

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究（A）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18689033  
 研究課題名（和文） 膵癌早期診断および治療法開発を目的とした新規メチレーションマーカーの同定  
 研究課題名（英文） Identification of new methylation markers for early diagnosis and therapy development in pancreatic cancer  
 研究代表者  
 佐藤 典宏（Norihito SATO）  
 九州大学・大学院医学研究院・助教  
 研究者番号：20423527

## 研究成果の概要：

我々はマイクロアレイによる膵癌メチル化遺伝子のスクリーニングと実際の膵癌細胞でのメチル化状態を調査し、新規メチル化ターゲットを同定した。遺伝子 *reelin*(RELN)、*Reprimo*、*SPARC* はそれぞれ膵癌で異常メチル化による発現低下を認め、それぞれが、膵癌の浸潤などの悪性度に深く関与する一方、予後因子として臨床応用可能であることが示唆された。また、DNAメチル化異常は膵癌の前駆病変（PanIN）の進展に伴いメチル化の程度が増加しており、膵発癌との関与が示唆された。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	12,800,000	3,840,000	16,640,000
2007年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2008年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	22,000,000	6,600,000	28,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：膵癌、メチレーション、マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

我々は膵癌の早期診断マーカーを確立し新たな治療法を開発することを目的として、最近5年間にわたり米国ジョンズホプキンス大学との緊密な共同研究により、膵癌におけるDNAメチレーションの異常について研究を重ねてきた。その結果、プロモーター領域における異常メチル化が癌抑制遺伝子の不活性化を経て、膵癌の悪性化に深く関与してい

ることを報告した。しかし、これまでの方法で検出された数多くのメチレーションの変化を伴う遺伝子群のうち、大多数の膵癌細胞で発現消失を伴う真のメチル化異常は少ない。そのため、実際に膵癌の診断や治療の標的となるメチル化異常を数多く効果的に見いだすためには更なる工夫と努力が望まれている。本研究では、薬剤（メチル化阻害剤）を用いた従来法によるメチル化異常検出方法に加えて、レーザーマイクロダイセクショ

ンにより正常膵管細胞と膵癌細胞の遺伝子発現プロファイルを厳密に比較し、膵癌細胞で消失している遺伝子群を選択する方法を組み合わせる。この方法によって、薬剤治療後に非特異的に発現の変化する遺伝子を除外することができるとともに、前癌細胞から浸潤癌に至る膵癌進展過程に重要な役割を果たしている真の異常メチル化遺伝子を正確に検出することが可能になる。

## 2. 研究の目的

遺伝子発現マイクロアレイを用いたゲノム網羅的スクリーニングにより、膵癌における新たなメチレーションターゲットを同定し、このうち早期診断あるいは新たな治療法開発の標的として有用な遺伝子を特定し、その臨床的意義を検討するものである。特に、本研究では薬剤（メチル化阻害剤）を用いた従来法によるメチル化異常検出方法に加えて、レーザーマイクロダイセクションにより正常膵管細胞と膵癌細胞の遺伝子発現プロファイルを厳密に比較し、膵癌細胞で消失している遺伝子群を選択する方法を組み合わせる。この方法によって、薬剤治療後に非特異的に発現の変化する遺伝子を除外することができるとともに、前癌細胞から浸潤癌に至る膵癌進展過程に重要な役割を果たしている真の異常メチル化遺伝子を正確に検出することが可能になる。

## 3. 研究の方法

**マイクロアレイによる膵癌メチル化遺伝子のスクリーニング：**メチル化阻害剤治療後の培養細胞における遺伝子発現の変化と、原発性膵癌細胞における遺伝子発現解析を組み合わせることにより、実際に癌で発現消失を伴う真のメチル化異常を検出する。(a)まず10種の膵癌培養細胞をDNAメチレーション阻害剤およびヒストン脱アセチル化阻害剤で治療し、RNAを抽出する。治療による遺伝子発現の変化をオリゴヌクレオチド・マイクロアレイ（Affymetrix社）を用いて調べる。治療後の発現が有為に上昇したものをリストアップする。(b)レーザーマイクロダイセクション（PALM社のLMPC）により採取した正常膵管と膵癌組織の遺伝子発現プロファイルを、同様にマイクロアレイを用いて比較し、正常に比べて癌で有為に発現低下している遺伝子を選出する。(a)および(b)を同時に満たす遺伝子を癌特異的メチル化ターゲットの候補遺伝子とする。

