carcinoma to neoadjuvant chemoradiotherapy. Cancer Sci. 2013 Aug;104(8):1045-51. doi: 10.1111/cas.12187. Epub 2013 Jun 13. PubMed PMID: 23648090.

7: Ohtomo R, Mori T, Shibata S, Tsuta K, Maeshima AM, Akazawa C, Watabe Y, Honda K, Yamada T, Yoshimoto S, Asai M, Okano H, Kanai Y, Tsuda H. SOX10 is a novel marker of acinus and intercalated duct differentiation in salivary gland tumors: a clue to the histogenesis for tumor diagnosis. Mod Pathol. 2013 Aug;26(8):1041-50. doi: 10.1038/modpathol.2013.54. Epub 2013 Apr 5. PubMed PMID: 23558573.

(特許)

1. 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

研究報告書

平成25年度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))
 分担研究報告書

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同定研究

分担研究課題名：臨床情報管理

研究分担者 浅村尚生 国立がん研究センター中央病院 呼吸器外科長

研究要旨 TR研究を推進するに当たっては、とくにその生物学的意義の検討において重要となる予後情報をどのように臨床側より提供されるべきかが問題となる。観察期間が長期化しやすい比較的予後良好の早期症例に関してはなお一層、その点が重要となる。そのためには腫瘍の病理生物学的特性を加味した検討が必要である。

A. 研究目的

腫瘍学におけるTR研究推進に当たって、基礎研究側において結果の腫瘍学的意味づけの上で欠かせない臨床情報をどのように提供されるべきかについて検討を行う。

B. 研究方法

TR研究において、例えば、特定のバイオマーカーの生物学的意義について検討を行う場合には、予後情報との関連性をみるのが必須である。予後情報については、特に前向き研究の場合、収集すべき情報の特性についての検討が必要である。このような点を、生物統計学的な見地から検討を加えた。

C. 研究結果

比較的予後良好な早期がんを対象とする治療介入の臨床試験においては、全生存 overall survivalなどを主評価項目として第 相試験として比較検討されることが多い。バイオマーカーの意義を検証する際にも、比較的早期の症例を対象とすれば、同様に全生存を主評価項目とすることが求められる。全生存は、明確に事象の発生時を特定出来る長所を有する反面、短所として、長期の観察期間が必要とされること、腫瘍に関連しない他病死が多いがん腫ではその意義が曖昧となることの欠点が挙げられる。

D. 考察

特に、バイオマーカーの生物学的意義を討していく場合、長期の観察期間は大き短所となるため、信頼性は高くてもこのような予後情報は研究成果の早期のフィードバックという観点から問題が多い。全生存の surrogate としては 無病生存 disease

free survival といった指標も用いることが出来る。この場合、全生存に比較するとより早期に結論を得ることは出来る一方、事象の発生時、すなわち、生存期間が観察方法によって影響を受けやすい、あるいは再発後の後治療に対する反応によって、全生存と結果が乖離するなどの欠点も指摘される。このようなことから、TR研究に適した予後情報は、対象とする腫瘍の病理生物学的な特性を基盤とした選択と、研究結果公表までの期間の短縮といった両側面からの多重な視点が必要である。

E. 結論

TR研究においては、バイオマーカーの予後予測因子としての検証においては、予後情報との関連性の検討が不可欠ではあるけれども、全生存などの長期観察が必要となるパラメータはその妥当性を腫瘍の病理学的な特性とのかねあいから、評価項目としての妥当性が検討されなければならない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Asamura H, Hishida T, Suzuki K, Koike T, Nakamura K, Kusumoto M, Nagai K, Tada H, Mitsudomi T, Tsuboi M, Shibata T, Fukuda H; Japan Clinical Oncology Group Lung Cancer Surgical Study Group. Radiographically determined noninvasive adenocarcinoma of the lung: Survival outcomes of Japan Clinical Oncology Group 0201. J Thorac Cardiovasc Surg 2013;146(1):24-30.

