

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08387

研究課題名(和文) IPMN悪性化進展における後天的ゲノム修飾の重要性の解明

研究課題名(英文) Molecular analysis in the malignant progression of IPMN

研究代表者

多田 稔 (Tada, Minoru)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：80302719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：20症例のIPMNを組織別に low grade, high grade, 浸潤癌化病変の3群に分類し、グローバルレベルでのDNAメチル化の比較を行った。またIPMN部分や浸潤癌部をレーザーマイクロダイセクションにより選択的に抽出し、各々からDNAおよびRNA抽出を行った。RNAレベルでのエピゲノム制御関連遺伝子の発現についても定量的RT-PCRで比較した。DNAメチル化の指標である5-メチルシトシン(5-mC)のレベルはIPMNの悪性化に伴い有意に低下した。またメチル化DNAの脱メチル化中間産物である5-ヒドロキシメチルシトシン(5-hmC)についても有意な低下を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵嚢胞性腫瘍であるIPMNが年率0.6%と一般の20倍と高い発癌リスクを有する膵癌高危険群であることを報告した。IPMNに関連する膵発癌様式にはIPMN上皮が局所で悪性転化し浸潤癌化するIPMN由来浸潤癌と、IPMNとは別の場所の膵内に通常型膵癌と同様の浸潤癌を形成するIPMN併存膵癌がある。IPMNが通常型膵癌とは異なる分子学的背景を持つかどうかはいまだ十分明らかではない。本研究では、IPMNに関連する2通りの膵発癌様式にとって重要であり、かつ各々を層別化しうるエピゲノム制御プロファイルを検討した点で意義がある。

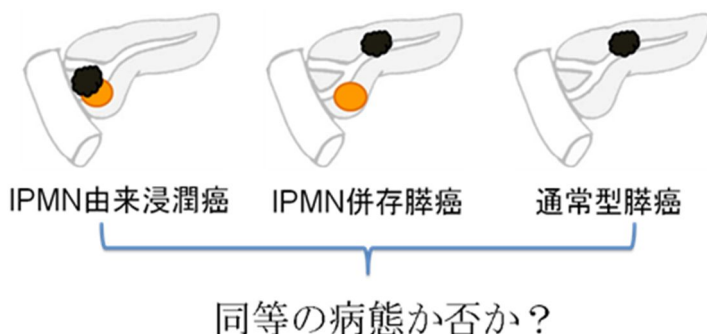
研究成果の概要(英文)：This research analyzed epigenetic profiles among the different grades of IPMN related tissues, including low grade, high grade, and invasive cancers. The levels of 5-mC and 5-hmC were decreased through the malignant progression of IPMN related lesions, which indicated a pivotal role of DNA methylation in the IPMN tumorigenesis. In addition, the expression of epigenome related genes including NMT1, DNMT3A DNMT3B, TET1, TET2, TET3 were analyzed among the groups. This research proposed a possibility that the alteration of epigenome is a significant mechanism in the progression of IPMN carcinogenesis.

研究分野：消化器内科学、膵臓病学

キーワード：膵癌

## 1. 研究開始当初の背景

充実性腫瘍である通常型膵管癌は膵上皮内腫瘍性病変 PanIN からの多段階的発癌モデルが提唱されている一方、嚢胞性腫瘍である IPMN から発生する膵癌も存在する。我々は IPMN が年率 0.6% と一般の 20 倍と高い発癌リスクを有する膵癌高危険群であることを報告した。その IPMN に関連する膵発癌様式には 2 通りあり、IPMN 上皮が局所で悪性転化し浸潤癌化する IPMN 由来浸潤癌と、IPMN とは別の場所の膵内に通常型膵管癌と同様の浸潤癌を形成する IPMN 併存膵癌である。重要なことに、IPMN 由来浸潤癌と併存膵癌における発癌の分子機序や生物学的相違点に関しては未だ殆ど不明である。いわゆるヒト通常型膵管癌には *KRAS*, *CDKN2A*, *TP53*, *SMAD4* の "Big4" と呼ばれる遺伝子変異が高頻度に存在するが、IPMN ではそれらの頻度は低く、一方で特異的な遺伝子異常 *GNAS* 変異が 45-65% に存在する。これは IPMN が通常型膵癌とは異なる分子学的背景を持つことを明確に示唆している。ただし少なくとも *GNAS* 変異の有無により IPMN の悪性化を判定することはできない。エピゲノムとは、DNA の配列変化を伴わずに遺伝子転写を制御する DNA メチル化やヒストン修飾の総称であり、後天的ゲノム修飾として細胞分化、代謝状態や免疫応答と相互に関連し合うことから、多彩な機序で膵癌の性質に影響を及ぼしうる。実際に通常型膵管癌にはエピゲノム制御因子の遺伝子変異 (Nature 2012;91(7424):399, Nature 2015;518(7540):495) も報告され、この仮説を支持している。



