

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07326

研究課題名（和文）高感度DNAメチル化解析法を用いた胆管がん早期診断法構築に向けた基礎的研究

研究課題名（英文）A fundamental study for construction of bile duct cancer early diagnosis method by DNA methylation analysis.

研究代表者

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：胆管癌は、数ある癌の中でも早期発見はもちろん、治癒を望める段階での診断が困難な難治性の癌である。それゆえ、胆管癌の早期診断法の確立、さらには最近注目されている粘液産生胆管腫瘍と粘液性嚢胞性胆管腫瘍の悪性度判断法の確立が望まれている。本課題においては、Bisulfite Amplicon Sequencing (BSAS)による胆管腫瘍の悪性度に関連するムチン分子ファミリー遺伝子群を含む14種のがん関連遺伝子のメチル化解析パネルを構築し、胆管癌組織検体の腫瘍部・非腫瘍部（125症例：250検体）のメチル化解析を行った。さらに、臨床情報と比較することで、臨床応用へ向けたその有用性を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞株においてエピジェネティクスによるがん遺伝子・がん抑制遺伝子の発現制御が明らかにされてきた。近年においては、様々なヒト組織において発がん過程におけるがん遺伝子・がん抑制遺伝子の発現とエピジェネティクスの関係が報告されている。そこで、胆管組織検体・胆汁液検体において、胆管腫瘍の悪性度に関連するムチン分子ファミリー遺伝子群を含むがん関連遺伝子の発現と、DNAメチル化の関係性を明らかにできれば、希少性の高い難治がんである、胆管癌の早期発見に向けた臨床応用が可能になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Cholangiocarcinoma is one of the most intractable cancers among all cancers, and it is difficult to diagnose at a stage where early detection as well as cure can be expected. Therefore, it is desirable to establish an early diagnosis method for cholangiocarcinoma and a method to determine the malignancy of mucous-producing cholangiocarcinoma and mucinous cystic cholangiocarcinoma, which have been attracting attention recently. In this project, we constructed a Bisulfite Amplicon Sequencing (BSAS) panel for DNA methylation analysis of 14 cancer-related genes including mucin genes related to the malignancy of cholangiocarcinoma. Then we analyzed the methylation of tumor and non-tumor portions of cholangiocarcinoma tissue specimens (125 cases: 250 specimens including non-neoplastic region and neoplastic region) used this panel. In addition, to evaluate the BSAS panel analysis for clinical application, we compared analysis data with clinical information.

研究分野：分子生物学

キーワード：胆管癌 エピジェネティクス 予測モデル 機械学習 次世代シーケンス DNAメチル化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦における癌死は年間 37 万人を超えており、死因の第 1 位である。また、がんの罹患数も年々増加しており、2017 年には **100 万人**を超えると予測されている。胆管癌は、全がんにおける割合は約 2%(2017 年予測罹患数は 24,500 人)と第 8 位であり、**希少性**の高い癌である。しかし、同年での死亡者数が 8 割程度となっており、5 年相対生存率も **22.5%**と極めて低く、**難治性癌**の代表ともいえる(2017 年、国立がん研究センター試算)。このような現状を打破するためにも、胆管癌の「早期診断法の確立」あるいは「悪性度を規定する分子標的の同定」が望まれている。

近年、胆管癌を含む種々の癌において、糖タンパク質である **ムチン分子ファミリー**の異常発現が確認され、増殖・浸潤転移・抗癌剤耐性・免疫機構回避など癌進展

の各プロセスにおいて、癌の悪性化に関与することが報告されている (Nat Rev Cancer 2009 9:874)。当研究室では、早くからムチンに注目して研究を進め、(a)胆管癌におけるムチン発現と予後との関係を明らかにしている(図 1-1)。また、(b) **エピジェネティクス**の観点よりムチンの発現制御について解析を進め、各プロモーター領域の **DNA メチル化**やヒストンの化学修飾による**発現制御機構**が存在することを世界に先駆けて明らかにしてきた(図 1-2)。くわえて、(c)従来の DNA メチル化検出限界を超える 0.1%の解像度を有する新規高感度メチル化解析法(特許第 5765586 号)の開発を行い報告している(図 1-3)。

