

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791406

研究課題名(和文)一塩基多型を利用した新たな膵癌予測因子の開発とテーラーメイド治療への応用

研究課題名(英文)Discovery of novel predictive factor for pancreatic cancer and application for tailor-made treatment by use of single nucleotide polymorphism

研究代表者

山田 豪 (Yamada, Suguru)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：30467287

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)：膵癌細胞株、膵癌とIPMNの臨床検体により、「C-460T」と「G+405C」VEGF SNPを測定し、生存成績、臨床病理学的因子との相関、IPMN症例においては悪性化との相関を解析した。IPMN症例では、VEGF +405C/Cは+405G/Gと比較してIPMC(悪性化症例)に有意に多く認められ、+405Cアレルは+405Gアレルと比較してIPMNの悪性化と有意に相関していた。分枝膵管型IPMNでは、VEGF +405C/CはIPMCにおいて有意に多く認められ、胃型でもより多く認められる傾向であった。

研究成果の概要(英文)：A total of 169 IPMN and 108 pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) patients were enrolled, and VEGF +405G/C and 460C/T SNPs were investigated. VEGF +405C/C was found more frequently in malignant IPMNs compared with +405G/G, and +405C allele was associated with malignant IPMNs compared with +405G. In branch duct IPMNs, VEGF +405C/C was significantly associated with malignant transformation, and there was a trend of VEGF +405C/C associated with malignant transformation of gastric type IPMNs. VEGF +405G/C SNP was significantly associated with malignant transformation in IPMNs, especially branch duct and gastric type IPMNs. VEGF +405G/C SNP might be helpful in predicting clinical course in pancreatic disease with potential for malignant transformation.

研究分野：消化器外科学

キーワード：一塩基多型 膵癌 IPMN VEGF

1. 研究開始当初の背景

ある生物種集団のゲノム塩基配列中には一塩基が変異した多様性が見られ、その変異が集団内において1%以上の頻度で認められる時、一塩基多型 (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) と呼ぶ。ヒトの場合には約30億個の塩基があり、1000~2000個に1個の割合で各個人により異なる配列部分が存在するため、数100万個のSNPが存在すると言われている。このSNPにより、ある遺伝子から体内で生成される酵素などのタンパク質の機能が変化すると、特定の疾患に罹患し易くなったり、薬剤に対する感受性が異なったりする。消化器癌領域においても、SNPの解析は経過観察中の患者における癌発生のリスク評価や、抗癌剤の感受性予測に有用と考えられ、いわゆる「テーラーメイド治療」を実現する有力な手段となり得る。膵癌の発生や進展においてはVEGF (Vascular endothelial growth factor) の関与が指摘されている。VEGFは主に血管内皮細胞表面にあるVEGF受容体に結合し、チロシンキナーゼが活性化することによって細胞内にシグナルが伝達され、細胞分裂や遊走、分化を刺激したり、微小血管の血管透過性を亢進させたりする働きをもつ。VEGFの過剰発現は腫瘍の血管増生や転移と関連し、様々な癌においてVEGFを標的とした分子標的治療が進められている。しかし、食道・胃・大腸癌におけるVEGF SNPに関する研究は散見されるが、膵癌においてはこれまでにTalar-Wojnarowska Rらの報告しか認めない (J Physiol Pharmacol. 2010)。それによれば、血清から採取したDNAの多型と血清VEGF値が膵癌と関連していることが示されたが、癌組織由来DNAの多型に関しては研究されていない。また、人種による相違も予想される。

