

平成 29 年 8 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06281

研究課題名(和文) Margin imprint法による外科的切除断端の分子生物学的解析

研究課題名(英文) Molecular surgical margin analysis by margin imprinting procedure

研究代表者

林 真路 (HAYASHI, Masamichi)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：70755503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：外科的切除断端の評価は、長らく顕微鏡検査による視覚的な診断で行われている。しかし、この方法で断端に癌遺残なしと診断された場合にも、術後に局所再発をきたす場合が少なくない。これは視覚的には捕らえられない癌化細胞の遺残が原因だと考えられ、これらを同定するためには切除断端サンプルを分子生物学的に解析する必要がある。我々は独自の方法(Margin imprint法)で、凹凸のある広い外科的剥離面から効率的に切除断端細胞を回収し、そこにメチル化などの癌特異的な遺伝子異常が含まれていないか調べる実験系を確立した。これまでの病理組織学的診断を補完する診断法として、広く臨床応用できないかと考えている。

研究成果の概要(英文)：The evaluation of surgical margin status has long been diagnosed by histopathological procedure. However, some of cancer-recurrences occur from the cases with cancer cell-free surgical margin. The reason may be due to an invisible tiny cancerous cells on the surgical margins. In order to detect these cells, we collected cells on the margin surfaces by our margin imprint methods. This procedure enables us to collect cells effectively from uneven surgical margins, and on-time measurements by cancer-specific quantitative methylation-specific PCR. We think this procedure would support the conventional histopathological diagnosis also in the intraoperative time setting.

研究分野：消化器外科学

キーワード：Surgical margin Quantitative MSP 肝細胞癌 大腸癌 消化器癌

1. 研究開始当初の背景

術中・術後のsurgical marginの評価に病理組織学的診断法を用いるのは長らくgold standardであった。実際に様々な癌腫において、病理組織学的な癌遺残の有無はその症例の有意な予後因子となっていた。しかし一方で、病理組織学的な癌遺残陰性群においても少なからず局所再発症例が存在する。これには、field cancerization (Leemans. et al, 2011, Nat Rev Cancer) と呼ばれる可視化できない遺伝子レベルの異常を持った細胞の局所遺残が関与している可能性がある。また深部断端においては、tumor budding (Koike, Kodera. et al, 2008, Ann Surg Oncol) と呼ばれる腫瘍先進部での微小癌細胞塊の非連続的点在状態が、病理組織学的検索を逃れて存在している可能性もある。これらの質的量的にわずかな細胞異常を、分子生物学的なアプローチにより同定できないかと考えた。

surgical marginの癌特異的遺伝子マーカーによる評価は、病理学的surgical margin陰性の頭頸部癌手術検体におけるp53 mutationを調べた報告 (Brennan. et al, 1995, N Engl J Med) に始まる。

その結果は、surgical marginサンプルにおけるp53 mutation陽性症例では術後局所再発を認めたのに対し、陰性症例では、術後2年間で全く認めなかった。しかし、頭頸部癌におけるp53 mutationの頻度は50%前後であることから、より汎用性のある遺伝子マーカーの検索が必要という課題が生じた。2004年には、surgical marginにおける癌特異的メチル化マーカーの同定をQMSP (Quantitative methylation-specific PCR) 法により行った報告がなされた (Goldenberg. et al, 2004, Head Neck)。以後メチル化マーカーを用いてsurgical marginの評価を行った報告は散見されるが、sample数が少ないものや、主病変における当該メチル化マーカーの発現の有無を勘案していない報告が大部分であり、臨床応用にむけて十分な知見が蓄積されているとは言えない。

2. 研究の目的

消化器癌の外科的切除断端はしばしば広範かつ凹凸のある領域となる。一部の組織採取だけでは全体を評価できない可能性が高いため、我々はnitrocellulose膜を用いた組織表面へのimprintingにより包括的に外科的切除断端・剥離面から細胞を回収するmargin imprint法を開発した。すでに頭頸部癌の深部surgical marginにおける検体採取にこの方法を用い、メチル化検出のために十分なDNAが採取可能であること、実際に癌特異的なメチル化が検出されること、そしてメチル化マーカー陽性例が頭頸部癌の局所領域再発に有意に相関する因子となることを突き止め、報告した (Hayashi. et al, 2015, Cancer)。消