膵がんバイオマーカーの定量質量分析

研究分担者 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

研究要旨

本研究では、標的絶対定量プロテオミクス(QTAP)の手法を用いて、本研究事業分担者の本田一文博士らが見出した膵臓がんバイオマーカー候補タンパク質群の一斉絶対定量系を構築し、膵がん判別診断マーカーとしての評価を行うことを目的とした。本年度は昨年度までに、正常検体と比較して膵がん血漿検体で高値傾向が示されたバイオマーカー候補タンパク質2分子の有用性を評価するために、解析検体数を増加させて定量解析を行った。これらのマーカー候補分子について、膵がん以外の難治がんにおける応用性を評価した。さらにサンプル前処理のばらつきを最小限に抑え、かつ多検体の一斉定量解析を目的として、1日192検体の血漿前処理を可能とする自動分注ロボットのプログラム調整を実施し、マイクロLCを用いてLC-MS/MS分析を10 min以内に最適化することで、1,000例以上の検体の定量解析を実現した。その中の健常者38例、膵がん患者101例の解析結果から、昨年度同定した2つのマーカーの内、1つのマーカーがStage IIの早期から膵がん患者で有意に上昇していることが明らかとなり、早期膵がんマーカーとしての有用性が示唆された。本マーカーは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。

A. 研究目的

多層オミクス解析で同定されたがんバイオマーカー候補タンパク質の定量的検証は、タンパク質ごとに特異的抗体を必要とするELISA法に依存し、ハイスループットな複数分子の一斉定量は困難であった。昨年度までに、我々が開発した「標的絶対定量プロテオミクス(Quantitative Targeted Absolute Proteomics, QTAP)」の技術(Kamiie et al., *Pharm Res* 25:1469-1483(2008))を膵がんバイオマーカーの絶対定量解析に応用し、その有用性を評価することに成功した。しかし、本技術を多検体に対して適応する場合、サンプル前処理の高精度化及び高速化が課題として残された。そこで本研究では、QTAPに自動化及びハイスループット化技術を導入し、昨年度までに膵がん血漿検体で高値が認められたバイオマーカー候補タンパク質2分子について、1,000例以上の検体の定量解析によって有用性を評価するとともに、ほかの難治がんへの応用性の評価することを目的とした。

B. 研究方法

本研究では、昨年度までに同定した膵がんマーカー候補2分子に対して、血漿前処理を可能とする自動分注ロボットのプログラム調整を行い、定量質量分析を高速化した。さらに、確立した手法を用いて膵がん患者(38例)及び健常者(101例)を含む1000例以上の血漿(1 μ L以下)を定量解析した。

(倫理面への配慮)

説明文書に記載のある検体の凍結保存及び、タンパク質解析研究への活用に対し同意が得られている検体を対象として、国立がんセンター研究所腫瘍プロテオミクスプロジェクトにて解析終了後に凍結保存されている血液検体の余剰分に対し、解析を行った。血漿サンプルの解析は、東北大学薬学研究科及び国立がん研究センター研究所倫理委員会の承認のもと、匿名化し、個人への人権の対策をとった上で実施した。

C. 研究結果

スループット性の高いがんバイオマーカー候補定量法の確立

多検体の一斉高速定量解析を実現するために、1) 血漿前処理の自動化、2) LC-MS/MS定量分析の高速化を行った。具体的には、サンプル血漿前処理を連続的にかつ、ばらつきを最小限に抑えて自動化できるように自動分注ロボットのプログラム調整を行い、1日に192検体の前処理を可能とした。さらにLC-MS/MS定量解析については、マイクロLCを用いることで、通常は1検体1~2時間を要する分析時間を、1検体10 min以内に行えるよう最適化した。

