

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21247

研究課題名(和文)膵腫瘍悪性度診断モデルの予測力評価と早期診断への応用

研究課題名(英文)A fundamental study for construction of PDAC early diagnosis method by DNA methylation analysis.

研究代表者

横山 勢也(Yokoyama, Seiya)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：20569941

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)：膵がんは手術が可能だった場合でも再発率が非常に高く、1～3年以内に再発するケースが非常に多くみられる。当該研究において、術後のリスク評価を目的としたムチン遺伝子のDNAメチル化マーカー構築のために、摘出した癌組織を用いて、臨床病理学所見との比較検討を行った。膵癌においてMUC1およびMUC4のDNAメチル化情報が、生検などで腫瘍組織を得ることが出来ない場合でも、その悪性度を規定するマーカーとなりえることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) has high frequency of recurrence even if possible to surgery. In this program, we analyzed DNA methylation status of mucin genes using pancreatic tissue with/without tumor to construct marker for predicting prognosis after surgery. The methylation status of MUC1 and MUC4 are statistically associated with clinicopathological information. Our result suggested that MUC1 and MUC4 methylation status has potential for predicted prognosis.

研究分野：実験病理学

キーワード：PDAC pancreas MUC1 MUC4 prognosis CA19-9 DNA methylation epigenetics

## 1. 研究開始当初の背景

近年、膵癌を含む種々の癌において、糖タンパク質であるムチン分子ファミリーの異常発現が確認され、増殖・浸潤転移・抗癌剤耐性・免疫機構回避など癌進展の各プロセスにおいて、癌の悪性化に関与することが報告されている（Nat Rev Cancer 2009 9:874）。当研究室では、早くからムチンに注目して研究を進め、様々な組織におけるムチン発現と予後との関係や、その発現機構を世界に先駆けて明らかにしてきた。本邦における癌死は年間 36 万人を超えており、死因の第 1 位である。なかでも膵癌は、年齢調整率を加味した場合、男女ともに死亡者数が増加傾向にある唯一の癌であり、難治性癌の代表となっている（国立がん研究センター試算）。加えて、膵癌は PET-CT 等の最新の機器を用いても、治癒を望める段階での診断は不可能であることが多く、手遅れになる可能性が最も高い。このような現状を打破するためにも、膵癌の「早期診断法の確立」あるいは「悪性度を規定する分子標的の同定」が望まれている。

## 2. 研究の目的

判別モデルの構築において、少ないデータから複雑なモデルを推計しようとすると、モデルのパラメータや予測の信頼区間を過小評価してしまうという危険性ははらんでしまう。膵腫瘍の『悪性度判別モデル』の構築においても、過去の検体（インサンプル）を用いて予測パフォーマンス（感度・特異度）が良くなるように判別モデルを調整しているが、未知の検体（アウトサンプル）における予測パフォーマンスとは異なる。そこで、『悪性度判別モデル』の臨床への展開を目指して、アウトサンプルによる予測能力の評価を行う。加えて、予測結果の出力方法として、『確率』・『格付け』のどちらが適しているのか、時系列サンプルにおける予測結果の変化を評価する。本プロジェクトは、低侵襲的に採取可能な膵液という排出液を活用する。高感度でノイズが少ない『新規高感度メチル化解析（MSE）法』は、従来法では識別できなかったサンプルを識別できる画期的な方法になると考えられる。この方法を用いて、遺伝子のエピジェネティクス異常を検出することで、非常に高い感度で膵癌の早期発見や、癌化のリスクを推し量ることができるようになり、早期に明確な治療戦略を立てることが可能になると思われる。

## 3. 研究の方法

### (1) 膵液中 DNA のムチン遺伝子メチル化異常の検出と『悪性度判別モデル』への適応

当該研究プログラムは、膵癌における様々なムチン抗原の発現状況と、ムチン遺伝子のメチル化解析データ、さらには臨床データをもつきあわせて、関連性を精査する。そのために、手術施行例について、画像診断をはじめとする術前検査データ、手術摘出標本のフ