2. 研究の目的

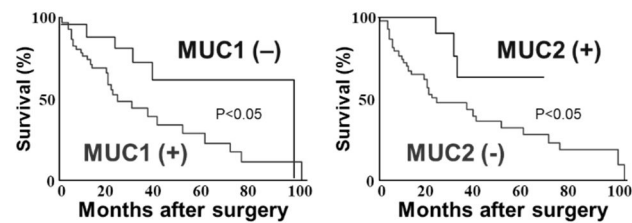
当該プログラムにおいては、胆管癌組織検体において、がん遺伝子である各ムチン遺伝子の DNA メチル化状況と、その組織における発現との相関を明らかにする。さらに、**従来法では解析が困難**な胆汁液中 DNA のメチル化解析を**新規メチル化解析法・次世代シーケンサー**を用いて行い、対応する組織における発現量や悪性度との関係性を評価することで、**リキッドバイオ**シへ向けた応用の可能性を探索する。

3. 研究の方法

BSAS 解析パネルの構築

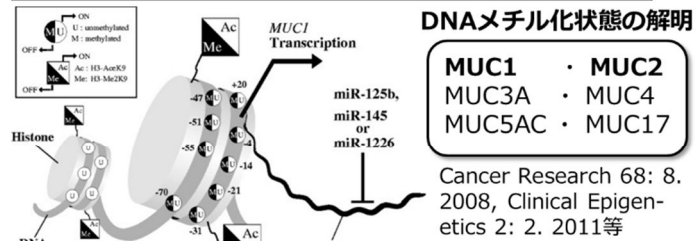
ムチン 3 種 (MUC1、MUC2、MUC4) 及び癌抑制遺伝子・癌遺伝子 8 種 (Kras、SMAD4、PTEN、BRCA1、ECAD、MGMT、TMEFF2、RARb)、がん関連トランスボ

1.胆管腫瘍におけるムチン発現様式



新規MUC1抗体(特許第5660486号)の開発

2.エピジェネティクス制御機構の解明



3.新規メチル化解析法(MSE法)の開発

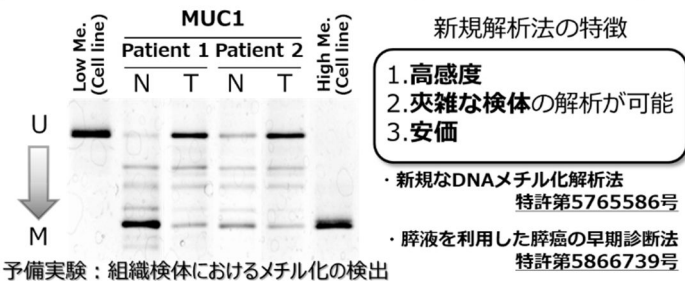


図 1.これまでの研究成果

ーター遺伝子3種（AQP1、 GLUT1、 Choline transporter）を対象としたターゲットパネルの構築を行った。ターゲットパネルの構築により、同時に標的遺伝子の解析を多数検体行うことが可能になる。Hypo-methylation コントロールは PCR により脱メチル化を行った。Hyper-methylation コントロールには CpG Methyltransferase（M. SssI）によりメチル化を行った DNA を用いた。

胆管癌組織検体の解析

上記 BSAS 解析パネルを用いて 125 症例の胆管癌組織検体より腫瘍部・非腫瘍部を採取し標的遺伝子のメチル化解析を行った。加えて、解析した標的遺伝子メチル化情報とその予後について統計解析を行った。

4. 研究成果

BSAS 解析パネルの構築

プライマーの温度条件検討、増幅領域の組み合わせ等の条件検討の結果、図 2 に示したように、すべての標的遺伝子において、そのメチル化 DNA・脱メチル化 DNA の混合比率に対して高い相関係数を示した。このことから、14 遺伝子に対応したマルチプル PCR によるアンプリコンにより高い解像度で解析が可能であることが示された。

