

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09456

研究課題名(和文) 膵癌における早期エピゲノム診断を目指したマイクロRNA発現異常領域の同定

研究課題名(英文) Aberrant Methylation of Tumor Suppressive miRNAs in Patients With Pancreatic Cancer

研究代表者

大坪 公士郎 (Ohtsubo, Koushiro)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：60361987

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌症例から採取した膵液、胆汁、血漿におけるマイクロRNA(miRNA)のメチル化が膵癌早期診断マーカーになるかにつき検討した。胆汁を用いた検討では、miR-1247、miR-200aにおいて良性膵胆道疾患より膵癌、胆道癌にて、miR-200bにおいて良性膵胆道疾患より膵癌にてメチル化が有意に多く認められた。血漿を用いた検討では、miR-1247において良性膵胆道疾患より胆道癌にてメチル化が有意に多く認められ、膵癌にて多く認められる傾向がみられた。

進行期、早期の膵癌症例における膵液を用いたmiRNAのメチル化の検討を行うことにより、膵癌早期診断マーカーが同定される可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は小病変で発見できれば比較的良好な予後が期待できると考えられており、早期診断法の確立が不可欠である。膵癌の診断法において、miRNAの異常発現の原因となるメチル化などのエピジェネティックな変化を用いた報告は少なく、膵癌組織以外の膵液、胆汁、血漿において検討した報告は今までみられない。

膵癌、胆道癌、良性膵胆道疾患における胆汁、血漿でのmiRNAのメチル化の解析の結果をもとに、進行期、及び早期の膵癌症例における膵液を用いてmiRNAのメチル化に関する検討を行うことにより、膵癌早期診断マーカーが同定され、膵癌の予後が改善することが期待される。

研究成果の概要(英文)： The purpose of this study is to identify methylation of miRNAs in pancreatic juice, bile, and plasma in patients with early pancreatic cancer. In bile, the methylation rates of miR-1247 and miR-200a were significantly higher in patients with pancreatic and biliary tract cancer than in those with benign diseases, and the methylation rate of miR-200b was significantly higher in patients with pancreatic cancer than in those with benign diseases. In plasma, the methylation rate of miR-1247 was significantly higher in patients with biliary tract cancer than in those with benign diseases, and that tended to be higher in patients with pancreatic cancer than in those with benign diseases.

The analyses of methylation of miRNA in pancreatic juice in patients with pancreatic cancer may be useful for detecting early pancreatic cancer.

研究分野：消化器内科学

キーワード：miRNA メチル化 胆汁 血漿 膵液 膵癌 胆道癌

1. 研究開始当初の背景

膵癌の5年生存率は7%と1割にも満たず、すべてのがんの中で最も予後不良と考えられている。しかし、TS1a (腫瘍径が3~10mm) の5年生存率は80.4%、Union for International Cancer Control (UICC) 分類におけるStage 0の5年生存率はそれぞれ85.8%であることより、膵癌は小病変で発見できれば比較的良好な予後が期待できると考えられる。膵癌の予後を改善するには、早期診断法の確立が不可欠である。

miRNAはタンパク質をコードしない20~25塩基からなる微小なRNAであり、発生、分化、代謝、上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition: EMT)、細胞死などの生命現象に関与し、その制御異常や遺伝子変異は癌の発生や進展にも関与している。悪性腫瘍に特異的に発現するmiRNAは「癌遺伝子型miRNA」と「癌抑制型miRNA」に大別され、悪性腫瘍においては、癌抑制型miRNAがエピジェネティックな遺伝子発現制御 (DNAメチル化とヒストン脱アセチル化など) によってサイレンシングされることが報告されている。しかし、膵癌においてはmiRNAの異常発現の基盤となるエピジェネティックな変化についての報告は少なく、膵癌組織以外の膵液、胆汁、血漿などにおいて検討した報告は今までみられない。

2. 研究の目的

膵癌、胆道癌、良性膵胆道疾患症例から採取した膵液、胆汁、及び血漿などのサンプル (リキッドバイオプシー) を用いて、癌抑制型miRNAにおけるメチル化によるサイレンシングに関する検討を行い、早期膵癌 (Stage 0, I) においてメチル化されている癌抑制型miRNAを同定し、膵癌の早期診断マーカーを確立することを目的とした。

3. 研究の方法

胆汁を用いた検討では、膵癌53例、胆道癌25例、良性膵胆道疾患20例、計98例を対象とした。内視鏡及び経皮的に採取した胆汁からcell free DNAを抽出し、sodium bisulfite処理を行った。その後、癌抑制型miRNAと報告されている16個のmiRNA (miR-26a1, 29c, 30d, 31, 34bc, 96, 126, 130b, 145, 192, 200a, 200b, 345, 615-5p, 1247, 1254-1) においてPCRを施行し、次世代シーケンサーを用いてメチル化の頻度を定量的に解析した。その後、膵癌、胆道癌、良性膵胆道疾患の3群間でメチル化の頻度に有意差があるかにつき、t検定を用いて解析を行った。さらに、t検定において有意差 ($p < 0.05$) を認めた群に関しては、ROC curveを作成し、AUCを算出した。