化器癌、特に広範な切離面となりやすい肝癌症例や、十分な深部surgical marginをとることがときに困難な結腸直腸癌、食道癌に応用し、molecular surgical marginの陽性/陰性が症例の臨床病理組織学的因子、あるいは局所再発率に関連があるかどうかを検討したいと考えた。

3. 研究の方法

(1) Margin imprint法によるsurgical margin サンプルの回収

標本の切除断端 (粘膜面、深部断端とも) が病理組織学的に陰性の症例を対象症例とする。本研究ではサンプル採取が最も重要な行程であり、contaminationを避けるために細心の注意が必要である。切除標本の深部断端表面の細胞を、以下の手順でmargin imprint法により採取した。① 粘膜面の腫瘍部の細胞に触れぬよう留意しながら、検体全体の水分をとる。② nitrocellulose膜を3枚、順次深部断端面に約10秒間押し付ける。③ SDS溶液が入った検体用チューブにこれらの膜をひたし、PK digestionを行う。④ 最後に非癌部、癌部の組織サンプルを採取し、各症例におけるpositive/negative controlとする。

(2) Margin imprint検体からのDNA抽出とbisulfite処理

申請者らが報告したRapid QMSP法 (Hayashi M et al, Ann Surg Oncol, 2014) に則り、迅速法でDNA抽出 (約40分)、bisulfite処理 (約40分) を行う。最終検体の質や量に差異が出ぬよう、使用する薬剤料やbisulfiteキットへのDNA投与量は常に一定のプロトコールを使用する。

(3) 標的遺伝子パネルについてQMSPアッセイを実行

標的遺伝子候補については、当教室および交流のあるJohn Hopkins大学の教室の過去のデータから臓器別に選定する。surgical marginの評価は、あくまで癌部本体で陽性であるメチル化マーカーを用いる必要があると考えている。高感度のメチル化マーカーを複数選択し、メチル化マーカーパネルとして使用することで、大多数の症例を評価することが可能であると考えられる。

4. 研究成果

結腸直腸癌においても術後局所再発は重要かつ対策を要する問題のひとつである。再発に関する重要な予後因子のひとつにcircumferential resection margin (CRM)があり、CRM陽性例は陰性例と比較して有意に再発率が高いことが報告されている (Baik SH. et al. 2007)。しかし問題は、CRM陰性症例においても再発症例が存在し、そこには病

理組織学的には診断できない断端陽性例が存在すると考えられる。

分子生物学的な外科的切除断端評価法を確立するにあたり、“メチル化マーカーパネルの作成とそれらの Rapid QMSP アッセイの構築”、さらに“surgical margin imprintingによる切除断端評価法の確立”が必要となるが、本研究では前者について検証した。

(1) Margin imprint法によるsurgical marginサンプルの回収

病理組織学的にはCRM陰性であった上記9

case	age	gender	disease	surgery
Case 1	72	female	Rectal Ca	Lap-HAR
Case 2	57	male	Rectal Ca	Lap-APR
Case 3	58	male	Rectal Ca	Lap-LAR
Case 4	75	male	A-colon Ca	Lap-RHC
Case 5	49	male	A-colon Ca	Lap-RHC
Case 6	67	male	Rectal Ca	Lap-LAR
Case 7	68	male	Rectal Ca	Lap-LAR
Case 8	82	male	Rectal Ca	Lap-HAR
Case 9	45	male	Rectal Ca	Lap-LAR

