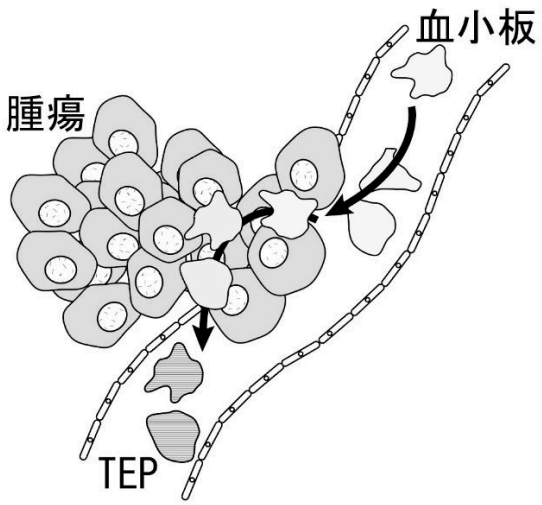
176　膵癌タイプ分類を可能とするTEPの臨床応用	園原　史訓

【目的】膵癌は早期発見が困難で局所進行した状態や遠隔転移を伴う状態で診断されることが多い。さらに外科的根治術単独での長期治療成績は満足できるものではなく、術後の再発・転移も高率である。したがって、膵癌の治療成績向上には、化学療法・放射線療法・手術治療等を組み合わせた集学的治療が不可欠である。当教室ではこれまでに上皮間葉転換（EMT）が膵癌の浸潤・転移メカニズムにおいて重要な鍵となることを報告してきた。また、過去の豊富な臨床経験から、膵癌は「局所進展タイプ」と「遠隔転移タイプ」に二分されると考え、各々のタイプに応じた治療が求められることから、EMT を膵癌のタイプ別分類に利用することを着想した。膵癌は手術以外の組織採取が必ずしも容易ではなく、体液を用いたより侵襲の少ない検査が切望されている。近年、癌細胞との相互作用を有し、EMT にも関連するとされる血小板（tumor-educated platelets : TEP）が脚光を浴びており、本研究では TEP に含まれる核酸分子の網羅的解析を行い、膵癌のタイプ別分類に有用な TEP 関連バイオマーカーを開発し、難治性膵癌に対する個別化集学的治療に貢献することを目的としている。

【方法】膵疾患に対して手術を中心とした集学的治療の予定となった患者から術前採血検体を収集し、血小板を採取した。1. 遠心処理を行い、全血から血小板以外の血球を除去し、血小板ペレットとして保存可能な状態で処理した。2. テストサンプルにより、血小板に含まれる mRNA の網羅的解析を mRNA-seq により行った。

【結果】血小板中の RNA を網羅的に解析するため、high-throughput RNA sequencing を行った。まず、集学的治療を受ける予定である膵癌患者から採取した血液検体より、遠心処理で血小板ペレットを抽出し、そこから total RNA を抽出した。まずテストサンプルとして 4 例の血小板由来 total RNA を用い、Agilent 2100 バイオアナライザを用いた quality check を行った。quality check の結果を基に、Nugen kit によるライブラリ調製を行い、quality check を行った 4 例のテストサンプルに対して DNBseq を用いた網羅的 mRNA-seq を行った。得られたシーケンス情報はフィルタリング処理され、アダプター配列、コンタミネーションおよび低品質の配列情報は除外された。データフィルタリングの後のシーケンス配列統計学的情報から、血小板から充分な mRNA-seq 情報（6G リード数以上）が得られることが確認され、さらに症例を拡張し、膵癌 14 例、IPMN 5 例、NET 3 例、胆管癌 3 例、SPN1 例および、疾患のない healthy volunteer 4 例の合計 30 例について上記同様の手法で血小板中 mRNA-seq 解析を実施した。

