

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07019

研究課題名(和文) 膵胆管系腫瘍の早期診断と治療効果予測システム確立

研究課題名(英文) Establishment of early diagnosis and treatment effect prediction method for pancreatobiliary neoplasm

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)：我々は、ヒト膵胆道系腫瘍において、様々な癌の生物学的悪性度とムチン抗原(MUC1, MUC2, MUC4)の発現が密接に関連していることを報告してきた。膵癌症例で各種ムチン発現とDNAメチル化とが関連していることを示した。その解析結果を元に、臨床病理学的自己を加味して機械学習システムを用いて予後予測解析モデル確立を目指した。その結果、陽性及び陽性の予後予測とも有意に同定し得た。また腫瘍部のみならず非腫瘍部の解析結果も独立した予後予測因子となり得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵切除検体を用いて各種ムチンの免疫染色結果とDNAメチル化の解析結果が関連していることを示した。またそれらが予後と密接に関連していることを示した。特に腫瘍部のみならず非腫瘍部の組織を用いた解析でも、予後予測因子となり得ることを示した。これは、腫瘍が直接得られない場合でも、非腫瘍部の組織が得られれば予後予測が可能になる可能性を示している。低侵襲の検査や処置ですむ可能性があり、患者負担の軽減のみならず、医療者の負担や医療資源のコスト減にも繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We had reported that expression profiles of mucins (MUC1, MUC2 and MUC4) are closely associated with biological behavior of human pancreatobiliary neoplasms. We evaluated the methylation status of MUC1, MUC2, and MUC4 promoter regions in pancreatic tissue samples from patients with various pancreatic lesions using methylation-specific electrophoresis. Then, integrating these results and clinicopathological features, we used support vector machine-, neural network-, and multinomial-based methods to develop a prognostic classifier. Significant differences were identified between the positive- and negative-prediction classifiers of patients in 5-year overall survival in the cross-validation test. Multivariate analysis revealed that these prognostic classifiers were independent prognostic factors analyzed by not only neoplastic tissues but also non-neoplastic tissues.

研究分野：医歯薬学

キーワード：病理学 膵胆道腫瘍 ムチン抗原 予後因子 機械学習 MUC1 MUC4

1. 研究開始当初の背景

膵癌ならびに胆管癌は、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。特に、術前に化学放射線療法が施行され治療切除が可能になる症例が増加しており、予後の飛躍的な改善も期待されている。しかし、術前化学療法には副作用もあり、治療に対する反応にも個人差が大きい。治療効果予測因子が確定されれば、患者負担も軽減され医療の向上にも役立つ。

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、超音波ガイド下穿刺生検(EUS-FNA)検体、膵液や胆汁などの術前生検材料等の解析と切除検体を対比する。切除検体でのムチン抗原発現と予後とが関連していることは明らかであり、術前検体での解析が腫瘍の質的診断や早期診断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。

膵胆管系腫瘍においては、各種ムチン(MUC)、なかでも 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受け入れられてきた。我々は超音波ガイド下穿刺生検検体を用いた解析で、IDC では MUC1+MUC2-MUC4+といった発現パターンが見られる、ということのみではなく、MUC5AC や MUC16/CA125 の発現は予後と密接に関連していることを既に見いだしている(Higashi, et al. *Pancreas*. 2015)。また各種ムチンの遺伝子発現にエピジェネティクス機構が深く関与していることを解明してきている。従来よりも高感度の DNA メチル化解析検出法を新規に開発した(国際特許公開番号:WO 2011/132798)。これらの成果を踏まえ、最も難治性の癌である膵胆管系癌を、早期に、しかも悪性度の診断をもあわせて的確に行う方法を確立することを着想するに至った。

3. 研究の方法

手術前に得られた生検検体(膵管や胆管組織)や膵液、胆汁、あるいは手術時に摘出臓器から得られた膵液や胆汁といった検体を用いる。これらの検体と、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する。また 1 例ごとに、摘出病理標本の HE 像並びに免疫組織化学的解析を行い、エピジェネティクス情報と綿密に比較検討する。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する。