症例から癌部、非癌部、そしてmargin imprint検体を採取した。

(2) Margin imprint検体からのDNA抽出とbisulfite処理

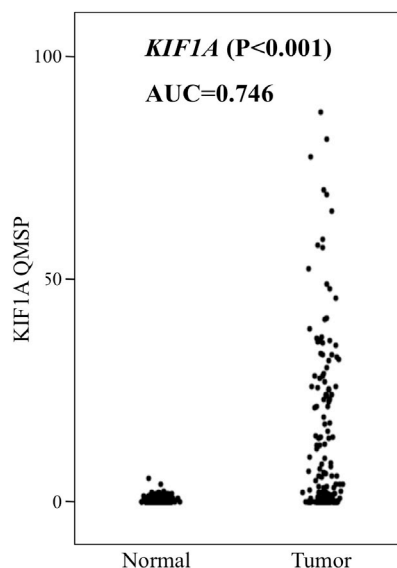
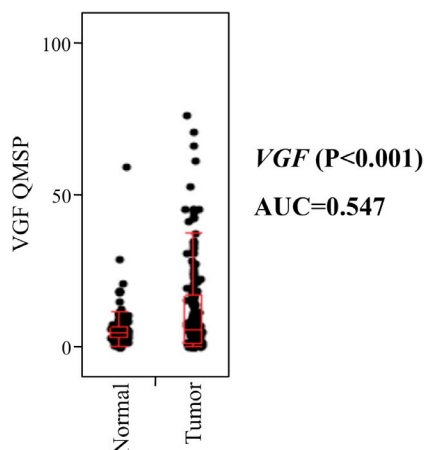
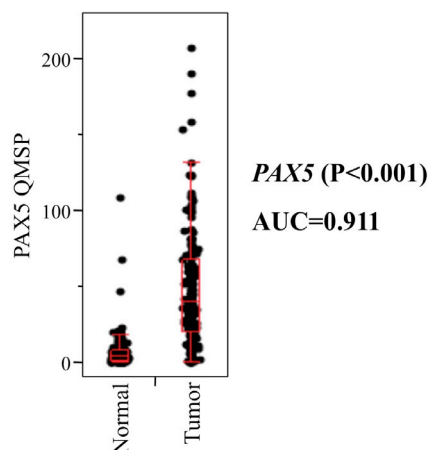
Margin imprint検体から採取したDNAにつ

case	ng/ul	260/280	260/230
Case 1	7.80	1.68	0.69
Case 2	13.90	1.40	0.45
Case 3	6.20	1.80	0.50
Case 4	7.01	2.06	0.80
Case 5	5.27	1.77	0.81
Case 6	6.05	2.03	0.74
Case 7	6.49	1.48	0.35
Case 8	184.68	2.59	2.80
Case 9	88.96	2.18	5.38

いてNano dropで測定した結果を以下に示す。収量は決して多くないため、260/230も十分高い値とは言い難いが、一定量のDNAは確かに含まれていると考えられた。

(3) 標的遺伝子パネルについてQMSPアッセイを実行

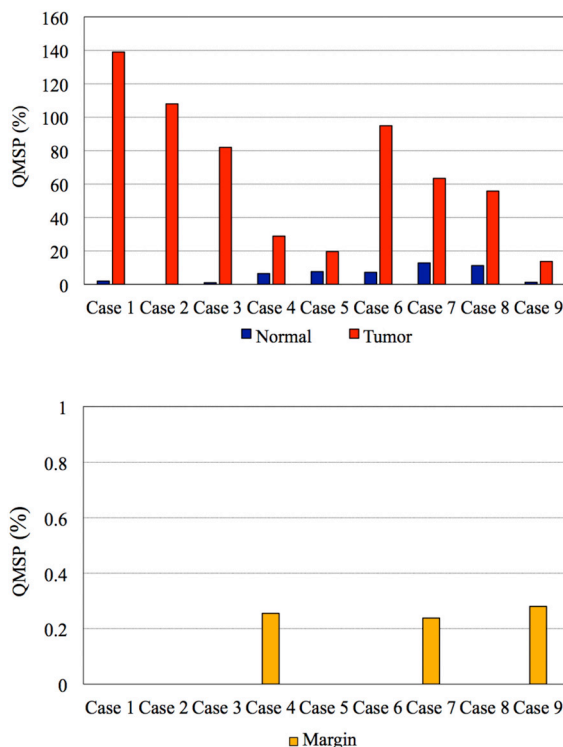
過去に所属したグループから発表した以下の3つの研究論文から、結腸直腸癌について既報告のない有望な3つのメチル化マーカー (*PAX5*, *VGF*, *KIF1A*) を抽出し、QMSPアッセイを確立してメチル化マーカーパネルを作成した (Hayashi M. et al, *Cancer Prev Res*, 2015) (Hayashi M et al, *Oncotarget*, 2014) (Hoque MO. et al, *Cancer Res*, 2008)。これらのマーカーについて、161例の当科における結腸直腸癌切除症例の癌部・非癌部を用い、その癌特異的性を検証した。



