

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08349

研究課題名(和文) 膵胆管系腫瘍における早期診断システム確立及び治療に対する反応性予測に関する試み

研究課題名(英文) Attempt to establishment of early diagnosis and prediction of therapeutic response in pancreatobiliary neoplasms

研究代表者

東 美智代 (HIGASHI, Michiyo)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・准教授

研究者番号：60315405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ヒト膵胆道系腫瘍において、様々な癌の生物学的悪性度とムチン抗原の発現が密接に関連していることを報告してきた。我々が開発した新規メチル化解析法(MSE法)を用いて臨床検体の解析を行った。特に膵癌では、予後不良因子のMUCとmRNA、メチル化状態が密接に関連していることを示した。またメチル化に関わる酵素や低酸素バイオマーカー等とが相関していることも見いだした。以上、臨床検体でのムチン検索が、膵胆管型腫瘍の予後予測に役立つことを示した。今後、これらの検索が、早期発見や治療等の臨床応用に役立つ可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We had reported that expression profiles of mucins are closely associated with biological behavior of human pancreatobiliary neoplasms. We evaluated the methylation status of MUC1 and MUC4 promoter regions in pancreatic tissue samples by the methylation specific electrophoresis (MSE) method. We show that the DNA methylation status of the promoters of MUC1 and MUC4 in pancreatic tissue correlates with the expression of MUC1 and MUC4 mRNA. In addition, the expression of several DNA methylation/demethylation factors show a significant correlation with MUC1 and MUC4 methylation status. Furthermore, CAIX expression significantly correlates with the expression of MUC1 and MUC4. Interestingly, our results indicate that low methylation of MUC1 and/or MUC4 promoters correlates with decreased overall survival. Analysis of epigenetic changes in mucin genes may be of diagnostic utility and one of the prognostic predictors for patients with PDAC.

研究分野：人体病理

キーワード：病理学 膵胆道腫瘍 ムチン抗原 予後因子 MUC1 MUC4 MUC16 メチル化

1. 研究開始当初の背景

膵癌ならびに胆管癌は、予後不良な悪性腫瘍の一つである。画像診断が発達した今日においても早期発見どころか、治癒を望める段階での診断も困難であることが多い。危険因子についての解明も進んでおらず早期発見のためのスクリーニングといった戦略も確立していない、膵胆管系腫瘍自体が高い悪性度を有し早期より浸潤・転移を来しやすいことなど、複合的要因が考えられる。近年では超音波内視鏡下穿刺生検術(EUS-FNA)が急速に普及しており、手術前に病理学的診断が行える症例が確実に増えている。しかし、他臓器の生検組織と比較すると、得られる組織量は少なく断片化していることも多く診断は困難である。特に、腫瘍様病変あるいは良性腫瘍の鑑別には難渋することが多い。それゆえ、侵襲性の高い手術が必要であるか、縮小手術の適応であるか、あるいは経過観察でよいか、の判断に難渋するのも膵胆管系の腫瘍の特徴である。また現在では手術療法単独ではなく、化学療法や放射線療法も加えた集学的療法も行われており、予後の改善が図られているが、他臓器に比較して依然予後は不良である。しかし、化学放射線療法が著効する症例が散見されている。そのため、膵胆管系腫瘍の早期診断あるいはその予後因子の確定が望まれている。

2. 研究の目的

難治性腫瘍である膵胆管系腫瘍であるが、早期発見・早期診断ができれば有効な治療を積極的に行き予後の改善が見込まれるようになってきた。特に、術前に化学放射線療法が施行され治癒切除が可能になる症例が増加しており、予後の飛躍的な改善も期待される。本研究では、膵胆管系腫瘍の予後因子であるムチン抗原発現の検討を基盤とし、膵液や胆汁などの術前生検材料等の解析と切除検体を対比する。また術前治療等の相関関係の有無も検討する。ムチン抗原発現解析が腫瘍の質的診断や早期診断に応用可能であることを明らかにするのみならず、術前治療等との関連も解析することによって、治療選択に直結したマーカーとしての確立を目指す。

3. 研究の方法

手術前に得られた生検検体(膵管や胆管組織)や膵液、胆汁、あるいは手術時に摘出臓器から得られた膵液や胆汁といった検体を用いる。これらの検体と、各種ムチン発現に関連する mRNA、その mRNA 発現の制御に関わっているプロモーター領域のエピジェネティクス情報をも総合的に検索する。また1例ごとに、摘出病理標本の HE 像、並びに免疫組織化学的解析を行い、エピジェネティクス

情報と綿密に比較検討する。これらの検討と平行して、画像情報や予後を含む臨床的情報の収集を行い、最終的に、膵液・胆汁のエピジェネティクス解析が、どれほどの正確さで膵胆管系腫瘍の質的診断や予後等の予測が可能であるかを確認する。