ァイル、詳細な臨床経過と長期予後のデータが系統的に整理保存されているサンプルを選択し実験に用いる。サンプルの選択においては、病理専門医である米澤傑、東美智代とともに行う。

各種ムチン遺伝子（MUC1・MUC2・MUC4）を対象に、癌患者より採取した膵液の DNA メチル化解析を MSE 法にて行う。同一患者の組織検体における各種ムチンの発現状況を免疫染色・リアルタイム PCR で解析する。各解析データをつきあわせて集積する事で、ムチンプロファイルの構築を行う。

### (2) 判別結果と臨床情報との比較検討

前年度と同様に、膵液症例の解析を推進する。加えて、DNA メチル化解析データとムチンの発現データ・予後等の病理学的パラメータとの関連性を検討し、『悪性度判別モデル』による腫瘍の悪性度判別や癌検出の感度・特異度を評価する。摘出臓器検体を用いて、発癌過程における判別結果と臨床診断との比較検討を行い、膵腫瘍スクリーニングにおける悪性化診断に向けた有用性を評価する。加えて、体液検体を用いた検討で、判別結果と臨床経過・予後を比較し、当該モデルの臨床的な有用性を評価する。

研究協力機関である鹿児島大学病院、鹿児島医療センターおよび鹿児島県南風病院において、術前の ERCP 検査時に膵液を採取している。膵腫瘍症例 50 例の解析を目標とし、膵腫瘍が『悪性化（癌化）した』症例と『悪性化（癌化）しなかった』症例の比較を目的とし、時系列データによる判別予測の評価を行う。

京都大学病院、千葉県がんセンター、ドイツ国ウルム大学などと建設的な研究協力体制を築いており、予後を含む臨床情報が付随した膵液検体を約 150 例回収し保存している。全例の解析を目標とし、判別結果と予後や診断結果との比較を行う。アウトサンプルデータによる『悪性度判別モデル』の検証を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 膵液中 DNA のムチン遺伝子メチル化異常の検出と『悪性度判別モデル』への適応

肺がん組織における MUCIN 遺伝子のメチル化と Epigenetics 因子発現との関連性の検討

肺がん組織検体を用いて MUC4 遺伝子のプロモーターにおける DNA メチル化解析を MSE 法により行った。膵臓組織における MUC4 プロモーターのメチル化は MUC4mRNA 高発現群より低発現群が優位に高いことを示した。肺がん組織においても、これまで細胞株を用いた研究と同様に、MUC4 の遺伝子発現がそのプロモーターのメチル化によって制御されていることを示唆している。加えて、脱メチル化の初期中間体である DNA ヒドロキシメチル化を同様の検体を用いて解析した。ヒドロキシメチル化は腫瘍部において非腫瘍部より有意に高いことが示された。さらに、DNA の

メチル化およびヒドロキシメチル化と脱メチル化酵素である TET1 および TET2 の発現とに相関関係が認められた (図 1)。これらの結果から、予後不良因子である MUC4 遺伝子の発現は発がん過程において進行することが示唆された。