いずれのマーカーについても、癌部で非癌部と比較して有意な QMSP 高値を認め、感度・特異度とも高いアッセイを確立した。

(4) 手術検体の回収・Rapid QMSP 法の施行

外科的剥離断端 (CRM) が存在する 9 症例について、B. で AUC が著明に高値であった PAX5 の QMSP アッセイを用い、癌部/非癌部 (下図上段)、および surgical margin (下図下段) の QMSP を施行した。

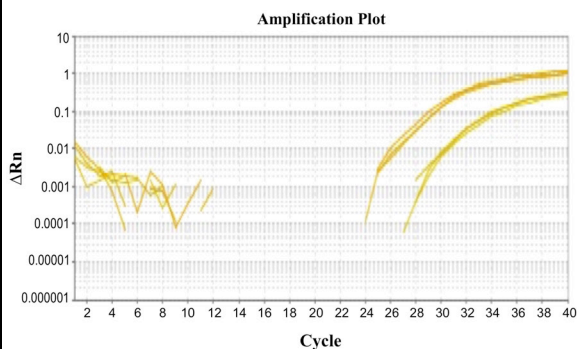


まず上段の結果では、いずれの症例においても癌特異的な QMSP 値の上昇が確認できた。ただし normal においても少なからず QMSP 値は存在しており、QMSP 値の存在がすなわち癌細胞の存在を意味するとまでは言い切れない結果であった。

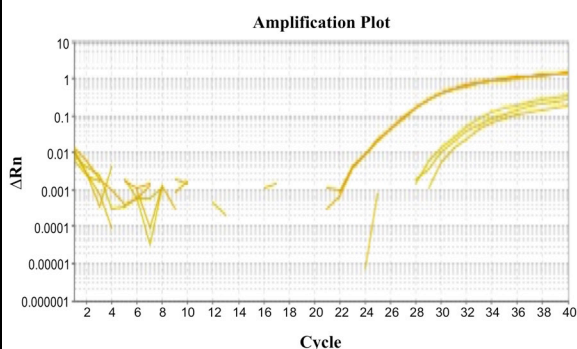
下段において、case 4、case7、case9 の外科的切除断端検体で、QMSP 値を認めた。

癌部や非癌部のように、その大多数を癌細胞、あるいは非癌細胞が占めるサンプルからの DNA 抽出ではなく、細胞集団のうちのごく僅かが癌特異的遺伝子異常を持つかどうか、というサンプルからの DNA 抽出であるため、当然ながら QMSP 検出レベルは低いですが、以下に代表例を示すように、reference gene としての ACTB は確かに存在し、メチル化遺伝子の増幅も確かに行われたことが分かる (右上図 Case 4, 7)。

Case 4 (左: ACTB、右: PAX5)



