

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業  
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) 血中反復配列 RNA の高感度測定による癌の早期診断と囲い込み法の開発  
(英語) Development of high sensitive procedure detecting repetitive RNA as a novel biomarker of pancreatic cancer
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東京大学 医学部附属病院 消化器内科  
特任臨床医 岸川 孝弘
- 所属 役職 氏名： (英語) Clinical staff, the Department of Gastroenterology, University of Tokyo  
Hospital, Takahiro Kishikawa
- 実施期間： 平成 28 年 9 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 血中反復配列 RNA の高感度測定による癌の早期診断と囲い込み法の開発  
開発課題名： (英語) Development of high sensitive procedure detecting repetitive RNA as a novel biomarker of pancreatic cancer
- 研究開発分担者 (日本語) 医学部附属病院 消化器内科 特任臨床医 岸川 孝弘
- 所属 役職 氏名： (英語) Clinical staff, the Department of Gastroenterology, University of Tokyo  
Hospital, Takahiro Kishikawa

## II. 成果の概要（総括研究報告）

近年は集学的治療の発展や分子標的薬、免疫チェックポイント阻害薬などの新規化学療法の登場により、がん全体の治療予後は改善傾向にある。しかしながら膵がんは、これらの新規治療薬にも反応性が乏しく、現状でも5年生存率が10%に満たない難治癌の代表である。またその罹患患者数は全世界的に増加傾向であり、日本では臓器別の年間死亡者数4位、米国では乳癌を抜いて3位に上昇している。膵癌の予後不良の原因として、多くの症例が診断時にすでに手術適応のない進行がんの状態であることが挙げられるが、現状では膵癌を早期に診断するバイオマーカーや一次スクリーニング施設で施行可能な画像診断法がまだ実用化に至っていない。近年、核酸やたんぱく質等の新規分子マーカー探索を可能にする種々の網羅的解析技術が急速に発展、普及し、多くの新規標的候補が研究段階にあるが、我々は今までの次世代シーケンス技術を用いた網羅的核酸解析では同定することができなかった反復配列 RNA と呼ばれるノンコーディング RNA に着目し、独自の検出法を用いた非侵襲的、かつ低コストな早期膵癌診断マーカーの開発に着手している。

我々が着目しているサテライト配列は染色体中心部近傍に集中して存在する反復配列の一種で、通常時はヘテロクロマチンを形成して強く転写が抑制されているが、がん組織ではこの抑制が外れて異常に発現している。我々はマウスのサテライト配列が発癌過程の早期から異常発現していること、またサテライト RNA の過剰発現によってランダムな突然変異率が上昇し易発癌性を示すという重要な分子生物学的意義を持つことを報告した (Kishikawa T et al. *Nat Commun.* 2016)。

我々はヒトのサテライト配列からの転写産物で、膵癌組織で特異的に高発現していることが報告されている HSATII RNA に注目し、これを血液中から非侵襲的に検出する手法の開発を試みた。しかしながら反復配列 RNA は同じ配列が一分子上に繰り返し並んでいるために primer を適切に設定することが困難であり、通常の核酸定量に用いるリアルタイム PCR 法では正確に定量することが困難であった。そこで、この問題点を克服するために Tandem Repeat Amplification by nuclease Protection (TRAP) 法を独自に確立した。この手法は反復配列 RNA の core unit に相補的な RNA probe を抽出 RNA とハイブリダイズさせ、他の RNA を一重鎖 RNA 選択的 RNA 分解酵素により消化することで core unit のみを抽出する手法である。この処理によって配列と長さの揃った core unit を濃縮することができるため、逆転写および PCR が可能となった。我々はさらに極小サンプルを正確に定量できる droplet digital PCR 法を用いることで、誤差の少ない定量結果を得ることができた。

この定量法を用いて、実際に患者血清からの HSATII RNA の検出を試みた。東京大学医学部附属病院に入院あるいは通院している膵癌、および対照群の患者から採取した血液を用いて、training set(対照群 20 例、膵癌群 20 例)、validation set(対照群 10 例、膵癌群 10 例、前癌病変群 10 例)を設定し血清中の HSATII RNA を定量した。その結果、両コホートにおいて癌患者では有意に HSATII RNA が上昇していることが示された。さらに年率 1%の割合で癌化すると言われ、前癌病変と見なされる膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) の患者群においても有意に対照群と鑑別できることが示された。IPMN 患者は現行の腫瘍マーカーである CA19-9 では全く検出できないため、早期膵癌、あるいは高リスク患者の囲い込みに有効なバイオマーカーである可能性が示された (Kishikawa et al. *JCI insight* 2016)。

