

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06889

研究課題名（和文）膵胆管系腫瘍の早期診断と治療の為にバイオマーカー探索

研究課題名（英文）Biomarker investigation of Pancreatobiliary neoplasm for early diagnosis and treatment

研究代表者

東 美智代（Higashi, Michiyo）

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・准教授

研究者番号：60315405

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）：膵胆管系患者の胆汁や膵液中から細菌叢由来のDNAを抽出し解析を行った。確認された細菌群と、患者の腫瘍の存在部位、腫瘍型や予後など臨床情報との関連を調べた。ある種の細菌群はリンパ節転移の有無と相関があることを見出した。また患者予後とも関連があることを見出したが、肝内胆管癌では予後良好因子であり、膵癌では予後不良因子であった。以上のことから、膵胆管系腫瘍では胆汁中の細菌叢はバイオマーカーとなりうることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵胆管系腫瘍は現在でも早期発見が困難な難治性腫瘍の1つである。正確な診断及び適切な診断のためには、病変部の生検による病理学的診断が必須であるが、解剖学的位置などから困難な場合も多い。また検診などのスクリーニングに用いる検査は限られており、感度や特異度に問題がある。本研究で、比較的低侵襲で確実に採取される胆汁の解析が病理学的診断や予後と相関していることが明らかとなった。将来的には膵胆管系腫瘍のスクリーニングに胆汁を用いた解析が有効である可能性が示唆され、早期診断に役立つツールとなり、膵胆管系腫瘍の患者予後改善につながる事が望まれる。

研究成果の概要（英文）：We extracted microbiome-derived DNA from the bile juice in surgically resected gallbladders. We found a significant difference on the relative abundance of certain microbes between patients without and with lymph node metastasis. There was a significant association between the relative abundance of certain microbes and overall survival prognosis. These microbes showed association with good prognosis in cholangiocarcinoma, but with poor prognosis in pancreatic adenocarcinoma. Our findings suggest that pancreatobiliary tract cancer patients have an altered microbiome composition, which might be a biomarker for distinguishing malignancy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：病理学 膵胆道系腫瘍 ムチン抗原 MUC methylation 機械学習

1. 研究開始当初の背景

膵胆管系腫瘍は、予後不良な悪性腫瘍の一つである。膵胆管系腫瘍での根治的治療は手術療法であるが、手術可能なのは患者全体の20-30%程度しかない。しかも手術後でも5年生存率は20%程度と消化器系の癌では最も低い。しかし、腫瘍径1cm以下で発見された場合の5年生存率は80%に及ぶことも報告されており、膵胆管系腫瘍の早期診断あるいはその予後因子の確定が望まれている。また膵腫瘍のなかで予後良好であるIPMNにも時に悪性化が認められるが、侵襲の大きい手術に踏み切る明確なエビデンスの樹立が求められている。

申請者のグループは、MUC1(膜結合ムチン)の発現は不良な予後に関連し、MUC2(分泌ムチン)の発現は良好な予後に関連していることを世界に先駆けて報告してきた。膵胆管系腫瘍のみならず、他臓器の腫瘍においても同様の傾向があることも報告してきた。また、MUC4(気管支型膜結合ムチン)が、膵胆管系の腺癌に共通する独立予後不良因子であることを発見した。申請者らは、浸潤性膵管癌(IDC)においてムチン発現パターンが予後不良因子であることも報告してきた。すなわち、MUC1、MUC4はIDCにおいて高率に陽性であり、MUC4陽性例では予後が優位に不良である。

特にIPMNにおいては、MUC1とMUC2の発現と臨床病理学的・臨床疫学的データの組み合わせより、実戦的臨床応用に役立つ新しい組織分類をも提案してきた。これらMUC1、MUC2、MUC4にMUC5AC(胃型ムチン)を加えた膵腫瘍におけるムチンの発現パターンは以下の通りである。すなわち、(1)MUC5ACが陽性であると膵管上皮内腫瘍性病変(PanIN)や膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)のような前癌病変も含めて“なにか”の病変がある；(2)MUC2が陽性であると浸潤性膵管癌(IDC)に移行しやすいIPMN-intestinal typeがある；(3)MUC1が陽性であるとIDC相当の悪性病変がある；(4)MUC4が陽性であると特に悪性度の高いIDCがある。