確立した方法を用いて、膵がんマーカー候補分子の定量標的ペプチド3分子について絶対定量を行った結果、同一の市販血清をn=96で前処理及び定量分析した場合のば

らつき (%CV)は10%以内であった。以上から、高精度かつハイスループットな膵がんマーカー定量法を確立した。

膵臓がんバイオマーカー候補の多検体定量解析

で確立した方法を用い、膵臓がん患者(38例)及び健常者(101例)を含む1000例以上の血漿について、昨年までに同定した膵臓がんバイオマーカー候補の3つの定量標的ペプチドの絶対定量解析を行った。その結果、いずれの血漿中ペプチド存在量も膵がん由来血漿検体では、健常者に比べ有意に($p < 0.05$, student t-test)上昇していた。さらに、ROC(Receiver Operating Characteristic)解析の結果、これらの候補タンパク質については、膵がん識別診断マーカーとして有用であることが示された。特に、1分子についてはStage IIの早期から膵がん患者で有意に上昇していることが明らかとなったことから、早期膵がんマーカーとしての有用性が示唆された。本マーカーはその他にも肝がん(12例)、十二指腸癌(10例)、胆道がん(24例)等の癌でも健常者に比べて有意に上昇しており、膵臓がん以外の難治性がんに対しても有用なバイオマーカーとなる可能性が示された。

D. 考察

本研究では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一斉に絶対定量することで、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。

E. 結論

従来の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。昨年度同定したバイオマーカー候補タンパク質のうち、1つのマーカーが膵がんの初発段階Stage IIから上昇しており、早期診断マーカーとしての有用性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

Yoneyama T., Ohtsuki S., Ono M., Ohmine K., Uchida Y., Tachikawa M., Terasaki T., LC-MS/MS-based quantification of proline-hydroxylated α -fibrinogen in plasma for pancreatic cancer diagnosis. 日本薬物動態学会第28年会、2013年10月11日、東京

米山敏広、大槻純男、尾野雅哉、内田康雄、立川正憲、寺崎哲也:自動前処理ロボットと質量分析を用いた迅速な膵臓癌マーカー候補タンパク質の定量法開発、第52日本薬学会東北支部大会、2013年、10月20日、仙台

寺崎哲也:定量的標的絶対プロテオミクスに基づく癌化学療法の新展開(特別講演)、公益社団法人・日本薬剤学会主催 APSTJ WG 2025 シンポジウム「バイオとナノが拓く医療イノベーション」、2013年12月13日、東京

米山敏広、大槻純男、尾野雅哉、内田康雄、立川正憲、寺崎哲也:前処理自動化と質量分析を組み合わせたハイスループットMRM法の開発、日本薬学会第134年会、2014年3月28日、熊本

Ohtsuki S.: Metabolomics-like proteomics: quantitative targeted proteomics for diseases and pharmacokinetics. Indo-US Symposium on Mass Spectrometry Based Metabolomics in Disease Biology, Trivandrum, India, 23-24 Jan, 2014

- #### G. 知的財産権の出願・登録状況
- (予定を含む。)なし

膵臓がん患者における血清メタボローム解析

研究分担者 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

研究要旨

本分担研究では、質量分析計を用いて、膵臓がん患者における血清メタボローム解析を実施し、感度の高く、かつ、早期発見可能なバイオマーカーを探索した。

A．研究目的

本分担研究では、膵臓がん患者、ならびに、健常者の血清中脂溶性代謝物（脂質代謝物）を、液体クロマトグラフ質量分析計を用いて分析し、膵臓がんに対する新規バイオマーカー候補を見出すことを目的とした。

B．研究方法

神戸大学医学部附属病院、あるいは、関連病院にて、膵臓がん患者と健常者の血清を収集した。血清からメタノールを用いて脂質、ならびに、脂溶性代謝物（脂質代謝物）を抽出し、液体クロマトグラフ質量分析計による脂質代謝物メタボローム解析を実施した。

（倫理面への配慮）

血清収集の際、文書によるインフォームド・コンセントを行い、承諾を得た。

C．研究結果

平成25年度は、平成24年度に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、膵臓がん患者の血清中脂溶性代謝物（脂質代謝物）を分析した。はじめに、ヒト血清分析において、209種類の代謝物が安定に検出できることを確認した。続いて、これらの血清中脂溶性代謝物（脂質代謝物）について、膵臓がん患者35名、ならびに、健常者35名の血清中脂溶性代謝物（脂質代謝物）を分析し、膵臓がん患者におけるバイオマーカー探索を実施した。膵臓がん患者と健常者の血清中代謝物レベルの変動について統計学的評価を行い、その結果、膵臓がん患者では、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が増加することを確認した。