**メチル化候補遺伝子の組織特異的なメチル化**

**パターンの解析：**マイクロアレイ解析によって得られた膵癌メチル化候補遺伝子について、レーザーマイクロダイセクションにて採取した正常膵組織、PanIN（膵前癌病変）および浸潤性膵癌から得られたDNAにおけるメチル化のパターンを、メチレーション特異的PCR（MSP）を用いて調べる。今回は種々のPanINにおけるメチル化を詳細に調べることにより、浸潤癌に至る直前の段階でのメチル化異常をとらえることができると考えられる

**膵液術前診断への応用：**膵癌においては様々な遺伝子が高頻度にメチル化していることが明らかとなってきた（Sato N, and Goggins M, J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2006）。我々は、マイクロダイセクションにより得られた膵前癌病変（PanIN）組織における詳細なDNAメチル化プロファイリングを行い、PanINのどの段階でどの遺伝子にメチル化が起こっているかについて新たな知見を得た（Sato N, et al., Mod Pathol 2008）。

この結果に基づき、膵癌およびPanIN-3で高頻度にメチル化がみられる遺伝子について内視鏡（ERCP）検査によって得られた膵液DNAでMSP（あるいはリアルタイムMSP）を行い、膵癌の早期診断に有用かどうかを判定する。特に良性（あるいは境界領域）の腫瘍性病変（IPMN adenoma, borderline）や慢性膵炎でも軽度のメチル化を示す遺伝子に対しては、リアルタイムPCRで膵液DNAのメチル化を定量し、癌との鑑別が可能かどうかを評価する。有望なマーカーとして現在解析中の遺伝子はSARP2/SRFP1, TFPI-2, FOXE1などであり、これらを組み合わせることで診断応用に向けて解析中である。

**膵癌治療標的の同定：**これまでに我々が見いだした膵癌メチル化ターゲット遺伝子のうち、SPARCは膵癌の間質に高発現しており、またSPARCの発現は膵癌患者の予後と強く関連することを見いだした（Sato N, et al., Oncogene 2003; Infante JR, Sato N, et al, J Clin Oncol 2007）。すなわち、癌間質のSPARCは膵癌の進展に何らかの役割を果たしていることが考えられる。そこで、膵癌細胞とSPARCを高発現する線維芽細胞あるいはSPARCをノックダウンした線維芽細胞とトランスウェルカルチャーシステムで共培養し、膵癌の増殖、浸潤転移に与える影響について解析する。間質細胞におけるSPARC発現が有用な治療標的であると考えられた場合、cDNA発現ベクターあるいはsiRNAのstable transfectantを作成し、ヌードマウスの膵癌同所移植モデルを用いてin vivoにおける機能解析を行う。

#### 4. 研究成果

マイクロアレイによる膵癌メチル化遺伝子のスクリーニングをおこない、多数の候補遺伝子のリストを得た。この候補遺伝子群について実際の膵癌細胞でのメチル化状態を調査し、現在までに7個の新規メチル化ターゲットを同定している (Sato N, et al., Gastroenterology 2006)。

このうち最も興味深い遺伝子として、脳発生時における神経細胞の遊走に深く関与する遺伝子 *reelin* (*RELN*) についてさらに詳細に検討を行った。本遺伝子は膵癌の約70%で異常メチル化による発現低下をきたしていた。また、*reelin*の発現が残っている膵癌細胞についてsiRNAを用いてその発現をノックダウンしたところ、約30倍もの遊走能(浸潤能)の増加をみた。すなわち、*reelin*のメチル化に伴う不活性化は、膵癌の悪性度に深く関与している可能性が示された (Sato N, et al., Gastroenterology 2006)。

