

令和 5 年 5 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17641

研究課題名（和文）腹膜偽粘液腫の発症・進展の分子機構の解明

研究課題名（英文）Genome-wide analysis of DNA methylation in pseudomyxoma peritonei originated from appendiceal cancer

研究代表者

高根 希世子 (Takane, Kiyoko)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：60756112

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：虫垂や卵巣を原発とする腫瘍が進展し、腹膜播種をきたす腹膜偽粘液腫 (Pseudomyxoma peritonei:PMP)は、腫瘍細胞から分泌されるゼラチン様物質が腹腔内に貯留し、腹部膨満や腹痛などの様々な症状を呈する。1患者の大多数は再発を繰り返し、再発に対する複数回の手術の実施など、患者のQOLは必ずしも高くない。今回我々は腫瘍検体15検体、非癌部粘膜8検体を用い、DNAメチル化網羅的解析を行った。その結果、PMPは少なくとも2群に分類されることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PMPは稀な腫瘍であるが、比較的早期に腫瘍が進展し、広範な腹膜転移をきたす。膵臓の乳管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN)も、高頻度にKRASおよびGNASの変異が認められ、PMPと共通した機序で腫瘍が発生または進展している可能性が高い。このことは、PMPの発がんメカニズム解明と、新たなバイオマーカー、治療標的分子の探索により、がんの転移の抑制や、IPMNや腹膜播種などの治療に役立つ可能性があることを意味している。

研究成果の概要（英文）：Pseudomyxoma peritonei (PMP) is a disease characterized by progressive accumulation of intraperitoneal mucinous ascites caused by neoplasms in the abdominal cavity. Although the advancement in surgical treatment with intraoperative chemotherapy has improved the survival of patients with PMP, most of the patients need repeated treatment, which is lowering their quality of life. Therefore, the development of effective therapeutic drug(s) is a matter of pressing concern. Genetic analyses and expression profile analyses of PMP have clarified the frequent activation of GNAS and/or KRAS. However, the involvement of global epigenetic alterations in PMPs has not been reported. In this study, we performed genome-wide DNA methylation analysis using 15 appendiceal PMP samples. As a result, we clarified that the 15 PMPs are classified into at least two epigenotypes, unique methylation epigenotype (UME) and normal-like methylation epigenotype (NLME).

研究分野：消化器外科学

キーワード：腹膜偽粘液腫 DNAメチル化 KRAS GNAS オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

虫垂や卵巣を原発とする腫瘍が進展し、腹膜播種をきたす腹膜偽粘液腫 (Pseudomyxoma peritonei:PMP)は、腫瘍細胞から分泌されるゼラチン様物質が腹腔内に貯留し、腹部膨満や腹痛などの様々な症状を呈する。100万人に1-2人の稀な疾患であり、5年生存率が30%~50%と報告されているが、患者の大多数は再発を繰り返し、再発に対する複数回の手術の実施など、患者のQOLは必ずしも高くない。近年我々は、腹膜偽粘液腫の低悪性度と高悪性度群の臨床検体を用い、アンプリコンシーケンスを行うことにより、発生に *KRAS*, *GNAS* 遺伝子変異が関わり、*TP53*, *PIK3-AKT pathway* 関連遺伝子が悪性化に関与することを見出した。PMPは組織学的に、disseminated peritoneal adenomucinosis (DPAM)、peritoneal mucinous carcinomatosis (PMCA)、peritoneal mucinous carcinomatosis with intermediate (PMCA-I)の3サブタイプに分類され、同じ病巣に存在しても個々の腫瘍で予後が大きく異なっている [Sugarbaker PHら, *Lancet Oncol*, 2006]。2014年頃からは全エクソーム解析が様々な研究グループから報告され、PMPの発生には *KRAS*, *GNAS* 遺伝子変異、悪性化に関わる *TP53* 遺伝子異常が関与すると明らかになった [Noguchiら, *Cancer Med*, 2015] [Nummelaら, *Int J Cancer*, 2015]。しかし、PMPの層別化や Fusion geneの有無、腫瘍発生・進展メカニズムの分子基盤は十分に解明されておらず、さらなる解明が急務といえる。

2. 研究の目的

本申請課題では、臨床検体での全ゲノム・RNA-Seq・メチル化解析を行い、PMPの発生・進展に関わる遺伝子変化を明らかにし、その治療標的遺伝候補を同定する。さらに、PMPの進展に関わる遺伝子群に関して、一般の大腸がんや腹膜播種との同異点を明らかにする。

3. 研究の方法

A) 臨床検体採取

国立国際医療研究センター外科において外科的に摘出された PMP 手術症例の腫瘍・正常粘膜のペア 20 検体を対象とし、凍結検体を薄切し、病理医によりスライドで腫瘍含有率が高いものを確認して使用する。腫瘍部分をマクロダイセクション及びレーザーマイクロダイセクションで回収し、RNA と DNA を回収する。非癌部の遺伝子背景の特徴も同時に解析するため、非癌部粘膜検体もスライドで確認した上で、DNA と RNA を抽出する。