我々はさらに現行の RNA シーケンスでは解析対象にすらなっていなかった反復配列領域を探索することで、より鋭敏な反復配列 RNA マーカーを導出できるのではないかと考え、反復配列のみを対象にした次世代シーケンス解析を行い、膵癌組織で特異的に高発現している新規の配列候補を複数同定した。これらの候補についても HSATII RNA と同様に TRAP 法による濃縮、定量が可能であることから、HSATII RNA との検出力の比較、あるいは相加的定量による診断能の向上が規定できると考える。

Recently, prognosis of cancer as a whole is improving by the development of collective treatment and the appearance of new medicines such as molecular target drugs and immune checkpoint inhibitors. However, pancreatic cancer is still one of the most intractable diseases which is resistant to these new drugs. Moreover, the number of patients is on increase globally and the number of annual death related to pancreatic cancer is the fourth leading cause in Japan and the third in the US. We think the main reason of poor prognosis is that most of patients are diagnosed at advanced stage because there are no efficient biomarkers which can detect early stage of pancreatic cancer non-invasively and conveniently. Now, we focus on repetitive RNAs as a novel detecting marker of early stage of pancreatic cancer, which have not been analyzed by current high throughput sequence techniques due to their repetitive nature.

Satellite sequences are some subsets of repetitive non-coding arrays and located in tandem at near centromere region. They are strongly suppressed in transcription in normal circumstance. However, in cancer tissues, the expression is deregulated by currently unknown mechanism. We reported that mouse satellite RNA is aberrantly expressed in precancer stage tumor and its overexpression increases random mutation rate and accelerates oncogenic process (Kishikawa et al. *Nat commun.* 2016).

We tried to detect HSATII RNA in the sera of pancreatic cancer patients, which has been reported to specific aberrant expression in pancreatic cancer tissue compared with normal pancreatic tissue. However, the measurement with conventional real-time PCR procedure could not work precisely because PCR primers may bind to multiple sites of HSATII RNAs due to their repetitive nature. Therefore, we develop a new method named Tandem Repeat Amplification by nuclease Protection (TRAP) method. In this procedure, extracted RNAs are hybridized with RNA probes complementary to core unit of HSATII RNA followed by the treatment of RNase that digests only single stranded RNA. Then, only core unit RNA are condensed and aligned in same length which is suitable for RT-PCR. We further apply droplet digital PCR (ddPCR) to quantitate minute sample with smaller measurement error.

Using TRAP method followed by ddPCR, we measured HSATII RNA in the serum of patients. We set two cohort groups (training set and validation set) and showed that significantly higher level of HSATII RNA was detected in pancreatic cancer patients than control patients in both cohorts. Moreover, in the validation set, intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) group which is benign cystic tumor of pancreas and is regarded as pre-cancerous stage also showed significantly higher HSATII RNA levels than control. These results suggest that HSATII RNA can distinguish not only early stage cancer but also pre-cancer stage patients, which may be useful for a screening marker to pick up high risk patients of pancreatic cancer. (Kishikawa et al. *JCI insight* 2016).

Furthermore, to explore other higher sensitive repetitive sequence which had not been analyzed conventional RNA-seq, we performed high-throughput customized sequence dedicated to repetitive RNAs and found several candidates which specifically express in pancreatic cancer tissues.

### Ⅲ. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 2 件）

1. Kishikawa T, Otsuka M, Yoshikawa T, Ohno M, Ijichi H, and Koike K. Satellite RNAs promote pancreatic oncogenic process via the dysfunction of YBX1. Nat Commun.2016;7:13006 DOI: 10.1038/NCOMMS13006.
2. Kishikawa T, Otsuka M, Yoshikawa T, Ohno M, Yamamoto K, Yamamoto N, Kotani A, and Koike K. Quantitation of circulating satellite RNAs in pancreatic cancer patients. JCI Insight. 2016;1(8): e86646

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Establishment of highly sensitive method of repetitive RNAs in the serum as an early detecting marker of pancreatic cancer. Oral presentation, Takahiro Kishikawa, Fourth Annual US Japan Workshop on Cancer Biomarkers in Collaboration with NCI Early Detection Research Network. 2017/3/6, Tempe (USA)
2. 膵がんの早期診断を可能にする血中反復配列 RNA の高感度測定技術, 口頭, 岸川孝弘, 技術情報協会セミナー～がんの早期診断を可能にする最新のリキッドバイオプシー技術, 2016/11/11, 国内

#### (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み 該当なし

#### (4) 特許出願 該当なし