われわれは、ハーバード大学医学部マサチューセッツ総合病院で、肝硬変患者のEGF (Epidermal growth factor) におけるSNPの研究を行い、2008年にその結果を報告した (Tanabe KK, Fujii T, Fuchs BC. JAMA. 2008)。本研究では、アメリカ人とフランス人の肝硬変患者を対象とし、肝細胞癌の発症に関与しているEGFにおける、61*G alleleのSNPと、血中および肝組織内でのEGFレベルを測定した。その結果、61*G alleleのG/G患者群はA/A患者群と比較し、有意にEGFレベルが上昇しているだけでなく、肝細胞癌発症のリスクが高まることが証明された。また、816人のC型肝炎による肝硬変患者を対象として検証し、報告した (Abu Dayyeh BK, Fuchs BC, Yamada S, Tanabe KK, Gastroenterology. 2011)。肝細胞癌の発症においては人種間による相違が指摘されており、日本人の肝硬変

および肝細胞癌患者における研究を教室で鋭意進めているところである。一方、教室では膵癌の克服を主たるテーマに据え外科的切除を積極的に進めてきた。他の癌種でも着目されており、膵癌の発生や進展においても関与が指摘されているものの、これまで研究成果が十分に報告されていない VEGF (Vascular endothelial growth factor) を、SNPの視点から解析する意義は高いと判断した。

本申請前に、200例の膵癌切除検体に対して VEGF SNP を検索してきた。これまでの研究によれば、膵癌症例にも VEGF SNP が存在し、血中や組織での VEGF 発現レベルに差があることが示唆されている。従って、教室で集積した膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) を含む膵疾患症例に検索をひろげ、臨床病理学的因子や治療経過との相関を統計学的に解析することにより、VEGFのSNPがどのように膵癌の進展や予後、薬物療法に対する感受性に影響しているかをより高い精度で検討することを考えた。特に、IPMNは経過観察中に良性の腫瘍から悪性化するという、いわゆる「adenoma-carcinoma sequence」の性格を持ち合わせているため、どの時点で手術適応と判断するかは極めて重要な問題であり、国内および海外の学会においても現時点では議論の多いところである。以上より、今回、研究対象を拡大することにより、膵癌のテーラーメイド治療に寄与するのみならず、IPMNの治療方針においても新たな展開を生み出す可能性がある。

膵癌における VEGF SNP の研究は、これまでほとんどなされてこなかった。一方、膵癌の化学療法は確実に進歩してきたものの、いまだ満足できる結果は得られてはいない。本邦では、EGFR 阻害剤である erlotinib が保険承認されたが、実地臨床における実感としては十分な治療効果が得られていない。しかし、薬物療法の進歩は今後も分子標的治療薬によるところが大きいと予測され、VEGF をターゲットとする薬剤も次々に開発されている。従って、本研究は単なる予後因子の検索ではなく、テーラーメイド治療につながる可能性を秘めている。また、IPMNにおける VEGF SNP を調べ、本疾患の将来的な癌化を予測することが可能となれば、IPMNの自然史をめぐる議論において革命的なエビデンスを創出することとなり、この点だけをとっても極めて意義のある研究と考えた。

2. 研究の目的

膵癌は依然として予後不良であり、早期の診断、治療が望まれている。一方、粘液産生性膵腫瘍 (IPMN) は膵癌に発展する可能性

を有するため、その治療は膵癌に対する早期治療につながり得るが、すべてが癌化するとは限らないため、経過観察の方法や手術適応に関してはいまだに議論が多い。本研究では、膵癌の発生や進展に寄与する因子とされる Vascular endothelial growth factor (VEGF) に着目し、まずは、現段階で十分な検索のなされていない VEGF の一塩基多型 (SNP) と膵癌の臨床病理学的因子との相関を明らかにする。さらに、IPMN でも同様の検討を行い、その治療指針、特に手術適応決定に際しての指標としての可能性を追求した。

3. 研究の方法

当教室において外科的切除を施行した膵癌と IPMN 症例、そしてコントロールとしての良性疾患から DNA を抽出し、VEGF における「C-460T」と「G+405C」のジェノタイプングを Restriction fragment-length polymorphism (RFLP) 法により行う。次に、これらの凍結標本から RNA を抽出し、real-time PCR 法によって組織中の VEGF レベルを測定する。さらに、血清からは ELISA 法により VEGF レベルを測定する。以上の結果を、データベース内にある膵腫瘍の臨床病理学的因子や予後により、統計学的に解析を試みる。