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

膵胆管系腫瘍患者の、術前あるいは摘出検体から膵液や胆汁を採取した。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)患者組織も採取した。高感度の定量 Real-time PCR 法を用い、各種ムチンコア蛋白の mRNA に関して解析を行った。また、ELISA や Western blotting 等も行い、ムチン蛋白の検出も試みた。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。以上の分子生物学的検討は研究分担者・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。

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調節が、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。また、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た。膵液では浸潤性膵管癌(PDAC)、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;9(4):e93760; 国際特許公開番号:WO 2013/002422)。膵液での診断精度向上とともに胆汁での解析も行った。これらの分子生物学的検討は主に研究分担者である横山及び研究協力者・松尾が行ない、研究代表者が指導及び統括した。

病理組織標本の解析

EUS-FNA 検体、摘出標本を用い、組織形態学的検討を行うとともに免疫染色、in situ hybridization 等を行った。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た。

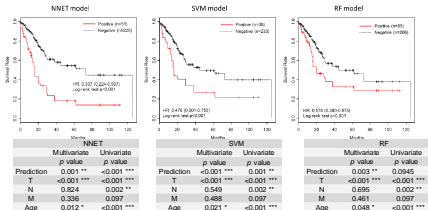
4. 研究成果

膵癌症例での DNA メチル化解析結果を用いた機械学習による膵癌予後予測

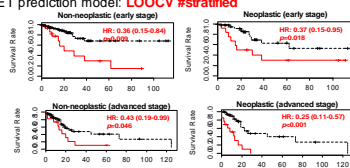
我々は、切除膵組織とメチル化状態の解析を行い、ムチンの発現と DNA メチル化状態は相関していることを示した。

Construction of Prediction Model

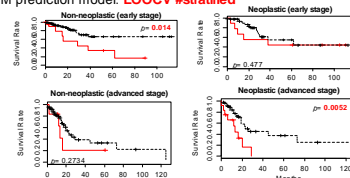
Prediction models: **Leave-One-Out cross validation (LOOCV) test**



NNET prediction model: **LOOCV #stratified**



SVM prediction model: **LOOCV #stratified**

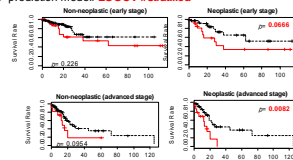


191 症例の膵切除症例を用いて MUC1, MUC2, MUC4 の免疫染色及び各々のメチル化状態の解析を行った。その解析結果と臨床病理学的事項(腫瘍の大きさ、進展度、再発の有無、予後など)を統合し、support vector machine, neural network, multinomial-based methods といった機械学習システムを用いて、予後予測解析モデル確立を目指した。

解析結果の図は上記に示す。

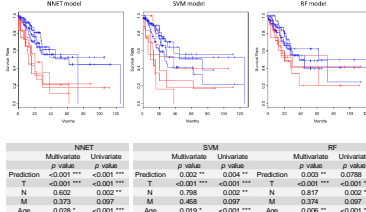
交差検定にて術後5年の全生存率は、陽性の予後予測及び陰性の予後予測とも有意に同定しえた。また多変量解析にて、腫瘍部のみならず非腫瘍部の組織解析結果も独立した予後予測因子となりうることを示した。これらの予後予測因子は、腫瘍の大きさ、リンパ節転移、遠隔転移、年齢よりもより有意に予後予測因子となった。