これらの結果を踏まえ、ムチン抗原発現の検討が、腫瘍の質的診断のみでなく、早期診断あるいは治療効果予測に応用可能であることを明らかにすることを着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、膵胆管系腫瘍の予後因子であるムチン抗原発現の検討を基盤とし、術前生検検体などでの解析が腫瘍の質的診断のみでなく、早期診断あるいは治療効果予測に応用可能であることを明らかにする。また切除検体での病理組織学的な詳細な検討と術前治療等を含む臨床的因子との関連も解析し、治療選択に直結したマーカーの確立を目指す。

本研究は以下の2つを目的とする。

EUS-FNA 検体でのムチン発現検討による診断並びに治療抵抗性の予測確立

膵液や胆汁検体でのメチル化状態の検討による予後予測の確立

排出液である膵液や胆汁の検索が、実臨床に即役立つ膵胆管系腫瘍の新しい腫瘍マーカーとして確立、というブレークスルーが得られる可能性があり、最も難治性である膵胆管系癌の治療法への新展開も期待できる。応募者の研究分野の病理学という形態学的な研究手法と、エビジェネティクス機構を中心とした分子生物学の研究手法を有機的に結びつける。さらに内科学・外科学分野と共同で膵液・胆汁という臨床検体を解析するという、基礎的研究から臨床応用までの橋渡的・横断的な研究を一期的・総合的に行い、手術適応や術式の選択といった臨床への還元を確立していく。早期段階での発見が極めて困難な膵胆管癌を、近年発達のめざましい画

像診断と組み合わせることにより、的確に診断できるシステムを構築する点が革新的・独創的であると考えます。

3. 研究の方法

1) 膵液等からの各ムチンコア蛋白遺伝子の mRNA 検出ならびにムチン蛋白の検出

膵胆管系腫瘍患者から、術前あるいは摘出検体から膵液、胆汁、膵胆管組織を採取した。また比較対象として、非腫瘍性疾患(膵胆管合流異常や胆管炎など)患者から得られた組織も採取した。これらの検体から各種ムチン発現に関連する mRNA、その mRNA 発現の制御に関わっているプロモーター領域のエピジェネティクス情報をも総合的に検索した。また、ELISA や Western blotting 等も行い、ムチン蛋白の検出も試みる。同時に DNA 抽出も行い、次項のメチル化状態の検討に用いた。既に行った浸潤性膵管癌の膵液の解析では、mRNA あるいは DNA の抽出ならびに解析に成功している。対象疾患を拡大し同様の解析を行った。以上の検討は研究分担者・横山及び研究協力者・松尾、大学院生が行ない、研究代表者が指導及び統括した。

2) ムチンコア蛋白遺伝子 DNA プロモーター領域のメチル化状態の検討

我々は人体内での各種のムチン発現を調節しているのが、プロモーター領域メチル化によって規定されていることを明らかにしてきた。従来までの DNA メチル化検出限界 5% を超える 0.1% の感度を有する新規検出法を開発しており(国際特許公開番号:WO 2011/132798)、その方法を用いて解析している。膵液では浸潤性膵管癌、IPMN-intestinal type、IPMN-gastric type 毎に特徴的なパターンのバンドを示し、質的診断をし得る可能性を示し報告した(Yokoyama, et al: PLOS One. 2014 国際特許公開番号:WO 2013/002422)。また浸潤性膵管癌において、ムチン遺伝子の脱メチル化が予後と有意に関連していることを示した(図 3: Yokoyama, et al: Clin Cancer Res. 2020)。膵液での診断精度向上とともに胆汁での解析も行った。これらの検討は主に研究分担者である横山及び研究協力者・松尾、大学院生が行ない、研究代表者が指導及び統括した。

3) 病理組織標本の解析

EUS-FNA 検体を含めた生検検体、摘出標本を用い組織形態学的検討を行うとともに、ムチンやムチンに関連した免疫染色などを行った。これらの検討と平行し画像情報や予後を含む臨床的情報の収集を行い、最終的に、膵液・胆汁液のエピジェネティクス解析が、どれほどの正確さで膵胆管系腫瘍の質的診断や予後等の予測が可能であるかを確認した。