Tumor-educated platelets: TEP の概念図



176. 膵癌タイプ分類を可能とするTEPの臨床応用

園原　史訓

名古屋大学 医学部附属病院 消化器外科 2

Key words：膵癌，tumor educated platelet，上皮間葉転換，非侵襲的バイオマーカー

緒　言

膵癌の 5 年生存率は未だ 15%に満たず、極めて予後不良である。膵癌に対して唯一根治が望める治療は外科的切除であるが、切除例の 5 年生存率も 20～40%と満足できるものではなく、局所治療としての手術だけでは膵癌の治療成績向上は不可能である。また、膵癌は組織内の不均一性（heterogeneity）が強く、炎症細胞浸潤や間質組織量も個々の腫瘍で大きく異なる。これらの背景から、膵癌の臨床的特徴も多様性に富み、どの膵癌に対しても一様な治療では予後改善のためには不十分である。これまでの当教室での臨床経験から、膵癌の術後進行再発形式は「局所進展タイプ」と「遠隔転移タイプ」に二分されると考えている。現在主流である術前治療のうち、化学療法は遠隔転移も含む全身に対する腫瘍制御を目的としているが、化学放射線療法は局所制御により重点が置かれている。したがって、それぞれの集学的治療の性質が異なることから膵癌の進展タイプに応じた治療選択が個々の症例に応じて適切に選択されることが膵癌の予後改善に必要不可欠である。

これまでに様々な癌の上皮間葉転換（epithelial to mesenchymal transition：EMT）が積極的に研究されてきている。EMT は細胞が上皮の性質を失い、間葉としての性質を新たに得るメカニズムであるが、癌の浸潤・転移において極めて重要である。これまで当教室では、消化器癌における EMT の臨床的意義を報告してきた［1，2］。これらの研究成果より、消化器癌は EMT status（上皮系腫瘍か間葉系腫瘍か）により分類可能で、間葉系腫瘍は予後不良であることを見出した。また、膵癌の発癌・進展に関わる遺伝子の中で、TGF-βシグナル伝達に関与する *SMAD4* の発現が抑制されている腫瘍は遠隔転移を生じやすく、EMT status とも強い相関を認めることを報告した［3］。さらに、EMT status の強力な調節因子でもある LOXL2 が膵癌の予後と関連することも最近の研究で明らかにした［4］。

解剖学的に組織採取が困難である膵癌のバイオマーカーについて、血液などによる非侵襲的マーカーが切望されてきた。さまざまな癌種において、血中に分泌される分子を利用する腫瘍マーカー検査（CEA、CA19-9 など）は日常臨床で広く普及し、陽性例においては癌の進行や治療効果を知るための重要な検査である。しかし、癌の早期診断や生物学的特性の評価を目的とする検査としては不十分である。近年は腫瘍から血中に分泌される核酸を利用する試みもされており、我々も膵癌、食道癌において血液中の micro RNA および血液中エクソソーム由来の micro RNA の解析による生物学的特性を報告した［5］。

血小板は腫瘍からタンパク質や RNA 分子を取り込むことが最近の研究で明らかになり、さらに腫瘍の増殖や転移にも関与する可能性も指摘されている。ある種の癌細胞は血小板凝集を惹起し、次のような機序で癌の増殖や転移を促進すると考えられている［6］。1. 活性化血小板から放出された TGF-βにより、上皮系の癌細胞に EMT が生じることで浸潤能が亢進する。2. 血流中の活性化血小板が癌細胞に粘着し、ずり応力や免疫細胞から癌細胞が保護される。3. 血管外浸潤の足場となる。4. 活性化血小板から放出された血管新生因子や増殖因子が、腫瘍血管新生や癌細胞の増殖を促進する。つまり、循環血漿中に多量に存在する血小板は癌組織と相互に作用し、性質の異なる癌においては腫瘍によって影響を受けた血小板も異なる分子的特徴を持つことになると考えられる。最近、この tumor-educated platelets（TEP）を癌の診断に応用したと報告されており、担癌患者においても EMT status を含めた癌の性質を反映する鏡となる可能性が示されてきている［7］。また、血小板は血液中に多量に含まれるため、これまで積極的に行われている循環血漿中の遊離癌細胞を用いた癌のタイプ診断よりも高い精度を得られる可能性がある。

本研究では、膵癌患者から採取された採血検体を用い、TEP 中の網羅的遺伝子解析を行うことで腫瘍特異的かつ、局所進展タイプの膵癌および遠隔転移を有する膵癌それぞれに特徴的な変化を抽出し、EMT status との関連を活用した新たな TEM 関連バイオマーカーを開発し、非侵襲的に膵癌術前タイプ別分類を可能とすることを最終的な目標とした。