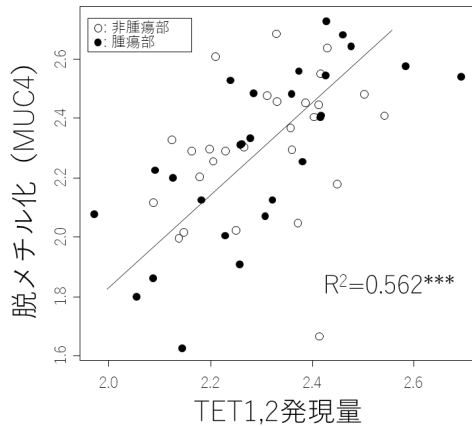


図 1 .TET1/TET2 発現量と MUC4 プロモーター脱メチル化との相関

膵臓組織検体における MUCIN 遺伝子のメチル化と Epigenetics 因子発現との関連性の検討

膵臓がん組織検体を用いて MUC1・MUC4 遺伝子のプロモーターにおける DNA メチル化解析を MSE 法により行った。膵臓組織における MUC1/MUC4 遺伝子のプロモーターのメチル化は mRNA 高発現群より低発現群が優位に高いことを示した。さらに、DNA のメチル化と脱メチル化酵素・メチル化酵素を含む Epigenetics 因子の発現とに相関関係が認められた (図 2)。これらの結果から、膵臓がん組織においても、これまで細胞株を用いた研究と同様に、MUC1/MUC4 の遺伝子発現を制御するプロモーターのメチル化は Epigenetics 因子に依っていることが示唆された。

## (2) 判別結果と臨床情報との比較検討

腫瘍部と非腫瘍部の比較において、腫瘍部におけるムチン遺伝子 (MUC1・MUC2・MUC4) のメチル化状況が、早期ステージの段階で変異していることを明らかにし、腫瘍部の MUC1 遺伝子メチル化状況は、ステージ間、遠隔転移の有無において有意差が認められた。同様に、MUC4 遺伝子のメチル化状況においても、ステージ間に有意差が認められた。さらに、非腫瘍部の MUC4 遺伝子のメチル化状況においても、遠隔転移の有無で有意差が認められた。これらの結果は、免疫組織学的研究で得られた知見である、MUC1 と MUC4 のたんぱく質発現と膵腫瘍の悪性化が相関することと一致しており、膵組織を用いたムチン遺伝子のメチル化解析によっても、膵臓がんの悪性化予測が可能であることが示唆された。次に MUC1 および MUC4 遺伝子のメチル化状況と、その術後予後との関連を評価した。リンパ節転移の無い早期ステージの症例において、腫

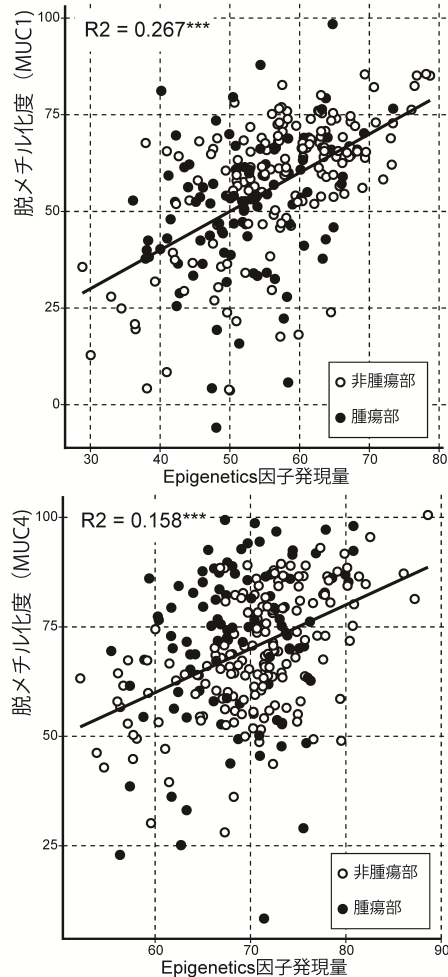


図 2 .Epigenetics 因子発現量と MUC1/MUC2 プロモーター脱メチル化との相関

瘍部の MUC4 遺伝子が脱メチル化されているグループは、メチル化されているグループと比較すると、予後が非常に悪いことが明らかになった。興味深いことに、非腫瘍部の MUC4 遺伝子においても、脱メチル化されているグループは、メチル化グループと比較すると、非常に悪い予後を示した。進行ステージにおいては、腫瘍部の MUC1 遺伝子が脱メチル化されているグループは非常に予後が悪い結果となった。この結果は、MUC1 および MUC4 の発現が予後不良因子とする免疫組織学の知見とも一致しており、DNA メチル化解析の予後リスクマーカーとしての可能が示唆された。また、非腫瘍組織の DNA メチル化解析からも同様の結果を得たことから、生検などで腫瘍組織を得ることが出来ない場合でも、その悪性度を規定するマーカーとなりえると考えられる。