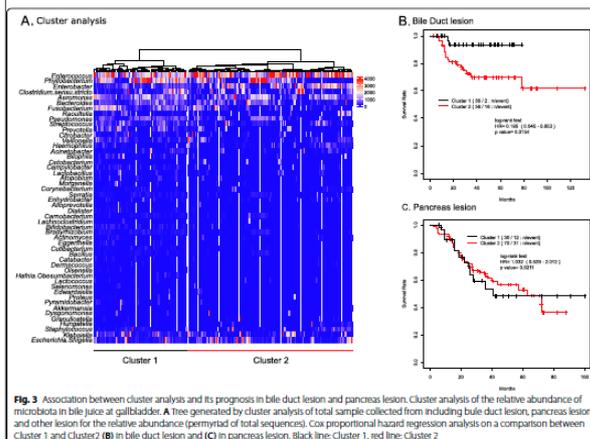
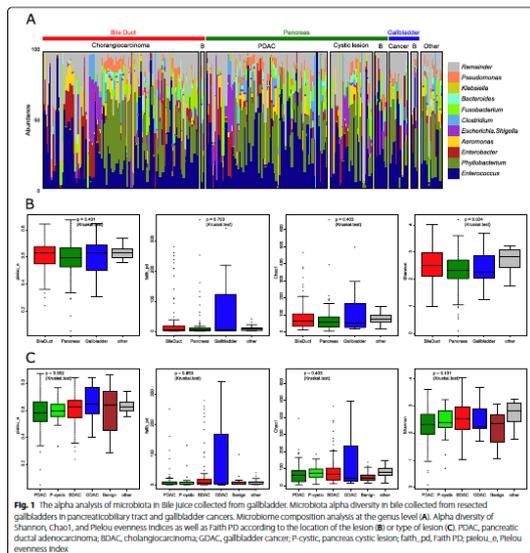
腫瘍でのムチン発現のみでなく予後データ等も併せて比較検討し、前述した分子病理学的手法で得られた結果が、腫瘍の質的診断を反映しているかどうか判断していった。なお、研究代表者は、内科学分野、外科学分野、放射線学分野と共同研究体制を既に形成しており、定期的なカンファレンス等で情報を共有している。

4. 研究成果

膵胆管系腫瘍及び胆嚢癌患者での胆汁を用いた検討

244 症例の膵胆管系腫瘍及び胆嚢癌患者から手術時に採取した胆汁を用いた。胆汁から得られた微生物叢の DNA を抽出して比較検討した。微生物叢は腫瘍の存在部位や組織型などとの関連性は認めなかった。しかし、*Campylobacter*, *Citrobacter* などのある特定の細菌群とリンパ節転移の有無との関連を認めた。また、特定の細菌群が豊富であることと今回の解析での患者

予後全体との相関性を認めた。これらの細菌群は肝内胆管癌では良好な予後と関連していたが、膵癌では予後不良因子であった。これらの結果についての合理的な説明は現時点では困難であるが、膵胆管系腫瘍では胆汁中の細菌群が健常者と異なっていることが示唆された。このことは胆汁の解析によって膵胆管系腫瘍の診断や予後予測ができる可能性があることを示唆している。