方法と結果

1. 膵切除症例からの術前血小板検体採取

当科で膵癌をはじめとする膵疾患に対して手術を含む集学的治療の予定となった患者から以下の手順で多血小板血漿および血小板ペレットを抽出した。

1) EDTA 2K 添加採血管 5mL 容量２本に血液を採取し、室温・800 RPM、20 分で遠心して多血小板血漿（platelet rich plasma：PRP）として上澄みを回収した。
2) PRP を 1.5 mL チューブに分注し、室温・400 g、20 分で遠心して上清を破棄し、0.8% EDTA 2K 添加 PBS 1,000μL を加え、充分に撹拌後、室温・900 g・5 分遠心を行った。
3) 遠心後の上清を破棄し、再度 0.8% EDTA 2K 添加 PBS 1,000μL を加え、充分に撹拌後、室温・900 g・5 分遠心を行った。
4) 上清を破棄し、得られた血小板ペレットは EDTA 非添加 PBS 100μL を加え、撹拌・スピンダウンした後に－80℃で保存した。

上記課程で得られた血小板の鏡見像は以下の図１のようになった。

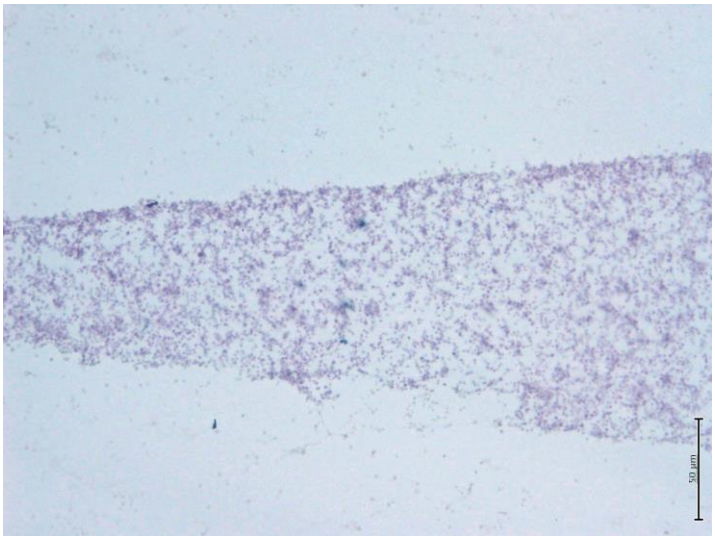


図 1. 患者血液由来血小板ペレット鏡見像
20 倍、スケールバー：50μm。

2. 血小板に含まれる RNA の quality check

血小板中の RNA を網羅的に解析するため、high-throughput RNA sequencing を行った。

まず 4 例のテストサンプルに対して Agilent 2100 バイオアナライザ（Agilent、CA、USA）を用いた quality check を行ったところ以下の表の通りであった（表 1）。Quality check の結果を基に、Nugen kit によるライブラリ調製を行った後、RNA-seq を用いた解析を行うこととした。

表 1. テストサンプルに対する quality check の結果

No.	Sample Name	Sample Number	Tissue Name	Tissue Number	Tube No.	Concen-tration(ng/μL)	Volume(μL)	Total Mass(μg)	RIN	28S/18S	Library Type	Test Result	Remark
1	1B	HKYR19106643_B	1	T8521910000891	1	0.139	25	0.0035	2.4	0	BGISEQ-500 Transcriptome	N/A	
2	2B	HKYR19106644_B	2	T8521910000892	1	0.156	25	0.0039	2.4	0	BGISEQ-500 Transcriptome	N/A	
3	3B	HKYR19106645_B	3	T8521910000893	1	0.094	25	0.0024	2.6	0	BGISEQ-500 Transcriptome	N/A	
4	7B	HKYR19106646_B	7	T8521910000894	1	0.088	25	0.0022	2.6	0	BGISEQ-500 Transcriptome	N/A	

