

# 膵発癌の早期段階におけるドライバー遺伝子と連動する発現 プロファイルの解析と血漿 cfRNA からの新規バイオマーカー探索

医療法人徳洲会 札幌東徳洲会病院 医学研究所 ゲノム診断研究部

小野 裕介

## I 要 旨

リキッドバイオプシーは、がんのゲノム異常を俯瞰的にプロファイリングする技術として期待されるが、現状では早期癌の発見には好成績をあげられてはいない。我々は、そのなかでも特に早期発見が難しい膵癌において早くから遊離核酸中のドライバー遺伝子の高感度検出系の開発に取り組んできたが、DNA 変異情報のみでの低い腫瘍検出率は課題とされた。これまでに我々は膵癌の前駆病変の一つである膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) におけるドライバー遺伝子の *KRAS* および *GNAS* 変異バランスが膵発癌経路とリンクすることを発見し、膵発癌のリスク評価の可能性を提示した。

本研究では、その情報をもとに、ドライバー遺伝子と連動する RNA をターゲットとする新しいバイオマーカーの探索を行った。IPMN の分類におけるキーとなる遺伝子変異を有する *KRAS*/*GNAS* 変異細胞株の作成をゲノム編集により行った。2 種類の膵管上皮細胞由来細胞株において *KRAS* 変異株、*GNAS* 変異株、*KRAS*/*GNAS* 変異株およびそれら遺伝子の野生型株を得た。現在は、ゲノム編集株を用いたトランスクリプトーム解析によりターゲットとなる RNA の探索を行っている。さらに *GNAS* 変異を有する IPMN 関連初代細胞についても上記変異セットの取得を目指している。

また、不安定な血漿遊離 mRNA の効果的な採取方法、およびデジタル PCR を用いた高感度の発現検出方法についても検討した。その結

果、血漿 RNA には大きく二つのフラグメントパターンが存在し、より短いフラグメントにおいて目的の RNA が存在することが示唆された。

今後は、これまでに得られたゲノム編集株を用いて IPMN に関与する *KRAS*、*GNAS* に存在するクロストークの詳細な解明を目指すとともに、リキッドバイオプシー標的としての有用性を評価する。本研究成果は、これまで実用化に乏しい血漿に存在する mRNA をターゲットとした経路変化に直接結びついた分子サブタイプに基づく精密医療への貢献が期待できる。

## II 目 的

がんゲノム医療時代を迎えた現在、その最も重要な課題の一つである早期診断においては、遺伝子解析技術の真価が発揮されることが期待される。

膵癌はその早期発見が現状で極めて難しい癌種とされているが、前駆病変の一つである膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) は比較的早期で発見することが可能である。膵癌病変の多くが *KRAS* 遺伝子変異を伴い発生するのに対し、IPMN では *KRAS* に加え *GNAS* 遺伝子 (GTP 結合タンパク質 *Gsa* サブユニット) がその発生におけるドライバー遺伝子であることが知られている。*GNAS* 遺伝子変異による IPMN 発症、およびその後の発癌過程においては特徴的な細胞内プロセスが稼働することが示唆されている。

一方で我々は膵癌の早期診断を念頭に置いたリキッドバイオプシーの開発に取り組んでいる。これまでに約200例の膵癌およびIPMN患者より血漿を得て、血中に存在する遊離DNA (cfDNA) における*KRAS*および*GNAS* 遺伝子変異の高感度検出による膵癌リスク評価系を構築した。しかし現状での遺伝子変異のみの検出による方法では早期癌の拾い上げの確実性には限界がある。リキッドバイオプシーの臨床的な有用性は、現在、進行癌に限定されている。

そこで本研究は*KRAS*、*GNAS* 遺伝子変異を有するIPMN症例に特異的な発現プロファイルの変化を検出することを目的として、血清から検出できる新規バイオマーカーの候補のターゲットを遊離RNA (cfRNA) に定めて探索を行う。基盤となる遊離核酸の遺伝子変異データに加え、組織内に存在する各病変の発現プロファイルを詳細に解析し、さらに症例の病理像・臨床データとの統合データを得ることにより、膵癌への悪性化を早期診断することが可能な先制医療への応用を目指す。