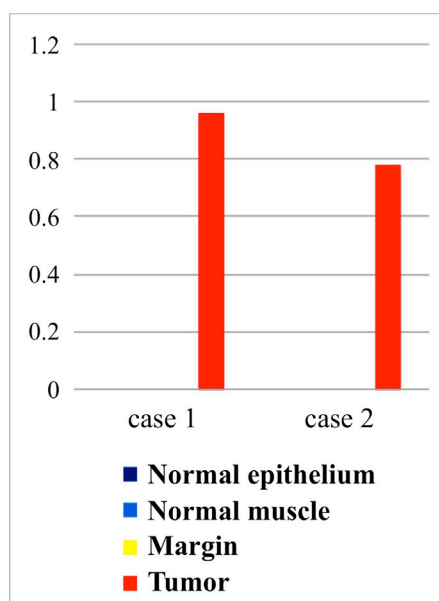
Case 7 (左: ACTB、右: PAX5)



フォローアップ期間が短く、全症例でいまだ再発症例は確認していないため、下段におけるメチル化陽性例の臨床的意義は現時点でまだはっきりしないが、今後再発の有無を注視すべき症例群であると考えられた。

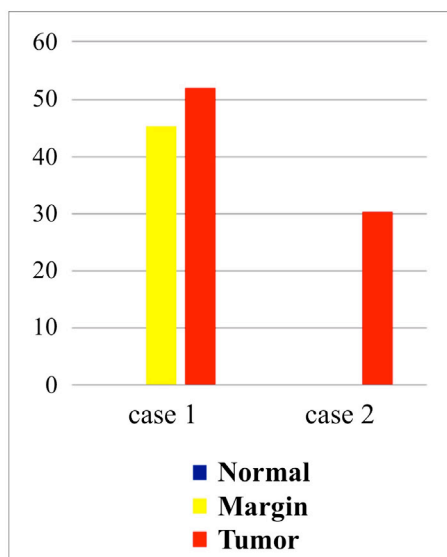
他の消化器癌にも応用し、その汎用性も確認した。

食道癌



食道癌でも *PAX5* のメチル化が高頻度に見られることは確認している。一方で正常粘膜、また正常筋層でのメチル化は検出限界値以下であり、**surgical margin** でメチル化陽性であれば、分子生物学的に陽性と言える状況であったが、2例とも陰性であった。

転移性肝腫瘍



結腸直腸癌の肝転移症例 2 例につき検討した。2 例とも癌部で高頻度のメチル化が確認されたが、うち 1 例では surgical margin 陽性であった。

以上のように、margin imprint 法は消化器癌手術における molecular surgical margin analysis において有用なサンプリング法であると考えられた。予後データの蓄積により、その予後因子としての重要性を検討することになる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[[雑誌論文] (計 3 件)]

- ① Luigi Marchionni, Masamichi Hayashi (equally contributor), Elisa Guida, Akira Ooki, Enrico Munari, Fayez J. Jabboure, Wikum Dinalankara, Ali Raza, George J. Netto, Mohammad O. Hoque, Pedram Argani. MicroRNA expression profiling of Xp11 renal cell carcinoma. *Human Pathology*. 2017 April. doi: 10.1016/j.humpath.2017.03.011. [Epub ahead of print] 査読有り
- ② Francesca Pirini, Sassan Noazin, Martha H. Jahuira-Arias, Sebastian Rodriguez-Torres, Leah Friess, Christina Michailidi, Jaime Cok, Juan

Combe, Gloria Vargas, William Prado, Ethan Soudry, Jimena Pérez, Tikki Yudin, Andrea Mancinelli, Helen Unger, Carmen Ili-Gangas, Priscilla Brebi-Mieville, Douglas E. Berg, Masamichi Hayashi, David Sidransky, Robert H. Gilman, Rafael Guerrero-Preston. Early detection of gastric cancer using global, genome-wide and *IRF4*, *ELMO1*, *CLIP4* and *MSC* DNA methylation in endoscopic biopsies. *Oncotarget*. 2017 March. doi: 10.18632/oncotarget.16258. [Epub ahead of print] 査読有り