また、リストアップされた候補遺伝子のうち、G2/M期チェックポイントのひとつである *Reprimo* について詳細に検討を行った。*Reprimo*の異常メチル化は膵癌の発生過程で比較的晩期 (PanIN-3) からみられ、癌への進展に伴いその頻度が増加することが分かった。また、*Reprimo*のメチル化は膵癌の遺伝子不安定性と正の相関を示し、さらにメチル化陽性例は陰性例に比べ有意に予後不良であった (Sato N, et al., Cancer 2006)。すなわち、*Reprimo*の異常メチル化は膵癌の生物学的悪性度を反映し、予後因子として臨床応用可能であることが示唆された。

さらに、我々が同定したメチル化遺伝子 *SPARC*は、膵癌細胞ではメチル化して発現が低下しているが、*SPARC*の発現低下に伴い、膵癌の悪性度が増加することを実験的に確認し、現在投稿中である。一方で*SPARC*は膵癌周囲の間質細胞では高発現しており、さらに*SPARC*の高発現は膵癌患者の強力な予後因子となることを発見した (Infante JR, et al., J Clin Oncol 2007)。さらに我々は*SPARC*がmRNAレベルでの発現でも予後因子となりうることを改めて確認しており、近日報告の予定である。このことは微量検体からの予後予測の一助となると思われる。

さらに、DNAメチル化異常が膵発癌のどの段階でおこるかを調べるため、膵癌の前駆病変とされるPanINにおけるメチル化を詳細に調べたところ、マーカーによってメチル化の頻度に差がみられるものの、比較的早期の病変 (すなわちPanIN-1) からメチル化を認め、

PanINの進展に伴いメチル化の程度が増加していた (Sato N, et al., Mod Pathol 2008)。さらに、PanINの進展と*SARP2*/*SRFP1*の異常メチル化に関して研究を続けており報告予定である。

現在、これらの結果をもとに膵液におけるメチル化異常の検出をおこなっている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

Infante JR, Sato N, et al., Peritumoral *SPARC* expression and patient outcome with resectable pancreatic adenocarcinoma., J Clin Oncol, 25, 319-25, 2007, 査読有

Sato N, et al., CpG island methylation profile of pancreatic intraepithelial neoplasia., Mod Pathol., 21, 238-44, 2008, 査読有

Sato N et al., Differential and epigenetic gene expression profiling identifies frequent disruption of the *RELN* pathway in pancreatic cancers., Gastroenterology., 130, 548-65, 2006, 査読有

Sato N et al., Aberrant methylation of *Reprimo* correlates with genetic instability and predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma., Cancer, 107, 251-7, 2006 査読有

Sato N et al., DNA methylation alterations in the pancreatic juice of patients with suspected pancreatic disease., Cancer Res., 66, 1208-11, 2006, 査読有

Sato N et al., The role of epigenetic alterations in pancreatic cancer., J Hepatobiliary Pancreat Surg., 13, 286-95, 2006, 査読有

Sato N et al., Epigenetic alterations in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas., J Hepatobiliary Pancreat Surg, 13, 280-5, 2006, 査読有

[学会発表](計2件)

第107回日本外科学会学術総会「膵癌における *SPARC* 発現消失とその生物学的意義」九州大学医学部臨床腫瘍外科 三好圭, 佐藤 典宏, 水元 一博ら

39th Annual Meeting of the American Pancreatic Association. Gemcitabine Enhances the Effect of Adenovirus-mediated Gene Therapy. Manabu Onimaru, Kenoki Ohuchida, Eishi Nagai, Kazuhiro Mizumoto, Takuya Egami, Norihiro Sato, Masao Tanaka 2008

the 39th Annual Meeting of the American Pancreatic Association. CD133 positive cells in pancreatic cancer possess increased cell proliferation, migration and invasion. Moriyama T, Ohuchida K, Mizumoto K, Lin C, Sato N, Tanaka M. 2008

3rd. Annual ACADEMIC SURGICAL CONGRESS.

PREOPERATIVE DIAGNOSIS OF TUMOR EXTENT OF BILE DUCT CANCER BY INTRADUCTAL ULTRASONOGRAPHY.

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 典宏 (Norihiro SATO)

九州大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：20423527