膵 IPMN の嚢胞液を用いた解析も行い、一定の成果を上げることができた。以上のように、胆汁や膵液などの解析結果が、腫瘍の組織型や予後と関連していることを証明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kirishima M, Yokoyama S, Matsuo K, Hamada T, Shimokawa M, Akahane T, Sugimoto T, Tsurumaru H, Ishibashi M, Mataki Y, Ootsuka T, Nomoto M, Hayashi C, Horiguchi A, Higashi M, Tanimoto A	4. 巻 22
2. 論文標題 Gallbladder microbiota composition is associated with pancreaticobiliary and gallbladder cancer prognosis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Microbiol.	6. 最初と最後の頁 147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12866-022-02557-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hozaka Y, Oi H, Satake S, Uchino Y, Goto Y, Idichi T, Tanoue K, Yamasaki Y, Kawasaki Y, Mataki Y, Kurahara H, Nakajo A, Higashi M, Tanimoto A, Sugiura T, Ohtsuka T	4. 巻 173
2. 論文標題 Are intratumoral microbiota involved in the progression of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas?	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Surgery	6. 最初と最後の頁 503-510
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.surg.2022.10.003.	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 Yokoyama S, Iwaya H, Akahane T, Hamada T, Higashi M, Hashimoto S, Tanoue S, Ohtsuka T, Ido A, Tanimoto A	4. 巻 50
2. 論文標題 Sequential evaluation of MUC promoter methylation using next-generation sequencing-based custom-made panels in liquid-based cytology specimens of pancreatic cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagn Cytopathol.	6. 最初と最後の頁 499-507
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dc.25022	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 Naito Y, Tsuneki M, Fukushima N, Koga Y, Higashi M, Notohara K, Aishima S, Ohike N, Tajiri T, Yamaguchi H, Fukumura Y, Kojima M, Hirabayashi K, Hamada Y, Norose T, Kai K, Omori Y, Sukeda A, Noguchi H, Uchino K, Itakura J, Okabe Y, Yamada Y, Akiba J, Kanavati F, Oda Y, Furukawa T, Yano H	4. 巻 11
2. 論文標題 A deep learning model to detect pancreatic ductal adenocarcinoma on endoscopic ultrasound-guided fine-needle biopsy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 6454
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-87748-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 橋元 慎, 児島 一, 川平 真, 樋之口 真, 岩屋 博, 有馬 志, 田之上 史, 蔵原 弘, 又木 雄, 熊谷 雄, 伊藤 宗, 林 完, 福倉 良, 東 美, 大塚 隆, 井戸 章。	4. 巻 5
2. 論文標題 【各施設での胆膵疾患に対する診療科横断的チーム医療】鹿児島大学病院での胆膵疾患に対するチーム医療。	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 胆と膵	6. 最初と最後の頁 475-80.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Noguchi H, Higashi M, Idichi T, Kurahara H, Mataki Y, Tasaki T, Kitazono I, Ohtsuka T, Tanomoto A.	4. 巻 9
2. 論文標題 Rare histological subtype of invasive micropapillary carcinoma in the ampulla of Vater: A case report.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World J Clin Cases.	6. 最初と最後の頁 2671-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12998/wjcc.v9.i11.2671	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 横山 勢也, 霧島 茉莉, 東 美智代
2. 発表標題 DNAメチル化解析による胆管癌術後予後予測手法の構築
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 能美 昌子, 東 美智代, 横山 勢也, 谷本 昭英, 瀧口 翔也, 藪田 愛, 利光 鏡太郎, 井戸 弘毅
2. 発表標題 局所内進展にとどまる胆嚢癌におけるムチン発現の検討
3. 学会等名 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横山勢也、霧島茉莉、東美智代
2. 発表標題 膵胆管系癌と胆嚢中微生物叢との関連
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東美智代
2. 発表標題 WHO 2019の変更点 IPNBの病理所見
3. 学会等名 断層映像研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 児島 一成, 岩屋 博道, 豊留 孝史郎, 川平 真知子, 樋之口 真, 有馬 志穂, 田ノ上 史郎, 橋元 慎一, 東 美智代, 大塚 隆生, 井戸 章雄
2. 発表標題 膵神経内分泌腫瘍の集学的治療 当院における遠隔転移を有するPanNENに対する集学的治療の現状について
3. 学会等名 日本膵臓学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Michiyo Higashi, et al. Editor; Akihide Kameyama	4. 発行年 2024年
2. 出版社 Humana Press	5. 総ページ数 417
3. 書名 Methods in Molecular Biology	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 癌の判定装置、癌の情報取得方法及びプログラム	発明者 横山勢也、東美智代、谷本昭英	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-160396	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

鹿児島大学病理学教室サイト
<https://pathology-kagoshima.jp>

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	横山 勢也 (Yokoyama Seiya) (20569941)	鹿児島大学・医歯学域医学系・助教 (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
---------	---------