- ③ Sayantan Datta, Hae-Seong Nam, Masamichi Hayashi, Leonel Maldonado, Rachel Goldberg, Mariana Brait, David Sidransky, Peter Illei, Alex Baras, Neeraj Vij, Mohammad O. Hoque. Expression of GULP1 in bronchial epithelium is associated with the progression of emphysema in chronic obstructive pulmonary diseases. *Respiratory Medicine*. 124:72-78, 2017 March. doi: 10.1016/j.rmed.2017.02.011. 査読有り

[学会発表] (計 7 件)

- ① Sho Hirabayashi, Masamichi Hayashi, Goro Nakayama, Keisuke Kurimoto, Hiroshi Tanabe, Mitsuro Kanda, Hideki Takami, Yukiko Niwa, Naoki Iwata, Daisuke Kobayashi, Chie Tanaka, Suguru Yamada, Hiroyuki Sugimoto, Masahiko Koike, Tsutomu Fujii, Michitaka Fujiwara, Yasuhiro Kodera. Colorectal cancer methylome and laterality. AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting 2017. 2017 年 4 月 5 日. Washington, DC (USA)
- ② Masamichi Hayashi, Elisa Guida, Rachel Goldberg, Yoshikuni Inokawa, Leonardo Reis, Akira Oki, Evgeny Izumchenko, Leonel Maldonado, Luigi Marchionni, Mariana Brait, Trinity Bivalacqua, Alexander Baras, George J. Netto, Wayne Koch, David Sidransky, Mohammad O. Hoque. GULP1 is an epigenetically altered and functional tumor suppressor in urothelial carcinoma through regulation of Nrf2-Keap1 signaling axis. AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting 2017. 2017 年 4 月 3 日. Washington, DC (USA)
- ③ Nao Takano, Masamichi Hayashi, Hideki Takami, Daisuke Kobayashi, Chie Tanaka, Suguru Yamada, Hiroyuki Sugimoto, Masahiko Koike, Tsutomu Fujii, Michitaka Fujiwara, Yasuhiro Kodera. fiSerum des- γ -carboxyprothrombin as a

prognostic marker of hepatocellular carcinoma derived from non-cirrhotic livers. 40th World Congress of the International College of Surgeons. 2016年10月25日. 国立京都国際会館(京都府京都市左京区)

- ④ 林 真路, 栗本景介, 中山吾郎, 神田光郎, 山田 豪, 杉本博行, 小池聖彦, 藤井努, 藤原道隆, 小寺泰弘. 食道扁平上皮癌における rRNA の過剰発現. 第71回日本消化器外科学会総会. 2016年7月14日. あわぎんホール(徳島県徳島市藍場町)
- ⑤ 栗本景介, 林 真路, 小池聖彦, 神田光郎, 山田 豪, 中山吾郎, 杉本博行, 藤井努, 藤原道隆, 小寺泰弘. 食道扁平上皮癌における rRNA の過剰発現. 第71回日本消化器外科学会総会. 2016年7月14日. アスティとくしま(徳島県徳島市山城町)
- ⑥ Masamichi Hayashi, Wayne M. Koch, Yasuhiro Kodera. Multiple biomarker combination increased both versatility and recurrence-predictive accuracy of molecular deep surgical margin in head and neck squamous cell carcinoma. AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting 2016. 2016年4月20日. New Orleans (USA)
- ⑦ Keisuke Kurimoto, Masamichi Hayashi, Masahiko Koike, Mitsuro Kanda, Yoko Nishikawa, Naoki Iwata, Yukiko Niwa, Hideki Takami, Daisuke Kobayashi, Chie Tanaka, Suguru Yamada, Goro Nakayama, Hiroyuki Sugimoto, Michitaka Fujiwara, Tsutomu Fujii, Guerrero-Preston Rafael, Yasuhiro Kodera. PAX5 methylation as a novel biomarker of esophageal cancer for both potential tumor malignancy and cisplatin sensitivity. AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting 2016. 2016年4月20日. New Orleans (USA)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 真路 (HAYASHI, Masamichi)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号：70755503