RIN：RNA Integrity Number

3. 血小板 RNA に対する網羅的 RNA-sequencing 解析

1）quality check を行った 4 例のテストサンプルに対して DNBseq（BGI、Beijing、China）を用いた mRNA-seq を行った（PE100）。得られたシーケンス情報はフィルタリングされ、アダプター配列、コンタミネーションおよび低品質の配列情報は除外された。データフィルタリングの後のシーケンス情報は以下の通りであり、いずれのサンプルからも 6G reads 以上のデータを得ることが可能であった（表 2）。

表 2. 血小板 mRNA-seq リード情報フィルタリング処理後の結果

Sample Name	Clean Reads	Clean bases	Read length (bp)	Q20(%)	GC(%)
1B	71,052,082	7,105,208,200	100	97.96%	42.88%
2B	60,805,832	6,080,583,200	100	97.40%	42.72%
3B	68,215,454	6,821,545,400	100	97.73%	42.66%
7B	71,732,982	7,173,298,200	100	97.79%	42.56%

2）血小板由来 RNA から充分な mRNA-seq 情報が得られることが確認され、さらに症例を拡張し、膵癌 14 例、IPMN 5 例、NET 3 例、胆管癌 3 例、SPN 1 例および、疾患のない healthy volunteer 4 例の合計 30 例について上記同様の手法で血小板中 mRNA-seq 解析を実施中である（2020 年 4 月 1 日現在）。

考　察

癌と EMT との関係はこれまでに多様な癌種に対して積極的に行われている。癌の浸潤・転移に重要な役割を果たすことはよく理解されるようになってきているが、その詳細な分子生物学的機構や臨床病理学的特徴との関連は未だ不明な点も多く、継続的な研究が必要である。当教室でも EMT に以前から注目し、消化器癌における EMT に関連した分子生物学的機構や臨床検体における発現検討などに取り組んできており、研究成果を報告している［8，9］。さらに最近、当教室において膵癌における LOX ファミリーの発現状況と予後への関与、膵癌 EMT への関わりを検討して報告した［4］。また、TEP については比較的新しい概念であり、最も積極的に臨床的な意義を研究発信しているのはオランダのグループである［7，10］。彼らは様々な癌と正常者の血中から血小板を抽出し、その中に含まれる RNA を high throughput sequencer で解析し、RNA の発現パターンから癌の存在を予測できる手法を開発した。彼らの方法によれば 96%の正確さで癌の存在と TEP 発現が相関するとし、新たなリキッドバイオマーカーの可能性を示している。しかし、膵癌を始めとする個々の消化器癌に関するバイオマーカーについて行われた研究は未だない。本研究は個々の膵癌の臨床的特徴に大いに関与していると考えられる EMT status を循環血液中に多量に含まれる血小板中の TEP を用いることで、癌の性質診断に利用することを目的とした。

これまでの膵癌をめぐる研究では、膵癌の進展およびそのタイプ別分類に重要と考えられる EMT status と、EMT にも関連し、癌そのものではないものの、血漿中に多量に存在し、癌との相互作用によって癌のタイプで異なる特徴を

持つと考えられる“TEP 関連 RNA”に焦点をおいたものは認められない。また、消化器癌の中でも浸潤・転移能の極めて高い膵癌においては、非侵襲的バイオマーカーとしての TEP 関連 RNA を活用し、EMT の見地から治療に有用な診断法の確立を目指したり、治療経過中のモニタリングとして利用したりすることは臨床的有用性が高いと考えられる。血液サンプルから難治性膵癌のタイプ別分類法が可能となれば、膵癌に対する至適集学的治療法を選択し、プレシジョン・メディシンを確立できるため、膵癌治療成績の飛躍的な向上に寄与する可能性がある。