(1) 平成 24 年度

膵癌および IPMN 切除標本の FFPE より、QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN) により DNA の抽出を行う。同時に、良性疾患 (胆石症、慢性膵炎、膵嚢胞) の FFPE をコントロール群とし、同様に DNA 抽出を行う。VEGF のジェノタイプングは、Restriction fragment-length polymorphism (RFLP) 法により行う。VEGF SNP としては、Talar-Wojnarowska R らの報告した、「C-460T」と「G+405C」を検索することとする (J Physiol Pharmacol. 2010)。まずは、膵癌細胞株と膵良性腫瘍細胞株を使用し、これらの VEGF SNP を RFLP 法により調べる。次に、膵癌と IPMN 切除標本から抽出された DNA を用い、「C-460T」と「G+405C」のジェノタイプングを行うこととする。

(2) 平成 25 年度

膵癌、IPMN および良性疾患の凍結標本から、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) により RNA の抽出を行う。これらから cDNA を作成した後、real-time PCR 法により組織レベルでの VEGF 発現を調べる。さらに、同じ症例の血清を使用することにより、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法にて血中の VEGF レベルも測定する。以上より得られたデータを、統計学的に解析する。

(3) 平成 26 年度

本研究は、全症例数が 500 例以上となる大規模な研究となるため、当初の計画よりも実験が遅れる可能性も考えられる。特に、FFPE からの DNA 抽出のステップにおいてはかなりの時間を要すると予想される。従って、平成 26 年度はその補充のための時間とする。

4. 研究成果

教室に所有する膵癌細胞株と膵良性腫瘍細胞株を使用して VEGF SNP status を測定し、引き続き、教室における膵癌ならびに IPMN 切除症例の臨床検体を用いて研究を進めることとした。検体の FFPE からの DNA 抽出に関する過程に難渋したため、当初予定した症例数には満たなかったが、結果的には 108 例の膵癌症例、169 例の IPMN 症例の「C-460T」と「G+405C」VEGF SNP をそれぞれ測定し、生存成績、臨床病理学的因子との相関、また、IPMN 症例においては悪性化との相関を統計学的に解析した。

その結果、膵癌症例においては、各々の SNP status と臨床病理学的因子との相関は明らかではなかった。一方、IPMN 症例においては、VEGF +405C/C は +405G/G と比較して、IPMN (悪性化症例) に有意に多く認められており (オッズ比: 2.7、P=0.04、図 1)、+405C アレルは +405G アレルと比較して、IPMN の悪性化と有意に相関していた (P=0.05、図 2)。また、分枝膵管型 IPMN においては、VEGF +405C/C は IPMN において有意に多く認められた (CC vs. GG; オッズ比: 4.0、P=0.03、CC vs. CG+GG; オッズ比: 3.3、P=0.04)。さらにまた、IPMN を形態学的に 4 型に分類した場合、胃型においては VEGF +405C/C がより多く認められる傾向であった (CC vs. GG; オッズ比: 3.0、P=0.07)。

図 1. The genotype distribution of VEGF gene polymorphisms, +405G/C, -460C/T between patients with malignant IPMNs and benign IPMNs

		Malignancy (n=80)	Benign (n=85)	P-value
VEGF +405G/C	GG	22 (27.5%)	33 (38.8%)	
	GC	42 (52.5%)	43 (50.6%)	
	CC	16 (20.0%)	9 (10.6%)	
Logistic regression analysis OR (95% CI)	CC vs GG	2.7 (1.0-7.3)		0.04*
	CC vs CG	1.8 (0.7-4.7)		0.20
	CG vs GG	1.4 (0.7-2.9)		0.27
	CC vs CG+GG	2.1 (0.9-5.3)		0.09
VEGF -460C/T	CC	5 (6.2%)	13 (15.3%)	
	CT	39 (48.8%)	34 (40.0%)	
	TT	36 (45.0%)	38 (44.7%)	
Logistic regression analysis OR (95% CI)	CT vs CC	3.0 (1.0-10.1)		0.05*
	CT vs TT	1.2 (0.6-2.3)		0.56
	TT vs CC	2.5 (0.8-8.3)		0.10
	CT vs CC+TT	1.4 (0.3-2.7)		0.26