次に、今回胆汁での解析を施行した症例のうち、超音波内視鏡下穿刺術 (endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration: EUS-FNA) を施行した8例において、miR-1247の標的分子となり、染色体や細胞骨格の制御に重要な役割を果たすと考えられている regulator of chromosome condensation 2 (RCC2) の発現につき、免疫染色にて評価を行った。

さらに、膵癌29例、胆道癌9例、良性膵胆道疾患22例、計60例を対象として血漿での検討も行った。胆汁での検討にて良性膵胆道疾患と比較して膵癌、胆道癌にてmiRNAのメチル化を有意に高率に認めたmiRNAにおいて、胆汁での検討と同様な方法でメチル化の検討を行った。

4. 研究成果

胆汁を用いた検討では、miR-1247の8個のCpGサイトのうち5個において、miR-200aの9個のCpGサイトのうち5個において、良性膵胆道疾患と比較して膵癌、胆道癌にてメチル化が有意

に多く認められた。また、miR-200b の 12 個の CpG サイトのうち 6 個において、良性膵胆道疾患と比較して膵癌にてメチル化が有意に多く認められた。なお、Stagel, II の膵癌、胆道癌においても、良性膵胆道疾患と比較してメチル化が有意に多く認められた。一方、miR-126 では膵癌、胆道癌と比較して良性膵胆道疾患においてメチル化が有意に多いサイトが認められた。ROC curve での検討では、miR-1247 において有意差を認めた 5 個のサイトのうち 4 個において、miR-200a の 5 個の CpG サイトのうち 3 個において AUC>0.7 であり、moderate accuracy と考えられた。一方、miR-200b において有意差を認めた 6 個のサイトのうち、AUC>0.7 であったサイトは認められなかった。

次に、EUS-FNA 検体を用いて RCC2 の発現を検討したところ、8 例全例で RCC2 の発現を認めた。15%以上をメチル化陽性とする、8 例中 5 例において miR-1247 のメチル化を認め、これらの症例では miR-1247 のメチル化により、RCC2 の発現が亢進していることが推測された。

胆汁を用いた検討にて良悪性間でメチル化に有意差が認められた 3 個の miRNA (miR-1247, 200a, 200b) において血漿を用いた検討を行った。miR-1247 の 8 個の CpG サイトのうち 1 個において、良性膵胆道疾患と比較して胆道癌においてメチル化が有意に多く認められ、膵癌において多く認められる傾向がみられた。

以上より、膵胆道疾患での癌抑制型 miRNA のメチル化の検討において、胆汁を用いた検討では膵癌、胆道癌では良性膵胆道疾患と比較して miR-1247, 200a, 200b のメチル化を有意に高率に認め、血漿を用いた検討では膵癌、胆道癌では良性膵胆道疾患と比較して miR-1247 のメチル化を高頻度に認め、膵胆道疾患における良悪性の鑑別に有用なマーカーになる可能性が示唆された。

今後、膵癌、胆道癌、良性膵胆道疾患における胆汁、血漿での miRNA のメチル化の解析の結果をもとに、進行期、及び早期の膵癌症例において、内視鏡的に採取した膵液を用いて miRNA のメチル化に関する検討を行うことにより、膵癌の早期診断マーカーが同定され、膵癌の予後が改善することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohtsubo K, et al.	4. 巻 39
2. 論文標題 Aberrant methylation of tumor suppressive miRNAs in bile from patients with pancreaticobiliary	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 5449-5459
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.13738.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大坪公士郎
2. 発表標題 胆汁を用いた膵胆道疾患における癌抑制型miRNAのメチル化異常に関する検討
3. 学会等名 第48回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Koushiro Ohtsubo
2. 発表標題 Analyses of aberrant methylation of tumor suppressive miRNAs in the patients with pancreaticobiliary diseases in bile juice.
3. 学会等名 Pancreas 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大坪公士郎
2. 発表標題 各種膵胆道疾患における胆汁中癌抑制型miRNA のメチル化に関する検討
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohtsubo K
2. 発表標題 Analyses of Aberrant Methylation of Tumor Suppressive miRNAs in Bile in Patients With Pancreaticobiliary Diseases.
3. 学会等名 The 50th Anniversary Joint Meeting of American Pancreatic Association and Japanese Pancreas Society. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大坪公士郎
2. 発表標題 胆汁中癌抑制型miRNAのメチル化解析による膵胆道疾患の良悪性鑑別に関する検討
3. 学会等名 第61回日本消化器病学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 特許権	発明者 大坪公士郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、100106909	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山下 要 (Yamashita Kaname) (80456425)	金沢大学・附属病院・助教 (13301)	
研究分担者	三宅 邦夫 (Miyake Kunio) (60550712)	山梨大学・大学院総合研究部・准教授 (13501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	矢野 聖二 (Yano Seiji) (30294672)	金沢大学・がん進展制御研究所・教授 (13301)	
連携研究者	福田 康二 (Fukuda Koji) (10722548)	金沢大学・がん進展制御研究所・研究員 (13301)	
連携研究者	田島 秀浩 (Tajima Hidehiro) (00436825)	金沢大学・大学病院・講師 (13301)	