### 遺伝子変異が引き起こすRNAプロファイル →血中バイオマーカーとして利用

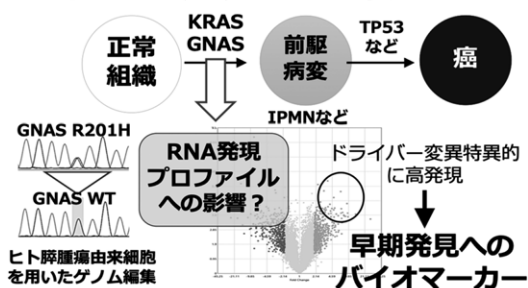


図1 本研究が目指すRNAバイオマーカー検出

### III 方法

*KRAS*、*GNAS* 変異を有するIPMN症例に特異的な発現プロファイルの変化を検出することを目的とし、血清から検出できるバイオマーカーの候補のターゲットを遊離RNAに定めて

下記の手順にて探索を行った。

#### 1) *KRAS*遺伝子変異を有するゲノム編集済細胞株を用いた網羅的発現解析

*KRAS*/*GNAS* 変異細胞株と、ゲノム編集により構築した同系統の*KRAS* 変異株または*GNAS* 変異株において、mRNA およびノンコーディングRNA (ncRNA) についての網羅的解析を行い、発現変動のあるRNAをバイオマーカーの候補として同定する。本研究においては膵管上皮細胞HPDE株、HPDE *KRAS* G12V株に対し、*GNAS* R201HまたはR201C、また不死化膵管上皮細胞hTERT-HPNE株に対し、*KRAS* G12Dと*GNAS* R201HまたはR201Cを、Neonエレクトロポレーションシステム (Thermo Fisher Scientific社) を用いてノックインにより導入した。

#### 2) 遊離RNAの単離に関する予備実験

遊離RNA (cfRNA) の単離・精製方法については現在までに確立された報告は乏しいことから、血漿由来cfRNAの抽出方法についてのバリデーションを行った。サンプルとしては、疑似検体として膵組織由来細胞 (KP4, PK1, KP2, Capan1) の培養上清に放出された遊離RNAとし、用手法 (Qiagen社 circulating NA kit) または、当ラボに導入されている自動核酸精製装置 (PSS社 magLEAD 12gC) を用い、精製した。ランダムプライマーを用いた逆転写を行い、Qubitを用いたRNA定量後、リアルタイムPCR (BioRad CFX96) およびデジタルPCR (BioRad QX200) に供した。

#### 3) 血液検体を用いた新規バイオマーカー候補の検出検討

候補となるRNA群について、IPMNの新規分類に基づいたバイオマーカーとしての有用性を評価するために、すでに取得・保存されている患者血液サンプル、およびコントロールとし

て本研究に登録されている健常人の血漿遊離 RNA を用い、方法 2) で検討したメソッドにより cfRNA を抽出し、定量後に存在量を比較した。

#### IV 結 果

##### 1) *KRAS*、*GNAS* 遺伝子変異を有するゲノム編集細胞株の取得

Neon エレクトロポレーションシステムによりノックインを行い、これまでに HPDE 株、HPDE *KRAS* G12V 株に対し、*GNAS* R201H または R201C を導入した、HPDE *GNAS* R201H または R201C、HPDE *KRAS* G12V/*GNAS* R201H また R201C のゲノム編集株を得た。また不死化膀胱上皮細胞 hTERT-HPNE 株に対し *GNAS* R201H または R201C 単独、および *KRAS* G12D と *GNAS* R201H または R201C の変異を導入したゲノム編集株をそれぞれ複数クローン取得した。ヘテロ型となるようゲノム編集は全てデジタル PCR による変異確認、シーケンスによる当該領域およびオフターゲットの可能性が高い 10 領域の確認を行った。ここまで得られたゲノム編集株、すなわち *KRAS* 変異株、*GNAS* 変異株、*KRAS*/*GNAS* 変異株およびそれら遺伝子の野生型株について、変異の有無による生育速度、細胞形態についての顕著な差は見られなかった。現在、これらの全ての細胞株を用いて、当ラボ保有の NGS である Ion GenestudioS5 を用いた RNA-seq による網羅的解析を行っており、本項目の最終目的であるバイオマーカーの候補となる発現変動のある RNA を解析している。

現在までに、その基盤データとして、ヒト膀胱癌由来の初代細胞 (950-5-BLK 細胞株) を用いた RNA-seq 解析データを得ており、*KRAS* 及び *GNAS* 遺伝子変異に連動した MUC ファミリー群を初めとする粘液産生、さらに両ドライバー遺伝子変異の拮抗に関わる経路を特定した

(Kawabata, Ono, 2022)。さらに共同研究者の高橋が膀胱癌において優位に発現が変化し、バイオマーカーとして期待される 3 種類の新規 lncRNA を特定した (Takahashi, 2020 他)。本研究期間では cfRNA の検出実験としてこれらの基盤データで得られた因子の mRNA、lncRNA の検出を目指し、方法 2)、3) の実験を行った。