膵液等からの各ムチンコア蛋白遺伝子の mRNA 検出ならびにムチン蛋白の検出

膵胆管系腫瘍患者の、術前あるいは摘出検体から膵液や胆汁を採取する。また比較対象として、非腫瘍性疾患(膵胆管合流異常や胆管炎など)患者から得られた組織も採取する。採取後、mRNA を抽出し高感度の定量 Real-time PCR 法を用い、各種ムチンコア蛋白の mRNA に関して解析を行う。また、ELISA や Western blotting 等も行い、ムチン蛋白の検出も試みる。同時に DNA 抽出も行い、次項のメチル化状態の検討に用いる。既に行った膵液の解析では、全例ではないが mRNA あるいは DNA の抽出ならびに解析に成功している。また培養細胞上清からの mRNA 検出を行っており、陽性あるいは陰性対象として使用している。以上の分子生物学的検討は研究分担者・横山及び研究協力者・松尾が行ない、研究代表者が指導及び統括する。

ムチンコア蛋白遺伝子 DNA プロモーター領域のメチル化状態の検討

我々は培養膵癌細胞を用い、MUC2 を初め、各種のムチン発現を調節しているのが、プロモーター領域メチル化によって規定されていることを明らかにしてきた。今後は実際の臨床材料を対象として、人体内での DNA メチル化状態を検討する。我々は、従来までの DNA メチル化検出限界 5%を超える 0.1%の感度を有する新規検出法を開発しており(国際特許公開番号:WO 2011/132798)、その方法を用いて膵液あるいは胆汁を解析する。膵液では浸潤性膵管癌(PDAC)、IPMN-intestinal type、IPMN-gastric type 毎に特徴的なパターンのバンドを示し、質的診断をし得る可能性を示し報告した(Yokoyama, et al: PLOS One. 2014;9(4):e93760; 国際特許公開番号:WO 2013/002422)。今後は膵液での診断精度向上とともに胆汁での解析を行っていく。これらの分子生物学的検討は主に研究分担者である横山及び研究協力者・松尾が行ない、研究代表者が指導及び統括する。

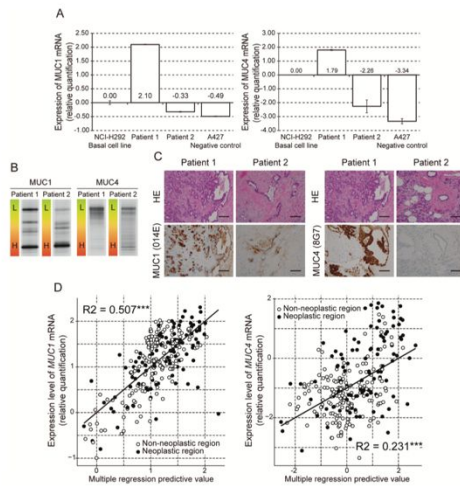
病理組織標本の解析

EUS-FNA 検体、摘出標本を用い、組織形態学的検討を行う。免疫染色、in situ hybridization、レクチン染色等を行う。また代表的な症例を用いて、マイクロディセクションを行い、一連の解析を行う。腫瘍でのムチン発現のみでなく予後データ等も併せて比較検討し、前述した分子病理学的手法で得られた結果が、腫瘍の質的診断を反映しているかどうか判断していく。

4. 研究成果

膵癌症例でのムチンコア蛋白遺伝子 DNA プロモーター領域のメチル化状態の検討

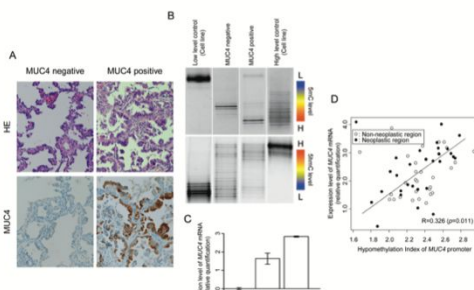
約 180 症例での切除膵組織について独自に開発した MSE 法を用いて MUC1, MUC4 のプロモーター領域のメチル化の部位と程度を評価し、さらに DNA メチル化、脱メチル化に関わる酵素である、TET, AID と低酸素のバイオマーカーとされる CAIX の発現解析とともに臨床病理学的事項との比較検討を行った。この結果腫瘍での MUC1, MUC4 の発現上昇は MUC1, MUC4 のプロモーター領域の脱メチル化と TET, AID の低下、CAIX の発現上昇に強く