## 2. 研究の目的

本研究では、IPMN に関連する 2 通りの膵発癌様式の比較において、両者にとって重要であり、かつ各々を層別化しうるエピゲノム制御プロファイルを明らかにすることを主眼とする。これらエピゲノムの違いから 2 通りの膵発癌様式の違いを探索した研究は今のところない。本研究により各々の IPMN 発癌機序に重要なエピゲノム修飾が明らかになれば、特異的なエピゲノムを基にした診断・治療法にもつながる創造性も有すると期待される。

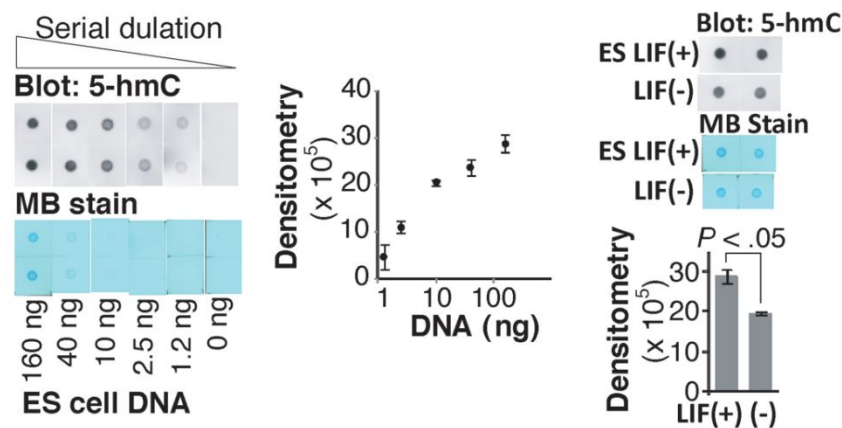
癌に有効な特異的標的分子という観点では、ほぼ 100% 近く変異が認められる *KRAS* のみならず Big4 として膵管癌の 30 - 50% に検出される *INK4A*, *P53*, *SMAD4* 遺伝子異常は膵管癌細胞の生物学的悪性度を規定できない。つまりそれらのゲノム異常は分子標的となり難い。一方で膵癌は周囲の膵微小環境からの外部応答にさらされ、発癌に有利な遺伝子発現およびエピゲノムプロファイルを確立していると考えられる。エピゲノムとは、DNA の配列変化を伴わずに遺伝子転写を制御する DNA メチル化やヒストン修飾のゲノムワイドのパターンの総称である。近年報告された膵癌細胞におけるエピゲノム修飾分子の遺伝子変異 (Nature 2012;91(7424):399, Nature 2015;518(7540):495) もその仮説を支持するかもしれない。よって本研究でエピゲノムの観点から IPMN の二つの発癌経路についても検討する着

想に至った。

### 3. 研究の方法

我々はゲノムワイドのDNAメチル化シトシン(5-mC)およびヒドロキシメチル化シトシン(5-hmC)レベルを半定量可能な、ドットプロットとDensitometryを組み合わせた実験系を構築した(下図)。それをを用いた検討で、5-hmCの低下が消化器癌の癌化に伴って広く見られる現象であることを報告した(Kudo Y, Tateishi K et al. Cancer Sci. 2012;103(4):670-676)。今回このシステムを非癌部IPMNと癌部から抽出したDNAを用い、IPMN由来浸潤性膵発癌とIPMN随伴性膵発癌における5-mCと5-hmCの変化を定量的に比較する。免疫染色データと併せて、由来浸潤型と併存型それぞれの比較も含めて悪性化に伴うDNAメチル化レベルの変化を評価する。

IPMNの経過観察中に膵発癌を認めた20症例の組織標本を用いて、これまでに免疫染色によるグローバルレベルでのDNAメチル化の比較を行った。またIPMN部分や浸潤癌部をレーザーマイクロダイセクションにより選択的に抽出し、各々からDNAおよびRNA抽出を行った。免疫染色ではIPMNを組織別にlow grade, high grade, 浸潤癌化病変の3群に分類し、シグナルの頻度と強度に応じスコア化した。RNAレベルでのエピゲノム制御関連遺伝子の発現についてもIPMN low gradeと、high gradeまたは浸潤癌化病変の2群間で定量的RT-PCRで比較した。



### 4. 研究成果

DNAメチル化の指標である5-メチルシトシン(5-mC)のレベルはIPMNの悪性化に伴い有意に低下した(図1; low grade:3.5, high grade: 2.5, 浸潤癌:1.6,  $p < 0.001$ )。またメチル化DNAの脱メチル化中間産物である5-ヒドロキシメチルシトシン(5-hmC)についても有意な低下を認めた(図2; low grade:2.0, high grade: 1.1, 浸潤癌:0.3,  $p < 0.001$ )。なお重要なことに、この傾向は、IPMN由来浸潤癌とIPMN併存膵発癌のいずれでも認められたことから、いずれもエピゲノム修飾が関与する可能性を裏付けた。