B) 網羅的遺伝子解析

・ ビーズアレイ Infinium による DNA 異常メチル化解析

腫瘍検体、非癌部粘膜から抽出した DNA に対しバイサルファイト処理を行い、イルミナ社のビーズアレイ Infinium® を用いて DNA メチル化に関する網羅的解析を行い、PMP に特徴的な DNA メチル化プロファイルを作成する。抽出された代表的な遺伝子に対してはパイロシーケンス法、もしくはバイサルファイトシーケンス法による検証を行う。

・ エクソンシーケンスによる遺伝子変異解析

腫瘍検体から抽出した DNA に対し、代表的な遺伝子変異パネルを用いたエクソンシーケンスを行い、ゲノムにおける遺伝子変異に関する網羅的解析を行い、PMP に特徴的な遺伝子変異プロファイルを作成し、パイロシーケンス法もしくはメチル化特異的 PCR にて検証する。メチル化網羅的解析の層別化概念や TCGA の結果との比較検討も進める。

4. 研究成果

15 例の PMP 検体と正常粘膜 8 検体の網羅的 DNA メチル化解析を行った結果、PMP は少なくとも 2 群に分類されることを証明した (図 1)。

また、The Cancer Genome Atlas (TCGA) の 297 検体の大腸がんを TCGA の Infinium データに基づき 4 群 (High, Intermediate, Low, Normal-like エピジェノタイプ群) に分け、PMP と比較したところ、PMP は大腸がんの Normal-like と Low エピジェノタイプに群にのみ属することが判明した。

加えて、ビーズアレイ Infinium で解析された合計 13,756 個の高 CpG プローブ (平均

値 0.2)の中から、非癌性大腸組織と比較して 15 個の PMP で高メチル化されているプロンプを抽出した。統計解析の結果、合計 306 個のプロンプが同定され、その中には、UME-PMP と NLME-PMP で共通してメチル化されているが、正常検体ではメチル化されていない、2つのがん関連遺伝子 HOXD1 と TSPYL5 が含まれていた。

さらに 15 個の PMP において、DNA メチル化と臨床病理学的データとの間の可能な関連性を調べた。その結果 13,756 個の高 CpG プロンプの DNA メチル化レベルは、4 つの高グレード PMP と 11 個の低グレード PMP の間で有意差はなかった。しかし、4 つの高グレード PMP のうち 3 つは NLME-PMP に含まれ、残り的高グレード PMP は UME-PMP に含まれていました。統計的な有意性は認められなかったが、UME-PMP と比較して、NLME-PMP (5 個の NLME-PMP のうち 3 個) で高グレード PMP が増える傾向があることが判明した。また、高齢者 (65 歳以上) と若年者 (65 歳未満)、GNAS 変異を有する PMP と GNAS 変異を有しない PMP の間で、13,756 個のプロンプの総メチル化レベルに有意差は認められなかった。