RF prediction model: **LOOCV #stratified**

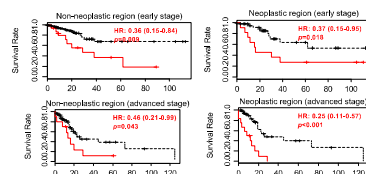


Construction of Prediction Model

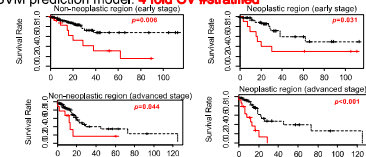
Prediction models: **4 fold CV test**



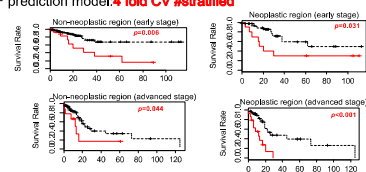
NNET prediction model: **4 fold CV #stratified**



SVM prediction model: **4 fold CV #stratified**



RF prediction model: **4 fold CV #stratified**



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Akahane T, Yamaguchi T, Kato Y, Yokoyama S, Hamada T, Nishida Y, Higashi M, Nishihara H, Suzuki S, Ueno S, Tanimoto A.	4. 巻 14
2. 論文標題 Comprehensive validation of liquid-based cytology specimens for next-generation sequencing in cancer genome analysis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PloS one.	6. 最初と最後の頁 217724
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0217724	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 Fukukura Y, Kumagae Y, Higashi R, Hakamada H, Takumi K, Maemura K, Higashi M, Kamimura K, Nakajo M, Yoshiura T.	4. 巻 29
2. 論文標題 Extracellular volume fraction determined by equilibrium contrast-enhanced multidetector computed tomography as a prognostic factor in unresectable pancreatic adenocarcinoma treated with chemotherapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur Radiol.	6. 最初と最後の頁 353-61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00330-018-5570-4	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 Fukukura Y, Kumagae Y, Hirahara M, Hakamada H, Nagano H, Nakajo M, Kamimura K, Nakaho M, Higashi M, Yoshiura T.	4. 巻 44
2. 論文標題 CT and MRI features of undifferentiated carcinomas with osteoclast-like giant cells of the pancreas: a case series.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Abdominal radiology.	6. 最初と最後の頁 1246-55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00261-019-01958-9	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 Honjo, K. Hamada, T. Yoshimura, T. Yokoyama, S. Yamada, S. Tan, Y. Q. Leung, L. K. Nakamura, N. Ohi, Y. Higashi, M. Tanimoto, A.	4. 巻 51
2. 論文標題 PCP4/PEP19 upregulates aromatase gene expression via CYP19A1 promoter I.1 in human breast cancer SK-BR-3 cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 29619-29633
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.25651	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 該当する

1. 著者名 Fukukura, Y. Kumagae, Y. Higashi, R. Hakamada, H. Takumi, K. Maemura, K. Higashi, M. Kamimura, K. Nakajo, M. Yoshiura, T.	4. 巻 29
2. 論文標題 Extracellular volume fraction determined by equilibrium contrast-enhanced multidetector computed tomography as a prognostic factor in unresectable pancreatic adenocarcinoma treated with chemotherapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur Radiol	6. 最初と最後の頁 353-361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00330-018-5570-4	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 Fukukura, Y. Kumagae, Y. Hirahara, M. Hakamada, H. Nagano, H. Nakajo, M. Kamimura, K. Nakajo, M. Higashi, M. Yoshiura, T.	4. 巻 44
2. 論文標題 CT and MRI features of undifferentiated carcinomas with osteoclast-like giant cells of the pancreas: a case series	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Abdominal radiology	6. 最初と最後の頁 1246-1255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00261-019-01958-9	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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 横山 勢也, 東 美智代, 谷本 昭英
2. 発表標題 Predicted Prognosis of Pancreatic Cancer Patients by Machine Learning.
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山 勢也, 東 美智代, 谷本 昭英
2. 発表標題 PDAC摘出術後におけるムチン遺伝子のメチル化解析を用いた予後予測法の構築
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横山 勢也, 東 美智代, 谷本 昭英
2. 発表標題 MUC1およびMUC4遺伝子のメチル化解析による膵癌摘出術後の予後評価
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------