

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19850

研究課題名(和文) 消化器外科手術切除断端へのRapid QMSP法の応用

研究課題名(英文) Rapid procedure of quantitative methylation specific pcr for molecular surgical margin analysis.

研究代表者

高野 奈緒 (TAKANO, Nao)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50747847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ある組織が癌か否かを知るためには、癌特異的な遺伝子異常がそこにあるかどうかを知ることによって判断できる。遺伝子異常を調べるためには通常日単位の時間が必要であるが、我々は所要時間2時間半で、安価に、再現性をもって診断する手法を確立した。その迅速性は日常臨床でも生かせる可能性があり、特に外科的切除を行う際に、切除断端に癌の遺残がないかどうかを術中に診断できる。今後種々のキットや測定機械の開発により、さらなる時間短縮が図れる可能性があると考えている。

研究成果の概要(英文)： Whether a certain tissue has cancerous potential or not could be diagnosed by the detection of cancer-specific gene aberration. It usually takes a few days to proceed the experiment. Our novel gene methylation detecting assay needs only 2.5 hours with less expensive and reproducible method. This rapid quantitative methylation-specific PCR assay (rapid QMSP) could be performed in intra-operative time setting and diagnose the existence of residual tiny cancerous cells on the surgical site. We think this processing time could be more shorten by unknown novel experimental kits or equipments in the future.

研究分野：消化器外科学

キーワード：大腸癌 消化器癌 外科的切除断端組織 メチル化 QMSP エピジェネティクス 迅速診断

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは病理組織学的に腹腔洗浄細胞診も陰性である胃癌 R0 切除症例のうち、腹腔洗浄液中の CEA その他のマーカーの mRNA 発現陽性例に腹膜転移再発が見られ、有意に予後不良であることを報告してきた (Kodera, Nakanishi et al. 2005, Kodera, Nakanishi et al. 2006, Ito, Nakanishi et al. 2005)。こうした微量癌細胞検出に関わる研究は、国内・国外で数多くなされており、視覚的識別不能な異常細胞の遺残を分子生物学的手法で検出しえること、さらにその結果が症例の予後を左右する重要な因子であり、以後の治療方針の指標となることが示されている。

一方、特に切除断端の病理組織学的診断がときに有効でない理由として、“field cancerization” と “tumor budding” が考えられる。このうち “field cancerization” は現時点では斬新な発想であり、顕微鏡的に視認できる癌組織の周囲には、形態こそ正常粘膜と区別できないが、メチル化等の癌特異的遺伝子異常を伴う細胞が取り巻いているとするものである (Leemans, Braakhuis et al. 2011)。この場合、視認できる癌組織に対して十分なマージンをとり切除したとしても、粘膜面の切除断端には癌特異的遺伝子異常を持つ細胞が遺残することとなり、ここに局所再発あるいは新規の病変形成をきたす可能性がある。実際に *H. pylori* 菌に感染した胃粘膜においては epigenetic field defect が形成され、癌の発生源地となることが確認されている (Ushijima and Hattori 2012)。解剖学的に切除 margin を十分取れない胃食道接合部癌などでは特に、不十分な切除になる可能性が増大すると考えられる。

## 2. 研究の目的

消化器癌手術の根治性を評価するために、術中・術後の切除断端の病理組織診断が行われている。しかし、病理組織学的に取り切れた (R0) と診断された症例でも、時に局所再発する現実に遭遇する。これらの再発は切除断端に遺残した微量な癌細胞のみならず、癌細胞には至っていないが癌特異的遺伝子異常を有する細胞から発生している可能性も考えられ、従来の病理診断には一定の限界があることが想定される。そこで、外科的切除断端を分子生物学的に評価する “Rapid QMSP 法” により、限られた時間でこれらの異常細胞を同定する手法を確立し、術中の追加切除や術後の化学療法・放射線療法など、個々の症例に応じて有効な追加治療を検討する指標にできないかと考えた。

## 3. 研究の方法

### (1) 癌特異的メチル化マーカーパネルの作成と Rapid QMSP 法の確立

切除断端に検知しうるメチル化マーカーは、当然癌部本体で検知できたものである。しかし個々の症例によって発現しているメチル化マーカーは異なると考えられるため、単独のマーカーのみで検討できる症例は限られる。複数のマーカーを用いてより多数の症例を調査対象とするべく、過去の当教室および Johns Hopkins 大学の methylation data から、複数の有望な癌特異的メチル化マーカー群を抽出し、臓器別にマーカーパネルを作成する。次に、それぞれのメチル化マーカーにつき、Quantitative methylation-specific PCR (QMSP) 施行のための primer・probe セットの最適化を行う。