関連していることを明らかにした。

- A. 膵癌細胞株及び膵癌患者組織での MUC1, MUC4 mRNA 発現状況
- B. MUC1, MUC4 プロモーター領域での DNA メチル化状況。MSE 法を用いての解析
- C. 病理組織標本での MUC1, MUC4 発現状況
- D. CAIX と MUC1, MUC4 での DNA 脱メチル化との解析。

MUC の mRNA 発現状況とプロモーター領域でのメチル化状態、蛋白の発現状況(免疫染色)とは相関関係が認められる。またそれらは CAIX とも相関していた。



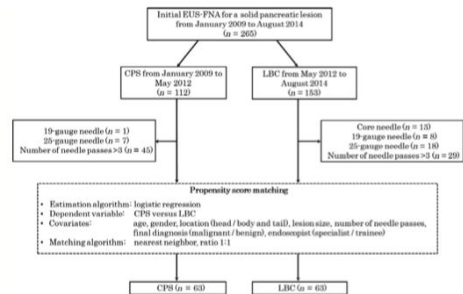
また肺腫瘍検体を用いて MUC4 の発現と DNA メチル化状態を調べた。

- A. 肺癌の病理組織像と MUC4 の免疫染色。
- B. MUC4 プロモーター領域での DNA メチル化状況。MSE 法を用いての解析
- C. MUC4 の mRNA 発現状況。
- D. MUC4 mRNA 発現状況とプロモーター領域でのメチル化状態。相関関係が認められた。

膵腫瘍に対する EUS-FNA 検体検体での検討

EUS-FNA 検体を用いて各ムチンコア蛋白に対する免疫染色を行い、切除検体と同様の染色態度であることを示した。免疫染色でのムチン発現と臨床病理学的事項との関連について検討した。MUC1, MUC4, MUC5AC は早期の状態から高率に発現していた。MUC2 は殆ど発現が認められなかった。MUC6 は病期の進行と共に発現が減少し、MUC16/CA125 の特に細胞質陽性例は病期の進行とともに発現が増加していた。浸潤性膵管癌から採取された EUS-FNA 検体の MUC5AC 発現群では予後が良好であったが、MUC16 が発現している症例では予後が不良であった。

また EUS-FNA 検体では、採取される組織量が微量なうえに断片化していることが多く、診断がしばしば困難である。それを克服するための一助として LBC (Liquid-based



cytology) をいち早く導入し、診断に有用で有ることを示した。

計画のフローチャート。CPS 法

Table 3 Diagnostic yield of conventional Papanicolaou smear versus liquid-based cytology

	All participants				Matched pairs			
	CPS (n = 112)	LBC (n = 153)	P-value		CPS (n = 63)	LBC (n = 63)	P-value	
Accuracy, %	69.6	90.2	<0.001		89.3	95.4	0.06	
Sensitivity, %	63.0	89.0	<0.001		87.0	94.9	0.03	
Specificity, %	100	100	<0.99		100	100	<0.99	
Positive predictive value, %	100	100	<0.99		100	100	<0.99	
Negative predictive value, %	37.0	53.1	0.15		63.3	70.8	0.52	

(Conventional Papanicolaou smear, LBC, liquid-based cytology)

と LBC 法との比較検討を立案。

CPS 法と LBC 法との比較結果。LBC 法が CPS 法より有意に感度が高かった。

胆嚢癌の病理組織検体を用いて MUC1 ムチン発現が予後不良因子であることを明らかにした。

以上、特に膵腫瘍に重点を置いてムチンの発現と mRNA やメチル化状況と密接に関連していることを示した。また脱メチル化や低酸素バイオマーカーとも関連していることを明らかにした。これらの因子を生検検体等で検索することにより、予後を予測しうる可能性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Hiraki T, Yamada S, Higashi M, Hatanaka K, Yokoyama S, Kitazono I, et al. Immunohistochemical expression of mucin antigens in gallbladder adenocarcinoma: MUC1-positive and MUC2-negative expression is associated with vessel invasion and shortened survival. *Histology and histopathology*. 2017 Jun;32(6):585-96. PubMed PMID: 27672051. 査読有

2. Matsuda A, Higashi M, Nakagawa T, Yokoyama S, Kuno A, Yonezawa S, et al. Assessment of tumor characteristics based on glycoform analysis of membrane-tethered MUC1. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2017 Jun 05. PubMed PMID: 28581490. 査読有

3. Yokoyama S, Higashi M, Tsutsumida H, Wakimoto J, Hamada T, Wiest E, et al. TET1-mediated DNA hypomethylation regulates the expression of MUC4 in lung cancer. *Genes & cancer*. 2017 Mar;8(3-4):517-27. PubMed PMID: 28680536. Pubmed Central PMCID: 5489649. 査読有