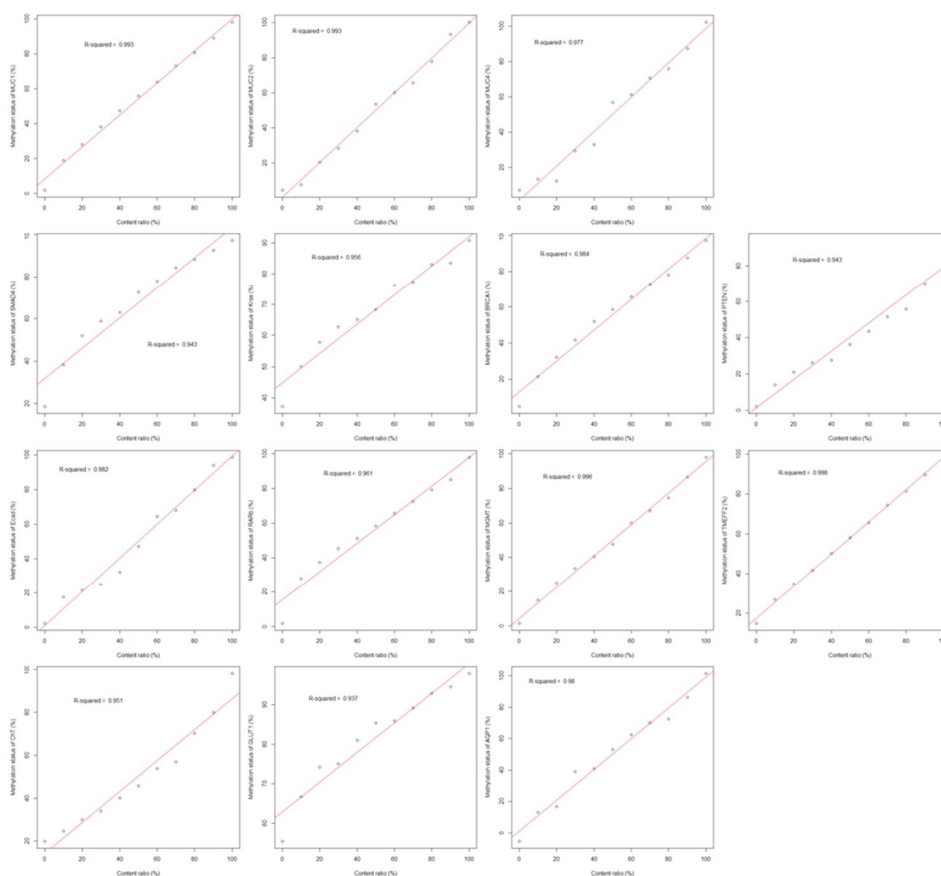


図 2。新規 BSAS 解析パネルによる 14 遺伝子解析検量結果

胆管癌組織検体の解析

図 3 に示すように、MUC1、 MUC2、 MUC4、 TMEFF2、 Choline transporter 遺伝子において腫瘍部・非腫瘍部間において脱メチル化状況に有意差があることを明らかにした。また Bioinformatics に適したシークエンスデータの解析パイプラインの構築を行った。