##### 2) 遊離 RNA の単離に関する予備実験、3) 血液を用いた遊離 RNA の検出

血漿遊離 RNA を抽出、精製し、デジタル PCR によるターゲット RNA の検出を行なった。膀胱組織由来細胞の培養上清、および本研究に登録されている血漿を用いて遊離 RNA の精製検討を行った結果、PSS 社 magLEAD 12gC の精製装置を用い、MagDEA<sup>®</sup> Dx MV II キットを使用した時に最も収量が高かったため、以降の解析に用いた (データは示さない)。今回ターゲットとして検討したのは、膀胱癌において変動する lncRNA、また、我々が既にトランスクリプトーム解析で変動を確認した Notch 下流シグナルである HES family (*HES1*、*HES3*)、また遺伝子変異を発現増幅により DNA よりも効果的に捉えることを目的とした *KRAS* 遺伝子の mRNA、および内在性コントロールである GAPDH とした。その結果、デジタル PCR を用いることにより、発現が高い GAPDH および、図 2 に示した 2 種類の lncRNA、さらに *KRAS* においてある程度のコピー数の検出が見られた。また、血漿 cfRNA は大きく分けて 2 種類のフラグメントパターンが存在しており、200bp 以下のより短い断片が豊富に存在する cfRNA の方がデジタル PCR における検出量が多いという結果となった (図 2)。

また健常血液検体を用いた遊離 RNA の GAPDH と rRNA との比較結果を表 1 に示す。RNA の抽出、逆転写のうち 99% が rRNA であったことから、rRNA を事前に除去する ribo-

minusのような処理についても mRNA の効率的な補足には検討が必要であると考えられた。

現在、更なる高感度の検出を目指し、12 サイクルの pre-amplification による RNA の増幅、また高度に分解していると考えられる 50 bp 程度の断片化 RNA を効率よく捕捉できる磁気ビーズを用いた抽出条件を検討している。最終

的にはリキッドバイオプシーとしての臨床応用に展開することを目的として、方法 3) に従って、血液検体収集を進めており、高感度検出系の構築が完成した全ての患者検体について、cfDNA 変異解析による遺伝子変異パターンとそれに方向付けられた cfRNA の発現変化を統合的に解析する予定である。

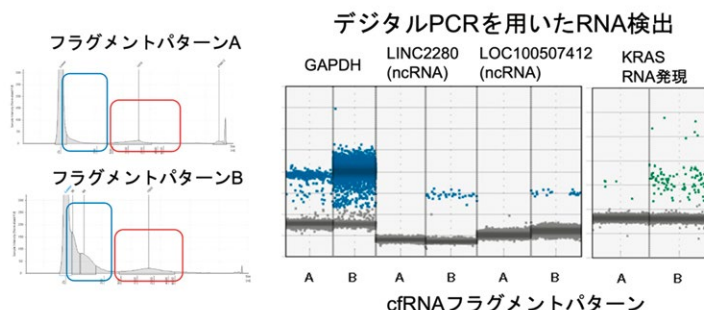


図 2 血中遊離RNAのフラグメントパターンとデジタルPCRによる検出検討結果

表 1 血漿より精製した遊離RNA中におけるデジタルPCR検出結果

SampleID	Concentration (copies/uL)		mRNA (%)	rRNA
	GAPDH	RNA45S5		
Du09-137-1	27.2	12,400	0.22	99.78
Du09-139-1	12.8	31,400	0.04	99.96
Du09-140-1	38	55,000	0.07	99.93
Du05-903-1	8.69	35,400	0.02	99.98
Du05-904-1	28.7	358,300	0.01	99.99

## V 考 察

我々はこれまで IPMN はその発生段階で二つのドライバー遺伝子 *KRAS* 及び *GNAS* が重要な役割を担うことを示しており、*GNAS* 変異は *KRAS* シグナルと協調して IPMN の発生を担う一方 (Patra, 2018)、*GNAS* が PKA 依存的に NOTCH シグナルを負に制御し膵癌進展に抑制効果を示すことが明らかになり (Kawabata,

Ono, 2022)、この 2 つの遺伝子変異の背後では複雑なクロストークが起きることで腫瘍表現型を示す可能性が示唆されていた (図 3)。本研究ではこのクロストークに関与する経路をさらに検証することを目的として、膵管上皮細胞株を用いて *KRAS*、*GNAS* 変異細胞の取得を行った。本研究期間内に RNA-seq による解析結果を得ることまではできなかったが、ドライバー変異、しかもその変異種 (変異アミノ酸、変異