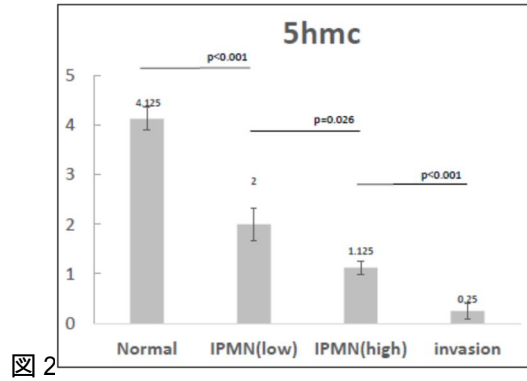
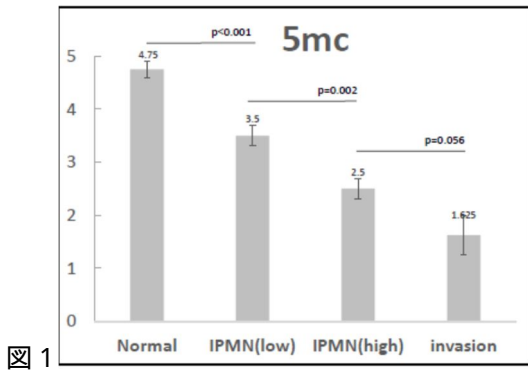
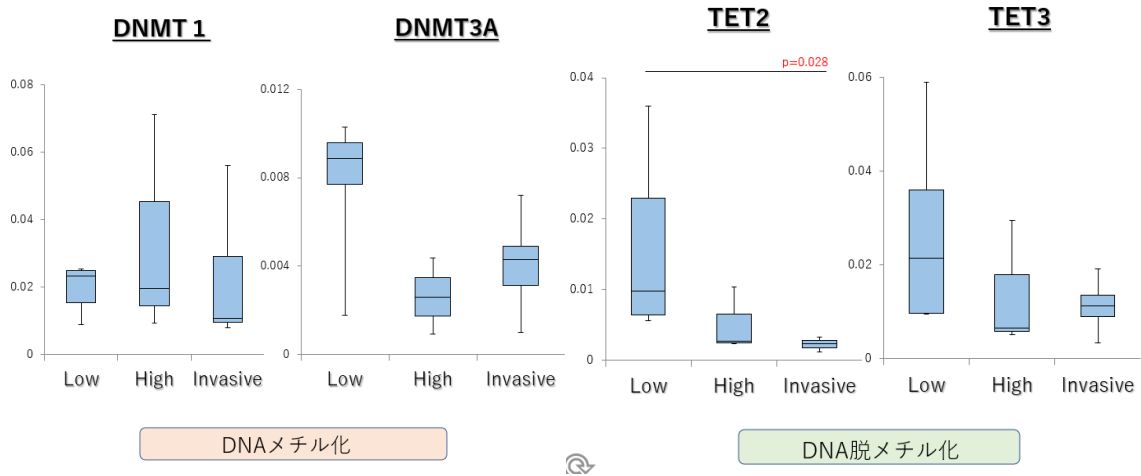


図 1

図 2

さらに IPMN low grade と、high grade または浸潤癌化病変の 2 群間で DNA メチル化酵素 DNMT1, DNMT3A DNMT3B および脱メチル化酵素 TET1, TET2, TET3 の遺伝子発現解析を行い、エピゲノムプロファイルとの比較解析を行った(下図)。IPMN 悪性化においても他の癌腫同様のメチル化関連遺伝子の発現変化がみられた。



本研究は、DNA メチル化/脱メチル化の標的遺伝子を探索することで、IPMN 悪性化の分子学的機序の手がかりを得られる可能性があることを示唆した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Oyama Hiroki, Tada Minoru, et al.	4. 巻 158
2. 論文標題 Long-term Risk of Malignancy in Branch-Duct Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 226 ~ 237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1053/j.gastro.2019.08.032	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 -

1. 著者名 Hamada Tsuyoshi, Oyama Hirok, Tada Minoru, et al.	4. 巻 30
2. 論文標題 ABO Blood Group and Risk of Pancreatic Carcinogenesis in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention	6. 最初と最後の頁 1020 ~ 1028
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1055-9965.EPI-20-1581	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐野誠, 高橋良太, 伊地知秀明, 宮林弘至, 石垣和祥, 水野卓, 中井陽介, 立石敬介, 多田稔, 小池和彦
2. 発表標題 血漿sVCAM-1とANP上昇は膵癌関連血栓症/血栓塞栓症の危険予測因子である
3. 学会等名 第51回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2020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	立石 敬介  (TATEISHI KEISUKE)  (20396948)	東京大学・医学部附属病院・講師    (12601)	

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
---------	---------