D．考察

本研究により、いくつかの血清中脂溶性代謝物（脂質代謝物）が、膵臓がん患者の発見に有用である可能性が示された。すなわち、今回、確認できた有意に変動する脂溶性代謝物（脂質代謝物）は、膵臓がんマーカー候補として考えられる。今後、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との比較も含めて厳格な検証試

験を行う必要がある。このような厳格な評価により、代謝物バイオマーカー候補が発見されれば、その対象代謝物の分析システムのオートメーション化なども検討し、実用化に向けた研究・開発へと進展していきける可能性がある。また、膵臓がんの場合、特に、早期の段階での発見が重要であるが、早期すい臓がん患者血清の収集は、困難を極め、収集検体数は他のステージと比較して少なかった。そのため、今後は、多施設共同研究などを行うことで、早期すい臓がん患者血清の収集を行い、早期すい臓がんに対する検証も重要である。

E．結論

平成25年度は、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によって、膵臓がん患者に特異的な変化を示す血清脂溶性代謝物（脂質代謝物）を新たに明らかにできた。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、脂溶性代謝物（脂質代謝物）を分析ターゲットとした場合でも、膵臓がん患者を発見できる可能性を持つ有用な方法であることが確認できた。今後、ステージ別での評価や他施設検体での検証試験など、さらに詳細な検討も必要であるが、血清メタボロミクスは、膵臓がん患者を発見できるスクリーニング法となることが期待される。

F．健康危険情報

特になし

G．研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

- 1) Kobayashi T. et al., Serum metabolomics as the diagnostic application for early diagnosis of pancreatic cancer. Orlando, USA. AGA-DDW2013. 2013.5.18-21.
- 2) 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
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし

3. その他
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（研究事業）
（分担）研究報告書
水酸化プロリン修飾フィブリノーゲン の測定キット開発に関する研究
研究分担者： 宮本 顕友 株式会社トランスジェニック
品川 真吾 同上

研究要旨

ヒトフィブリノーゲン の水酸化プロリン修飾部位を認識する抗体を用いて構築したサンドイッチ ELISA 測定キットをコホート研究サンプルを用いた測定に向けて作製し、分担研究者へ提供した。

A. 研究目的

ヒト水酸化プロリン修飾フィブリノーゲン [HP-FGA]とがん疾患との相関を検討する目的で使用する測定 ELISA キットの作製と提供

B. 研究方法

膵がん症例 170 検体、対照症例 340 検体の測定を行う目的で、ヒト水酸化プロリン修飾フィブリノーゲン 測定 ELISA キットを作製した。[分担研究報告：プロテオーム解析(尾野)の項を参照]

C. 研究結果

結果、膵がんの早期診断が可能な有意差は認められなかった。また、詳細な（因子年齢、性別、地域差、喫煙、飲酒、糖尿病、運動）などでスクリーニングをかけたが関連性について有意な差は見いだされなかった。

D. 考察

現段階で膵がんの早期診断に関する有効なデータは得られていない。一方、本ターゲットは研究用試薬としての販売を開始[図]しており、更なる知見の収集と将来的な診断薬化を目指し、今後も臨床検体の測定を継続する。

図：HP-FGA 測定用キット



E. 結論

ヒト血漿中 HP-FGA を特異的に測定可能なサンドイッチ ELISA キットの構築および製品化に至り、研究を推し進める上での有効なツールとした。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

特記事項無し

2. 学会発表

特記事項無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

発明の名称：「酸化修飾タンパク質またはポリペプチドに対する高特異性モノクローナル抗体」
発明者：能勢博、橋口朋代、尾野雅哉、山田哲司、廣橋説雄

特許日：2009 年 6 月 5 日

特許番号：第 4319700 号

特許権者：株式会社トランスジェニック、国立がん研究センター総長

2. 実用新案登録

特記事項無し

3. その他

特記事項無し

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
緒方広子、 土屋直人	血中エクソソーム中の microRNAによるがんの 診断	落谷孝広	細胞工学	学研メディカル 秀潤社	東京	2013	85-90