形式 [ミスセンス、ナンセンス]) との組み合わせも同時に評価することでより詳細な経路の変化が捉えられると期待できる。今後は上記細胞株に加え、我々の研究グループが保有する *GNAS* 変異を有する 10 種類の IPMN 関連初代細胞に対しても *KRAS* ゲノム編集を行い、発現プロファイルの比較を行う予定である。

バイオマーカーとしてのターゲット RNA についての血液からの取り組みについては方法・結果 1 で述べた。本研究期間で、精製手法やデジタル PCR についての検出法について検討した。これまでマイクロ RNA (miRNA) を用いた細胞外小胞からの RNA 抽出はすでに確立されているが、遊離 RNA となるとその存在量、そして、血液中で RNA が比較的不安定であり高度に断片化されていること、および高濃度の RNase が存在することが大きな原因となって、本研究でも候補とした遺伝子、lncRNA の発現比較に対して十分量の検出には至らなかった。今後も安定的に RNA を抽出する方法、逆転写、そしてデジタル PCR を用いたターゲットの高感度の検出系の構築に向けバリデーションを進める予定である。さらに、我々は膵組織に最も近い体液である膵液・十二指腸液に存在する DNA より、微量な変異を顕著に高率で検出

する結果を得た (論文準備中)。現在はこれらの消化液からも遊離 RNA を取得し、上記ターゲットの検出を目指した検討を行っている。血中では捉え切れない変化を反映した RNA を効率的に回収し、高感度に検出することができれば IPMN 検出の機会を拡大する可能性がある。

国内現行の血漿 CGP 検査である Guardant360 や FoundationOne Liquid は、現時点では進行癌患者を対象とし、検査目的は抗がん剤・分子標的薬の選択に限定される。研究ベースではリキッドバイオプシーの精度向上を目指した Gardant INFINITY (2022 年 9 月) のような遺伝子変異にメチル化検出を組み合わせた包括的がんパネルが発表され、また RNA の中でも安定的かつ顕著に検出できる miRNA に関しては国内でも膵癌を初めとする多癌腫の miRNA プロファイル検出パネル (国立がんセンター、東レ他) も検討されてきた。一方で本研究の対象とした mRNA、ncRNA はアポトーシス / 壊死腫瘍細胞からの情報とシグナル伝達などの活性腫瘍細胞からの情報の両方、すなわち癌に関する直接のリアルタイム情報を取得できる可能性があり、上記パネルと比較すると、特定の癌腫を早期で捉えるバイオマーカーになり得る。

## VI 結 語

本研究において、IPMN の主要ドライバー遺伝子である *KRAS*、*GNAS* 変異に連動して発現が変動する RNA を高感度で検出する系を構築することは、膵癌を超早期で発見できることが可能な核酸バイオマーカーによる新しいリキッドバイオプシーの構築に寄与できる可能性がある。本研究における膵癌: IPMN はこの「変異・発現変動」統合解析の 1 つのモデルであり、多くの癌腫の様々なタイプに応用できる腫瘍診断系の創出となることが期待される。

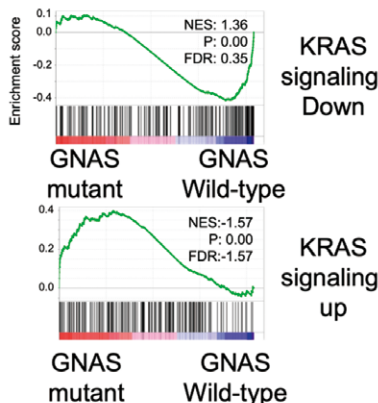


図 3 *GNAS* 変異による *KRAS* シグナル系の変化 (kawabata, Ono, *J.Gastroenterol.*, 2022)

## 参考文献

- 1) Patra KC, Kato Y, Mizukami Y, et al. : Mutant GNAS drives pancreatic tumorigenesis by inducing PKA-mediated SIK suppression and reprogramming lipid metabolism. *Nat Cell Biol* 20: 811-822, 2018.
- 2) Kawabata H, Ono Y, et al. Mutant GNAS limits tumor aggressiveness in established pancreatic cancer via antagonizing the KRAS-pathway. *J Gastroenterol.* 57(3): 208-220. 2022
- 3) Takahashi K, Ota Y, Kogure T, et al.: Circulating extracellular vesicle-encapsulated HULC is a potential biomarker for human pancreatic cancer. *Cancer Sci* 111: 98-111, 2020.