4. Hashimoto S, Taguchi H, Higashi M, Hatanaka K, Fujita T, Iwaya H, et al. Diagnostic efficacy of liquid-based cytology for solid pancreatic lesion samples obtained with endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration: Propensity score-matched analysis. *Digestive endoscopy : official journal of the Japan Gastroenterological Endoscopy Society*. 2017 Jul;29(5):608-16. PubMed PMID: 28160342. 査読有

5. 伊地知 徹, 蔵原 弘, 前村 公, 又木 雄, 川崎 洋, 迫田 雅, 東美智代 et al. 集学的治療で完全奏効が得られた肝転移を伴う cStage IV 膵体部癌の 1 例. *日本消化器外科学会雑誌*. 2017;50(11):897-904. PubMed PMID: 2018076425. Epub 2018/02/01. 査読有

6. Yokoyama S, Higashi M, Kitamoto S, Oeldorf M, Knippschild U, Kornmann M, et al. Aberrant methylation of MUC1 and MUC4 promoters are potential prognostic biomarkers for pancreatic ductal adenocarcinomas. *Oncotarget*. 2016 Jun 8.

PubMed PMID: 27283771. 査読有

7. Nakajo M, Nakajo M, Nakayama H, Jinguji M, Nakabeppu Y, Higashi M, et al. Dexamethasone Suppression FDG PET/CT for Differentiating between True- and False-Positive Pulmonary and Mediastinal Lymph Node Metastases in Non-Small Cell Lung Cancer: A Pilot Study of FDG PET/CT after Oral Administration of Dexamethasone. *Radiology*. 2016;279(1):246-53. PubMed PMID: 26579562. 査読有

8. Matsushita D, Kurahara H, Mataka Y, Maemura K, Higashi M, Iino S, et al. Pancreatic hamartoma: a case report and literature review. *BMC gastroenterology*. 2016;16(1):3. PubMed PMID: 26762320. Pubmed Central PMCID: 4712467. 査読有

9. Fukukura Y, Shindo T, Higashi M, Takumi K, Umanodan T, Yoneyama T, et al. Computed tomography and magnetic resonance imaging features of lipid-rich neuroendocrine tumors of the pancreas. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2015 Sep 14;21(34):10008-17. PubMed PMID: 26379406. Pubmed Central PMCID: 4566371. 査読有

10. Higashi M, Yokoyama S, Yamamoto T, Goto Y, Kitazono I, Hiraki T, et al. Mucin expression in endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration specimens is a useful prognostic factor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas*. 2015 Jul;44(5):728-34. PubMed PMID: 25906442. Pubmed Central PMCID: 4464972. 査読有

11. Takumi K, Fukukura Y, Higashi M, Ideue J, Umanodan T, Hakamada H, et al. Pancreatic neuroendocrine tumors: Correlation between the contrast-enhanced computed tomography features and the pathological tumor grade. *Eur J Radiol*. 2015 Aug;84(8):1436-43. PubMed PMID: 26022520. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 本庄希江、山田壮亮、平木翼、東美智代、他

粘膜類表皮癌において MUC4 と MUC6 の発現低下から生存期間の短縮が予想される、日本病理学会大 106 回総会、2017 年

2. Michiyo Higashi, Seiya Yokoyama, Tsubasa Hiraki, Ikumi Kitazono, Yuko Goto, Tasaki Takashi, Mari Kirishima, Kazuhito Hatanaka, and Akihide Tanimoto. Analysis of Mucin expression and DNA methylation in serous adenoma of the pancreas, 日本病理学会第 105 回総会 2016 年 05 月 12 日~ 2016 年 05 月 14 日 仙台国際センター(宮城県仙台市)

3. 東美智代、横山勢也、北園育美、後藤優

子、田崎貴嗣、平木翼、畑中一仁、蔵原弘、又木雄弘、前村公成、新地洋之、谷本昭英、米澤傑、夏越祥次。ムチン発現からみた IPMN の悪性度、外科病理学会（招待講演）。2015 年 11 月 06 日～2015 年 11 月 07 日、ホテルアパローム紀ノ国(和歌山県和歌山市)

4. 東美智代、後藤優子、米澤傑
浸潤性膵管癌における EUS-FNA でのムチン発現、肝胆膵外科学会、2015 年 06 月 11 日～2015 年 06 月 13 日、ホテルグランパシフィック LE DAIBA (東京都千代田区)

5. 東美智代 膵漿液性腫瘍の病理
日本病理学会（招待講演）、2015 年 04 月 30 日～2015 年 05 月 02 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

〔図書〕無し

〔産業財産権〕無し

〔その他〕

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~byouri2/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

東 美智代 (HIGASHI MICHIO)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・准教授

研究者番号：60315405

(2)研究分担者

横山 勢也 (YOKOYAMA SEIYA)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：20569941

(3)研究協力者

松尾 恵 (MATSUO KEI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・技術職員