* statistically significant

図2. The allele distribution of VEGF gene polymorphisms, 405 G/C, -460C/T between malignant IPMNs and benign IPMNs

VEGF +405G/C					
	allele C	allele G	Odds ratio (C/G)	95% confidence interval (CI)	P-value
Malignancy	74	86	1.5	1.0-2.4	0.05*
Benign	61	109			
VEGF -460C/T					
	allele C	allele T	Odds ratio (C/T)	95% confidence interval (CI)	P-value
Malignancy	49	111	0.8	0.5-1.3	0.37
Benign	60	110			

* statistically significant

次に、生存期間中央値について検討すると、膵癌においては SNP status による差は認められなかった。一方、IPMN 症例において VEGF +405G/C の SNP status により生存期間中央値を検討すると、VEGF +405C/C: 27.9 ヶ月、GC: 17.5 ヶ月、GG: 23.3 ヶ月ではあったものの、統計学的には群間に有意差を認めなかった (図3~図6)。

以上の結果につき、論文報告を行った。

図3. Correlation Between VEGF +405G/C Polymorphism and Clinicopathological Parameters of IPMNs

Variables	G/G (%)	G/C (%)	C/C (%)	P
Age				
≥ 67	28 (31.5)	49 (55.0)	12 (13.5)	0.62
≤ 66	29 (36.3)	38 (47.5)	13 (16.2)	
Sex				
Male	33 (31.4)	55 (52.4)	17 (16.2)	0.66
Female	24 (37.5)	32 (50.0)	8 (12.5)	
Tumor location				
Head	38 (32.8)	63 (54.3)	15 (12.9)	0.46
Body / tail	19 (35.8)	24 (45.3)	10 (18.9)	
Main pancreatic duct diameter, mm				
≥ 5	30 (34.1)	45 (51.1)	13 (14.8)	0.97
< 5	23 (32.4)	37 (52.1)	11 (15.5)	
Cystic diameter, mm				
≥ 30	26 (31.7)	45 (54.9)	11 (13.4)	0.69
< 30	29 (35.8)	39 (48.1)	13 (16.1)	
Mural nodule				
Yes	40 (32.3)	65 (52.4)	19 (15.3)	0.79
No	43 (34.4)	62 (49.6)	6 (13.3)	
Carbohydrate antigen 19-9, U/ml				
≥ 37	12 (30.0)	23 (57.5)	5 (12.5)	0.67
< 37	43 (34.4)	62 (49.6)	20 (16.0)	
Macroscopic type				
MD-IPMN	17 (29.8)	29 (50.9)	11 (19.3)	0.46
BD-IPMN	40 (35.7)	58 (51.8)	14 (12.5)	
Morphological subtype				
Gastric type	43 (35.0)	66 (53.6)	14 (11.4)	0.07
Intestinal type	12 (28.6)	19 (45.2)	11 (26.2)	

* statistically significant

図4. The Genotype Distribution of VEGF Gene Polymorphisms +405G/C and -460C/T Between Patients With Malignant IPMNs and Benign IPMNs Based on Macroscopic Type