本研究では、膵癌患者から採取された採血検体の遠心分離処理を行い、血小板が多く含まれる血漿（多血小板血漿：platelet-rich plasma）を分離した。さらに遠心処理し、血小板ペレットが抽出可能であることを確認した。膵関連手術を予定された膵癌を含む膵疾患患者から採取した血小板ペレットについて、mRNA-seq の解析を行ったが、今後はこの網羅的シーケンスデータをもとに膵癌特異的かつ、局所進展タイプおよび遠隔転移を有する膵癌それぞれに特徴的な変化を抽出してバイオマーカーパネル化することを検討している。このシーケンス解析によって抽出された RNA について、腫瘍の性質、予後や臨床病理学的因子と関係するものの特定を目指すため、膵癌細胞株を用いた該当分子により制御される miRNA の同定や、影響を受ける転写因子、タンパク質をコードする RNA についても検討し、細胞株を用いた機能解析を行う。最終的にはこの TEP 関連 RNA の非侵襲的バイオマーカーとしての可能性を探索し、膵癌の集学的治療を個別化するための臨床応用を検討する予定である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、名古屋大学大学院医学系研究科消化器外科学の小寺泰弘、山田豪、林真路、高見秀樹、猪川祥邦である。

文　献

1） Yamada S, Fuchs BC, Fujii T, Shimoyama Y, Sugimoto H, Nomoto S, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition predicts prognosis of pancreatic cancer. Surgery. 2013;154(5):946-54. Epub 2013/10/01. doi: 10.1016/j.surg.2013.05.004. PubMed PMID: 24075276.

2） Yamada S, Okumura N, Wei L, Fuchs BC, Fujii T, Sugimoto H, et al. Epithelial to mesenchymal transition is associated with shorter disease-free survival in hepatocellular carcinoma. Annals of surgical oncology. 2014;21(12):3882-90. Epub 2014/05/17. doi: 10.1245/s10434-014-3779-2. PubMed PMID: 24833103.

3） Yamada S, Fujii T, Shimoyama Y, Kanda M, Nakayama G, Sugimoto H, et al. SMAD4 expression predicts local spread and treatment failure in resected pancreatic cancer. Pancreas. 2015;44(4):660-4. Epub 2015/03/12. doi: 10.1097/mpa.0000000000000315. PubMed PMID: 25760429.

4） Tanaka N, Yamada S, Sonohara F, Suenaga M, Hayashi M, Takami H, et al. Clinical Implications of Lysyl Oxidase-Like Protein 2 Expression in Pancreatic Cancer. Scientific reports. 2018;8(1):9846. Epub 2018/07/01. doi: 10.1038/s41598-018-28253-9. PubMed PMID: 29959362; PubMed Central PMCID: PMCPMC6026164.

5） Niwa Y, Yamada S, Sonohara F, Kurimoto K, Hayashi M, Tashiro M, et al. Identification of a serum-based miRNA signature for response of esophageal squamous cell carcinoma to neoadjuvant chemotherapy. Journal of translational medicine. 2019;17(1):1. Epub 2019/01/04. doi: 10.1186/s12967-018-1762-6. PubMed PMID: 30602370; PubMed Central PMCID: PMCPMC6317218.

6） 井上 克. 血小板系　癌と血小板. Annual Review 血液. 2010;2010:168-75. PubMed PMID: 2010069625.

7） Best MG, Sol N, Kooi I, Tannous J, Westerman BA, Rustenburg F, et al. RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. Cancer cell. 2015;28(5):666-76. Epub 2015/11/04. doi: 10.1016/j.ccell.2015.09.018. PubMed PMID: 26525104; PubMed Central PMCID: PMCPMC4644263.

8) Ninomiya G, Yamada S, Hayashi M, Takeda S, Suenaga M, Takami H, et al. Significance of Lysyl oxidase-like 2 gene expression on the epithelial-mesenchymal status of hepatocellular carcinoma. Oncology reports. 2018;39(6):2664-72. Epub 2018/04/06. doi: 10.3892/or.2018.6349. PubMed PMID: 29620290.
9) Mashita N, Yamada S, Nakayama G, Tanaka C, Iwata N, Kanda M, et al. Epithelial to mesenchymal transition might be induced via CD44 isoform switching in colorectal cancer. Journal of surgical oncology. 2014;110(6):745-51. Epub 2014/07/01. doi: 10.1002/jso.23705. PubMed PMID: 24975268.
10) Best MG, Wesseling P, Wurdinger T. Tumor-Educated Platelets as a Noninvasive Biomarker Source for Cancer Detection and Progression Monitoring. Cancer research. 2018;78(13):3407-12. Epub 2018/06/21. doi: 10.1158/0008-5472.can-18-0887. PubMed PMID: 29921699.