### (2) Rapid QMSP 法の妥当性の確認

過去の癌検体コホートをを使用して癌部、非癌部の QMSP を測定し、各メチル化マーカーの癌特異性を検証する。

### (3) 手術検体の回収・Rapid QMSP 法の施行

承諾の得られた病理組織学的 R0 症例の消化器癌摘出標本から、癌部、正常部、外科的切除断端組織の検体を採取する。回収した検体から順次 DNA を採取する。bisulfite 処理、QMSP も含めると通常は 1-2 日を要する行程であるが、Rapid QMSP 法を用いて 3 時間以内に信頼できる QMSP データを得ることが可能である。

## 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相当数の再発症例が存在し、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確立を試みた。

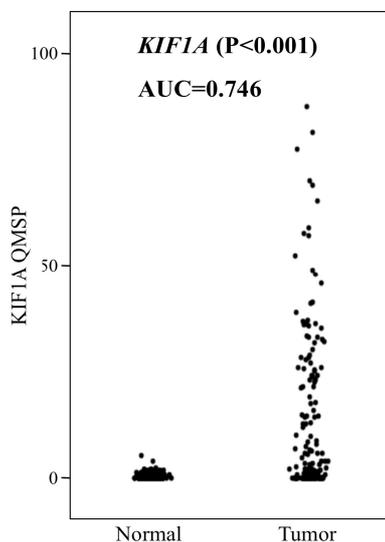
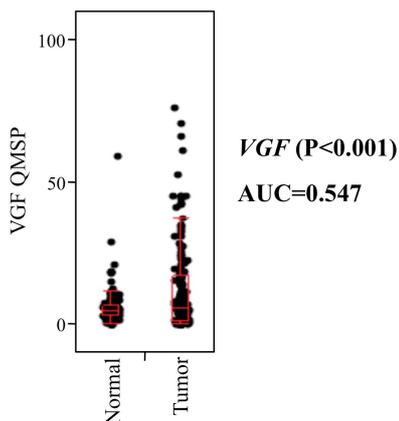
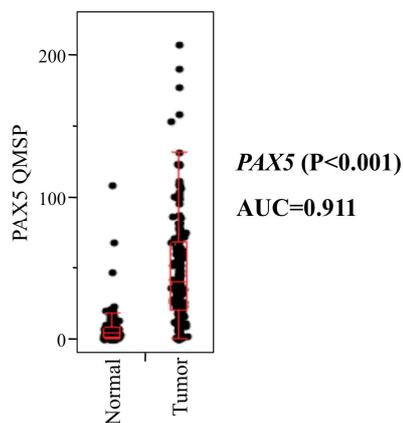
### (1) 癌特異的メチル化マーカーパネルの作成と Rapid QMSP 法の確立

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とした。(Hayashi M et al, *Cancer Prev Res*, 2015) (Hayashi M et al, *Oncotarget*, 2014) (Hoque MO et al, *Cancer Res*, 2008)。

当科で 2003-2013 年に切除術を施行したうち、DNA 検体の利用可能な結腸直腸癌 161 症例を対象とし、プロトコールに則って約 40 分で DNA 抽出、約 30 分で bisulfite 処理を施行した。

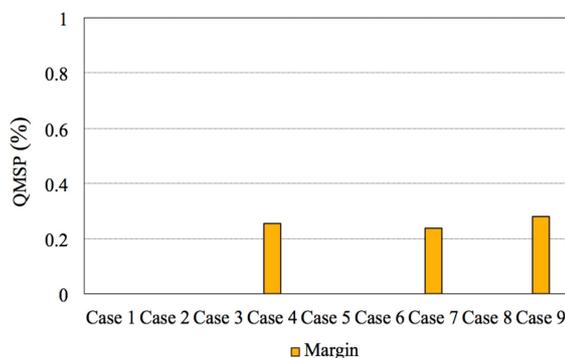
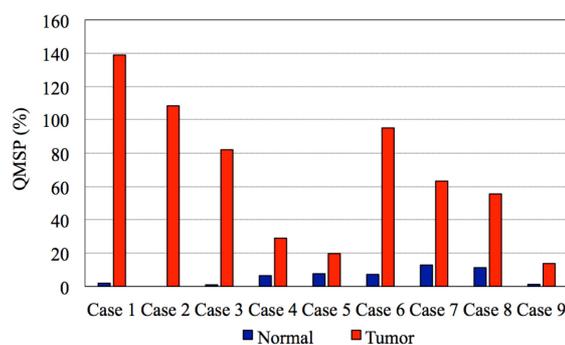
## (2) Rapid QMSP 法の妥当性の確認



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。この QMSP 測定の行程は、プレート準備も含めて約 80 分でルーチン化できた。

## (3) 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、(2) 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) および剥離面から採取した検体 (下図下段) の QMSP を施行した。