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Saeki N, <u>Yoshida T</u> , et al.	Genetic factors related to gastric cancer susceptibility identified using a genome-wide association study	Cancer Sci.	104	1-8	2013
Fujita T, <u>Yoshida T</u> , 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
Takahashi H, <u>Yoshida T</u> , 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.	116(6)	768-773	2013
Takahashi H, <u>Yoshida T</u> , et al.	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
Udagawa T, <u>Yoshida T</u> , 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
Oike T, <u>Kohno T</u> , et al.	A synthetic lethality-based strategy to treat cancers harboring a genetic deficiency in the chromatin remodeling factor BRG1	Cancer Res.	73	5508-5518	2013
<u>Kohno T</u> , et al.	RET fusion gene: translation to personalized lung cancer therapy	Cancer Sci.	104	1396-1400	2013
Suzuki T, <u>Kohno T</u> , et al.	Regulatory nexus of synthesis and degradation deciphers cellular Nrf2 expression levels	Mol Cell Biol.	33	2402-2412	2013

Mizukami T, <u>Kohno T</u> , et al.	Molecular mechanisms underlying oncogenic RET fusion in lung adenocarcinoma	J Thoracic Oncol.	9	622-630	2014
Ogata-Kawata H, <u>Tsuchiya T</u> , et al.	Circulating exosomal miRNAs as biomarkers of colon cancer	Plos One.	9(4)	e92921	2014
Zheng W, <u>Iwasaki M</u> , 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.
Shi J, <u>Iwasaki M</u> , et al.	New breast cancer risk variant discovered at 10q25 in East Asian women	Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.	22	1297-1303	2013
Pandey JP, <u>Iwasaki M</u> , et al.	IGKC and FcgammaR genotypes and humoral immunity to HER2 in breast cancer	Immunobiology	219	113-117	2014
Kuchiba A, <u>Iwasaki M</u> , 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)
<u>Ito H</u> , et al.	Time to first cigarette and lung cancer risk in Japan	Ann Oncol.	24(11)	2870-2875	2013
Matsuo K, <u>Ito H</u> , 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
Pelucchi C, <u>Ito H</u> , et al.	The stomach cancer pooling (StoP) project: study design and presentation	Eur J Cancer Prev.			2014
Honda K, <u>Ono M</u> , et al.	Proteomic Approaches to the Discovery of Cancer Biomarkers for Early Detection and Personalized Medicine	Jpn J Clin Oncol.	43	103-109	2013
Nakano T, <u>Ono M</u> , et al.	ADP-ribosylation of guanosine by SCO5461 protein secreted from Streptomyces coelicolor	Toxicon	63	55-63	2013
Makuuchi Y, <u>Ono M</u> , 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

Singh S K, <u>Ono M</u> , et al.	GANP regulates recruitment of AID to immunoglobulin variable regions by modulating transcription and nucleosome occupancy	Nat Commun	4	1830	2013
Takahashi R, <u>Ono M</u> , et al.	Ribophorin II regulates breast tumor initiation and metastasis through the functional suppression of GSK3beta	Scientific reports	3	2474	2013
Yoneyama T, <u>Ono M</u> , 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
Masuda M, <u>Ono M</u> , et al.	Alternative mTOR signal activation in sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma cells revealed by array-based pathway profiling	Mol Cell Proteomics		Epub ahead of print	2014
Kobayashi E, <u>Ono M</u> .et al.	MicroRNA expression and functional profiles of osteosarcoma	Oncology	86	94-103	2014
Matsukawa S, <u>Ono M</u> .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
Taira N, <u>Ono M</u> , 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
Miyanaga A, <u>Honda K</u> , 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
Noro R, <u>Honda K</u> , et al.	Distinct outcome of stage I lung adenocarcinoma with ACTN4 cell motility gene amplification	Ann Oncol.	24(10)	2594-2600.	2013
Watabe Y, <u>Honda K</u> , et al.	Copy number increase of ACTN4 is a prognostic indicator in salivary gland carcinoma	Cancer Med.		10.1002/cam4.214.	

<u>Asamura H, et al.</u>	Radiographically determined noninvasive adenocarcinoma of the lung: Survival outcomes of Japan Clinical Oncology Group 0201	J Thorac Cardiovasc Surg	146(1)	24-30	2013
<u>Kobayashi T, Yoshida M, et al.</u>	A novel serum metabolomics-based diagnostic approach to pancreatic cancer	Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention	22(4)	571-579	2013