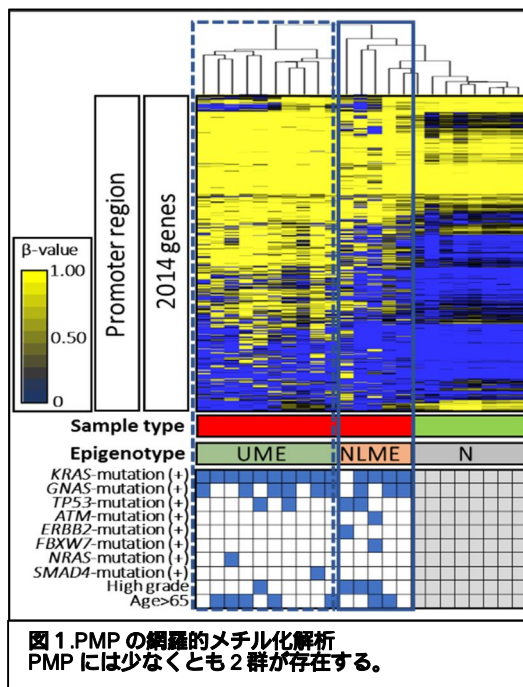


図 1. PMP の網羅的メチル化解析
PMP には少なくとも 2 群が存在する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Horie C, Zhu C, Yamaguchi K, Nakagawa S, Isobe Y, Takane K, Ikenoue T, Ohta Y, Tanaka Y, Aikou S, Tsurita G, Ahiko Y, Shida D, Furukawa Y.	4. 巻 24
2. 論文標題 Motile sperm domain containing 1 (MOSPD1) is up-regulated by the Wnt/ -catenin signaling pathway in colorectal cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 oncology letters	6. 最初と最後の頁 282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2022.13402	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 Yamaguchi K, Horie C, Takane K, Ikenoue T, Nakagawa S, Isobe Y, Ota Y, Ushiku T, Tanaka M, Fujishiro J, Hoshino N, Arisue A, Nishizuka S, Aikou S, Shida D, Furukawa Y	4. 巻 114
2. 論文標題 Identification of odontogenic ameloblast associated (ODAM) as a novel target gene of the Wnt/ -catenin signaling pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 948-960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15657	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 Yamaguchi K, Kasajima R, Takane K, Hatakeyama S, Shimizu E, Yamaguchi R, Katayama K, Arai M, Ishioka C, Iwama T, Kaneko S, Matsubara N, Moriya Y, Nomizu T, Sugano K, Tamura K, Tomita N, Yoshida T, Sugihara K, Nakamura Y, Miyano S, Imoto S, Furukawa Y, Ikenoue T.	4. 巻 66
2. 論文標題 Application of targeted nanopore sequencing for the screening and determination of structural variants in patients with Lynch syndrome.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Hum Genet.	6. 最初と最後の頁 1053-1060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-021-00927-9.	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 Liu X, Yamaguchi K, Takane K, Zhu C, Hirata M, Hikiba Y, Maeda S, Furukawa Y, Ikenoue T.	4. 巻 16
2. 論文標題 Cancer-associated IDH mutations induce Glut1 expression and glucose metabolic disorders through a PI3K/Akt/mTORC1-Hif1 axis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0257090
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0257090.	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10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池上恒雄, 山口貴世志, 笠島理加, 清水英悟, 高根希世子, 山口類, 井元清哉, 宮野悟, 古川洋一
2. 発表標題 ロングリードシーケンスによるリンチ症候群患者のミスマッチ修復遺伝子の構造異常の解析
3. 学会等名 日本人類遺伝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 七宮知之, 高根希世子, 山口貴世志, 池上恒雄, 藤幸知子, 米田美佐子, 甲斐知恵子, 古川洋一
2. 発表標題 ポリオウイルス受容体PVRL4はFOSによって転写制御される
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 蔡庭偉, 高根希世子, 山口貴世志, 池上恒雄, 太田泰徳, 合田良政, 清松知充, 矢野秀朗, 古川洋一
2. 発表標題 虫垂原発腹膜偽粘液腫の網羅的DNAメチル化解析
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 七宮知之, 高根希世子, 山口貴世志, 池上恒雄, 藤幸知子, 米田美佐子, 甲斐知恵子, 古川洋一
2. 発表標題 ポリオウイルス受容体PVRL4はFOSによって転写制御される
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kiyoko Takane, Tingwei Cai, Kiyoshi Yamaguchi, Tsuneo Ikenoue, Yasunori Ohta, Yoshimasa Gohda, Tomomichi Kiyomatsu, Hideaki Yano, Yoichi Furukawa
2. 発表標題 Genetic analysis of pediatric malignant peritoneal mesothelioma
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kiyoko Takane, Kiyoshi Yamaguchi, Tsuneo Ikenoue, Yoshimasa Gohda, Tomomichi Kiyomatsu, Hideaki Yano, Masaki Fukuyo, Motoaki Seki, Atsushi Kaneda, Yoichi Furukawa
2. 発表標題 Analysis of genome-wide DNA methylation in pseudomyxoma peritonei originated from appendiceal and ovarian cancer
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoyuki Nanamiya, Kiyoko Takane, Kiyoshi Yamaguchi, Tsuneo Ikenoue, Tomoko Fujiyuki, Misako Yoneda, Chieko Kai, Yoichi Furukawa
2. 発表標題 PVRL4, a receptor for measles virus, is transcriptionally regulated by FOS
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松浦 基樹、西村 庸子、玉手 雅人、磯山 響子、寺田 倫子、岩崎 雅宏、磯部 友見子、畠山 晴良、高根 希世子、山口 貴世志、池上 恒雄、古川 洋一
2. 発表標題 進行卵巣癌における腹水細胞診の意義
3. 学会等名 第62回 日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松浦 基樹、玉手 雅人、西村 庸子、磯山 響子、寺田 倫子、岩崎 雅宏、磯部 友見子、畠山 晴良、高根 希世子、山口 貴世志、池上 恒雄、古川 洋一、斎藤 豪
2. 発表標題 子宮体がんスクリーニングにおける子宮内膜液状化細胞診検体を用いた遺伝子解析の有用性
3. 学会等名 第52回 日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高根 希世子、山口 貴世志、池上 恒雄、藤幸 知子、米田 美佐子、甲斐 知恵子、古川 洋一
2. 発表標題 麻疹ウイルス受容体PVRL4はBACH1により転写調節される
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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