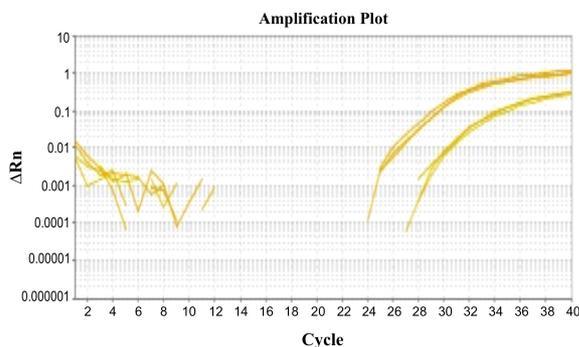


まず上段の結果では、いずれの症例においても癌特異的な QMSP 値の上昇が確認できた。ただし normal においても少なからず QMSP 値は存在しており、QMSP 値の存在がすなわち癌細胞の存在を意味するとは言い切れない結果であった。

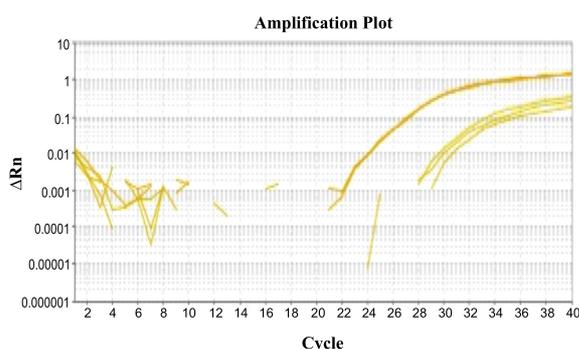
下段において、case 4、case 7、case 9 の外科的切除断端検体で、QMSP 値を認めた。

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。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 (次ページ 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。

#### 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)

Luigi Marchionni, Masamichi Hayashi, Elisa Guida, Akira Ooki, Enrico Munari, Fayez J. Jabboure, Wikum Dinalankara, Ali Raza, George J. Netto, Mohammad O. Hoque, Pedram Argani (研究協力者: Masamichi Hayashi). 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

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 (研究協力者: Masamichi Hayashi). 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

Sayantana Datta, Hae-Seong Nam, Masamichi Hayashi, Leonel Maldonado, Rachel Goldberg, Mariana Brait, David Sidransky, Peter Illei, Alex Baras, Neeraj Vij, Mohammad O. Hoque (研究協力者: Masamichi Hayashi). 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 8 件)

Sho Hirabayashi, Masamichi Hayashi, Goro Nakayama, Keisuke Kurimoto, Hiroshi Tanabe, Mitsuro Kanda, Hideki Takami, Yukiko Niwa, Naoki Iwata, Daisuke Kobayashi, Chie Tanaka, Suguro Yamada, Hiroyuki Sugimoto, Masahiko Koike, Tsutomu Fujii, Michitaka Fujiwara, Yasuhiro Kodera (研究協力者: Masamichi Hayashi, Keisuke Kurimoto, Mitsuro Kanda). Colorectal cancer methylome and laterality. AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting 2017. 2017年4月5日. Washington, DC (USA)

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 (研究協力者: Masamichi Hayashi). 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)

高野奈緒, 杉本博行, 田中伸孟, 園原史訓, 岩田直樹, 林 真路, 神田光郎, 田中千恵, 小林大介, 山田 豪, 中山吾郎, 藤井 努, 小池聖彦, 藤原道隆, 小寺泰弘. 転移性肝腫瘍における Gd-EOB-DTPA 造影 MRI

による肝機能評価. 第78回日本臨床外科学会総会. 2016年11月24日. グランドプリンスホテル新高輪(東京都港区高輪)

Nao Takano, Masamichi Hayashi, Hideki Takami, Daisuke Kobayashi, Chie Tanaka, Suguru Yamada, Hiroyuki Sugimoto, Masahiko Koike, Tsutomu Fujii, Michitaka Fujiwara, Yasuhiro Kodera. fiSerum des- -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)

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(研究協力者: 林真路, 栗本景介, 神田光郎). 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)

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(研究協力者: 林真路, 栗本景介, 神田光郎). 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)

Masamichi Hayashi, Wayne M. Koch, Yasuhiro Kodera(研究協力者: Mamichi Hayashi). 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)

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(研究協力者: Masamichi Hayashi, Keisuke Kurimoto, Mitsuro Kanda). 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

高野 奈緒 (TAKANO, Nao)  
名古屋大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号: 50747847

### (2) 研究協力者

林 真路 (HAYASHI, Masamichi)  
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

栗本 景介 (KURIMOTO, Keisuke)  
名古屋大学・大学院医学系研究科  
・大学院生

神田 光郎 (KANDA, Mitsuro)  
名古屋大学・医学部附属病院・助教