MD-IPMNs				
		Malignancy (n=80)	Benign (n=18)	P-value
VEGF +405G/C	GG	10 (27.1%)	6 (33.3%)	
	GC	20 (54.0%)	8 (44.4%)	
	CC	7 (18.9%)	4 (22.3%)	
Logistic regression analysis OR (95% CI)	CC vs GG	1.0 (0.4-5.6)		0.95
	CC vs CG	0.7 (0.2-2.5)		0.64
	CG vs GG	1.5 (0.4-5.6)		0.54
	CC vs CG+GG	0.8 (0.2-3.5)		0.78
VEGF -460C/T	CC	1 (2.8%)	2 (11.2%)	
	CT	18 (48.6%)	8 (44.4%)	
	TT	18 (48.6%)	8 (44.4%)	
Logistic regression analysis OR (95% CI)	CT vs CC	4.5 (0.4-105.4)		0.23
	CT vs TT	1.0 (0.3-3.3)		1.00
	TT vs CC	4.5 (0.4-105.4)		0.23

BD-IPMNs				
		Malignancy (n=43)	Benign (n=67)	P-value
VEGF +405G/C	GG	12 (27.9%)	27 (40.3%)	
	GC	22 (51.2%)	35 (52.2%)	
	CC	9 (20.9%)	5 (7.5%)	
Logistic regression analysis OR (95% CI)	CC vs GG	4.0 (1.2-15.7)		0.03*
	CC vs CG	2.9 (0.9-10.4)		0.08
	CG vs GG	1.4 (0.6-3.4)		0.43
	CC vs CG+GG	3.3 (1.0-11.4)		0.04*
VEGF -460C/T	CC	4 (9.3%)	11 (16.4%)	
	CT	21 (48.8%)	26 (38.8%)	
	TT	18 (41.9%)	30 (44.8%)	
Logistic regression analysis OR (95% CI)	CT vs CC	2.2 (0.7-8.9)		0.21
	CT vs TT	1.3 (0.6-3.1)		0.48
	TT vs CC	1.6 (0.5-6.7)		0.58

* statistically significant

図5. The Genotype Distribution of VEGF Gene Polymorphisms +405G/C and -460C/T Between Patients With Malignant IPMNs and Benign IPMNs Based on Morphological Subtype

Gastric type				
		Malignancy (n=48)	Benign (n=75)	P-value
VEGF +405G/C	GG	13 (27.0%)	30 (40.0%)	
	GC	27 (56.3%)	39 (52.0%)	
	CC	8 (16.7%)	6 (8.0%)	
Logistic regression analysis OR (95% CI)	CC vs GG	3.0 (0.9-11.1)		0.07
	CC vs CG	1.7 (0.6-6.5)		0.27
	CG vs GG	1.6 (0.7-3.7)		0.26
	CC vs CG+GG	2.3 (0.7-7.4)		0.15
VEGF -460C/T	CC	4 (8.4%)	12 (16.0%)	
	CT	22 (45.8%)	31 (41.3%)	
	TT	22 (45.8%)	32 (42.7%)	
Logistic regression analysis OR (95% CI)	CT vs CC	2.1 (0.6-8.4)		0.22
	CT vs TT	1.0 (0.5-2.2)		0.93
	TT vs CC	2.1 (0.6-8.1)		0.24

Intestinal type		Malignancy (n=48)	Benign (n=75)	P-value
VEGF +405G/C	GG	9 (28.1%)	4 (30.0%)	
	GC	15 (46.9%)	4 (40.0%)	
	CC	8 (20.9%)	3 (30.0%)	
Logistic regression analysis OR (95% CI)	CC vs GG	0.9 (0.1-6.1)		0.90
	CC vs CG	0.7 (0.1-4.4)		0.70
	CG vs GG	1.2 (0.2-7.0)		0.80
	CC vs CG+GG	0.8 (0.2-4.3)		0.76
VEGF -460C/T	CC	1 (3.1%)	1 (10.0%)	
	CT	17 (53.1%)	3 (30.0%)	
	TT	14 (43.8%)	6 (60.0%)	
Logistic regression analysis OR (95% CI)	CT vs CC	5.7 (0.2-174.4)		0.27
	CT vs TT	2.4 (0.5-13.2)		0.25
	TT vs CC	2.3 (0.1-66.0)		0.58