## 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 5 件)

1. Assessment of tumor characteristics based on glycoform analysis of membrane-tethered MUC1. Matsuda A, Higashi M, Nakagawa T, Yokoyama S, Kuno A, Yonezawa S, Narimatsu H. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 97(9) 1103-1113 2017 年 9 月 査読有
2. Immunohistochemical expression of mucin antigens in gallbladder adenocarcinoma: MUC1-positive and MUC2-negative expression is associated with vessel invasion and shortened survival. Hiraki T, Yamada S, Higashi M, Hatanaka K, Yokoyama S, Kitazono I, Goto Y, Kirishima M, Batra SK, Yonezawa S, Tanimoto A. Histology and histopathology 32(6) 585-596 2017 年 6 月 査読有
3. TET1-mediated DNA hypomethylation regulates the expression of MUC4 in lung cancer. Yokoyama S, Higashi M, Tsutsumida H, Wakimoto J, Hamada T, Wiest E, Matsuo K, Kitazono I, Goto Y, Guo X, Hamada T, Yamada S, Hiraki T, Yonezawa S, Batra SK, Hollingsworth MA, Tanimoto A. Genes & cancer 8(3-4) 517-527 2017 年 3 月 査読有
4. Aberrant methylation of MUC1 and MUC4 promoters are potential prognostic biomarkers for pancreatic ductal adenocarcinomas. Yokoyama S, Higashi M, Kitamoto S, Oeldorf M, Knippschild U, Kornmann M, Maemura K, Kurahara H, Wiest E, Hamada T, Kitazono I, Goto Y, Tasaki T, Hiraki T, Hatanaka K, Mataka Y, Taguchi H, Hashimoto S, Batra SK, Tanimoto A, Yonezawa S, Hollingsworth MA. Oncotarget 7(27) 42553-42565 2016 年 7 月 査読有
5. Mucin expression in endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration specimens is a useful prognostic factor in pancreatic ductal adenocarcinoma. Higashi M, Yokoyama S, Yamamoto T, Goto Y, Kitazono I, Hiraki T, Taguchi H, Hashimoto S, Fukukura Y, Koriyama C, Mataka Y, Maemura K, Shinchi H, Jain M, Batra SK, Yonezawa S. Pancreas 44(5) 728-734 2015 年 7 月 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. MUC1 および MUC4 の DNA メチル化異常は膵癌切除術後の予後リスクマーカーとなるか. 横山勢也. 第 7 回膵勉強会 鹿児島市 2018 年 3 月.
2. Aberrant methylation of MUC1 and MUC4 promoters are potential risk marker for prognosis after surgery of pancreatic ductal adenocarcinomas. Seiya Yokoyama, Michiyo Higashi, Sohsuke Yamada, Taiji Hamada, Akihide Tanimoto. 14<sup>th</sup> International Workshop on Carcinoma-association. Robinson College, Cambridge, UK, 24<sup>th</sup> -28<sup>th</sup> July 2017.

〔図書〕(計 2 件)

1. 膵癌におけるメチル化によるムチン発現調節. 横山勢也, 東美智代, 谷本昭英, 米澤傑. 肝胆膵 76(5) 945-950 2018 年 5 月
2. 革新的ライフサイエンスの展望 新規 DNA メチル化解析法による新しい予後マーカーの開発. 横山勢也, 東美智代. 化学工業 67(7) 483 488 2016 年 7 月

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

鹿児島大学医歯学総合研究科先進治療科学専攻腫瘍学講座病理学分野

<http://www2.kufm.kagoshima-u.ac.jp/field/advanced-therapeutics/f107/01.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山勢也 (YOKOYAMA SEIYA)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号: 20569941