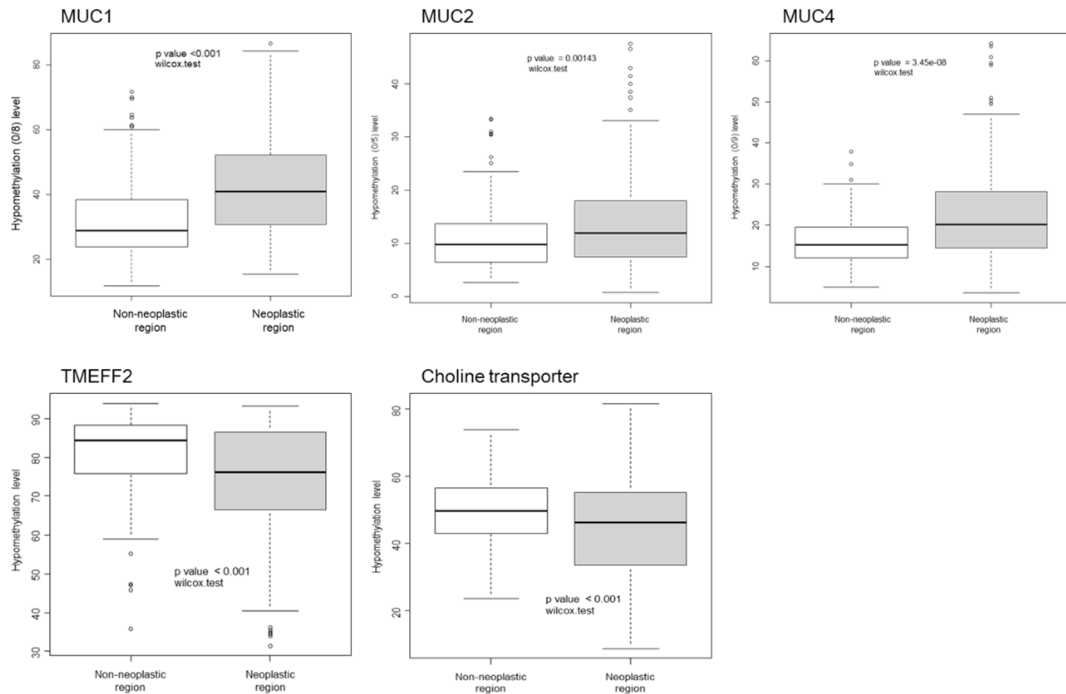


図3。Hypo-methylation status の腫瘍部・非腫瘍部の比較

遺伝子においては、腫瘍部・非腫瘍部に有意差があり発がんマーカーに適しているものと、腫瘍部・非腫瘍部の両方においてそのメチル化と術後予後に関連を示す術後予後リスクマーカーに適したものと考えられる。組織における対象遺伝子の発現状況をタンパク質、mRNA の角度から免疫染色・RT-PCR を用いて解析し、そのメチル化状況との関連性を精査する。また、さらに詳細な臨床情報を用いて統計解析・機械学習を行うことで術後予後に関連するリスクマーカーの探索を行う。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Seiya Yokoyama, Taiji Hamada, Michiyo Higashi, Kei Matsuo, Kousei Maemura, Hiroshi Kurahara, Michiko Horinouchi, Tsubasa Hiraki, Tomoyuki Sugimoto, Toshiaki Akahane, Suguru Yonezawa, Marko Kornmann, Surinder K Batra, Michael A Hollingsworth, Akihide Tanimoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Predicted Prognosis of Pancreatic Cancer Patients by Machine Learning.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical cancer research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1078-0432.CCR-19-1247	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横山勢也, 東美智代, 谷本昭英
2. 発表標題 胆管癌におけるDNAメチル化解析
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山勢也, 東美智代, 谷本昭英
2. 発表標題 DNAメチル化解析結果を用いた計算機科学による膵癌予後予測
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山勢也, 東美智代, 谷本昭英
2. 発表標題 DNAメチル化解析結果を用いた計算機科学による膵癌予後予測
3. 学会等名 第4回黒潮カワルニス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山勢也, 東美智代, 谷本昭英
2. 発表標題 MUC1およびMUC4遺伝子のメチル化解析による膵癌摘出術後の予後評価
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横山勢也, 東美智代, 谷本昭英
2. 発表標題 PDAC摘出術後におけるムチン遺伝子のメチル化解析を用いた予後予測法の構築
3. 学会等名 日本癌学会学
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	谷本 昭英 (Tanimoto Akihide) (10217151)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	
研究分担者	東 美智代 (Higashi Michiyo) (60315405)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・准教授 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------