図6. The Genotype Distribution of VEGF Gene Polymorphisms +405G/C and -460C/T Between Patients With PDAC and IPMNs

		PDAC (n=108)	Malignant IPMNs (n=80)	Benign IPMNs (n=85)
VEGF +405G/C, n	GG	53 (49.6%)	22 (27.5%)	33 (38.8%)
	GC	33 (30.8%)	42 (52.5%)	43 (50.6%)
	CC	21 (19.6%)	16 (20.0%)	9 (10.6%)
Logistic regression analysis OR (95% CI)	GG vs GC+CC	Reference group	0.39 (0.2-0.7) P=0.002*	0.65 (0.4-1.1) P=0.14
	CC	7 (6.7%)	5 (6.2%)	13 (15.3%)
VEGF -460C/T, n	CT	39 (37.1%)	39 (48.8%)	34 (30.0%)
	TT	59 (56.2%)	36 (45.0%)	38 (44.7%)
	TT vs CC+CC	Reference group	0.64 (0.4-1.1) P=0.13	0.63 (0.4-1.1) P=0.11

* statistically significant

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Norimitsu Yabusaki, Suguru Yamada, Yoshie Shimoyama, Tsutomu Fujii, Mitsuro Kanda, Goro Nakayama, Hiroyuki Sugimoto, Masahiko Koike, Shuji Nomoto, Michitaka Fujiwara, Akimasa Nakao, Yasuhiro Kodera. A vascular endothelial growth factor gene polymorphism predicts malignant potential in intraductal papillary mucinous neoplasm, *Pancreas* 44:608-614, 2015 査読有り
DOI: 0.1097/MPA.0000000000000305

Suguru Yamada, Tsutomu Fujii, Yoshie Shimoyama, Mitsuro Kanda, Goro Nakayama, Hiroyuki Sugimoto, Masahiko Koike, Shuji Nomoto, Michitaka Fujiwara, Akimasa Nakao, Yasuhiro Kodera. Clinical implication of morphological subtypes in management of intraductal papillary mucinous neoplasm. *Annals of surgical oncology* 21: 2444-2452, 2014 査読有り

DOI: 10.1245/s10434-014-3565-1

[学会発表](計4件)

Suguru Yamada, Norimitsu Yabusaki, Tsutomu Fujii, Mitsuro Kanda, Hiroyuki Sugimoto, Yasuhiro Kodera. A vascular endothelial growth factor gene polymorphism predicts malignant potential in intraductal papillary mucinous neoplasm. AACR Annual Meeting 2015, 2015.4.21 Philadelphia (USA)

山田 豪, 藪崎紀充, 藤井 努, 神田光郎, 岩田直樹, 小林大介, 田中千恵, 中山吾郎, 杉本博行, 小池聖彦, 野本周嗣, 藤原道隆, 小寺泰弘. 血管内皮細胞増殖因子の一塩基多型による膵管内乳頭状粘液性腫瘍における悪性化予測. 第12回消化器外科学会大会, 2014.10.26 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)

Suguru Yamada, Norimitsu Yabusaki, Mitsuro Kanda, Goro Nakayama, Masahiko Koike, Shuji Nomoto, Michitaka Fujiwara, Yasuhiro Kodera. A VEGF gene polymorphism predicts malignant potential in intraductal papillary mucinous neoplasm. 第73回日本癌学会学術総会, 2014.9.26 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜)

山田 豪, 藤井 努, 神田光郎, 小林大介, 田中千恵, 中山吾郎, 杉本博行, 小池聖彦, 野本周嗣, 藤原道隆, 小寺泰弘. 組織学的亜型と癌浸潤部亜型の観点から見た IPMN 治療方針の検討. 第100回日本消化器病学会総会, 2014.4.25 東京国際フォーラム (東京都千代田)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 豪 (YAMADA, Suguru)
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師
研究者番号: 30467287

(2)研究分担者

なし