

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07372

研究課題名(和文) 膵腫瘍形成最初期におけるDNA脱メチル化制御の破綻とその分子機序の解明

研究課題名(英文) Dysregulation of DNA demethylation in the first step of pancreatic tumorigenesis and its molecular mechanisms.

研究代表者

藤倉 航平 (Fujikura, Kohei)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：50773751

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・前癌病変4型 (PanIN、IPMN、MCN、IOPN)・正常膵管上皮を対象に、DNA脱メチル化中間産物である5-ヒドロキシメチルシトシンを免疫組織学的に染色したところ、ほぼ全ての病変でシグナル低下を確認した。この現象はすべての異型度の病変で観察された。5-ヒドロキシメチルシトシンの生成には、TET遺伝子が必要なため、TET1を染色したところ、同様に発現の異常低下が確認され、さらに両者には明瞭な相関関係が見られた。脱メチル化が初期の膵腫瘍においても異常を来していることを包括的に解析し明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TET1の低下が5-ヒドロキシメチルシトシンの低下の原因である可能性が示唆された。脱メチル化が初期の膵腫瘍においても異常を来していることを包括的に解析し明らかにしたのは、本研究が初めてである。将来的にTET1が引き起こす脱メチル化異常は膵癌とその全眼病右辺の治療対象となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：5-hydroxymethylcytosine (5hmC), an intermediate product of DNA demethylation, was stained for pancreatic cancer, four precancerous lesions (PanIN, IPMN, MCN, IOPN), and normal pancreatic duct epithelium. The results demonstrated a decreased signal of 5hmC in almost all lesions. Given that the TET gene is essential for the synthesis of 5-hydroxymethylcytosine, we proceeded to stain TET1. The result showed a similarly aberrant decrease in expression, and a clear correlation between the two was also observed. A comprehensive analysis revealed that demethylation is dysregulated in early pancreatic tumorigenesis.

研究分野：病理診断

キーワード：膵癌 前がん病変 メチル化

1. 研究開始当初の背景

膵癌は、本邦欧米のいずれにおいても増加の一途を辿る難治性悪性腫瘍であり、罹患率と死亡率がほぼ同一であることが最大の特徴である。早期診断が長期予後と相関することから、近年、膵癌の前癌病変の早期診断とリスク判定に関する研究が盛んに進められているが、いまだに罹患率・死亡率の十分な低下にはつながっていない。膵癌の発生は多段階発癌モデルに基づいて、遺伝子変異が段階を踏みながら悪性化が進行することが古典的に知られている。つまり、正常な膵管上皮細胞(あるいは腺房細胞)に、*KRAS*、*CDKN2A*、*TP53*、*SMAD4*等の遺伝子変異が積み上がり、一連の組織学的に定義された前駆体を介して、浸潤癌へと進行することが証明されている。*KRAS* 遺伝子 (一部腫瘍では *GNAS*) の変異は、早い段階で起こり、中間段階で *CDKN2A* が不活性化し、*SMAD4* や *TP53* の不活性化は後期で起こると考えられている。

一方で膵癌の発生・悪性化機構には複数の経路が存在することが知られており、病理学的には前癌病変を経た浸潤癌とこれを経ない *de novo* の浸潤癌に大別される。前癌病変は更に、通常型の浸潤性膵管癌と関連する膵上皮内腫瘍性病変 (PanIN) , 管状腺癌と粘液癌に関連する膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) , 管状腺癌と関連する粘液性嚢胞性腫瘍 (MCN) が古典的に知られており、更に近年 Intraductal Oncocytic Papillary Neoplasm (IOPN) が提唱されている。ここ 20 年で、前癌病変の診断と分類に関する研究が急速に進んでいるが、正常組織が腫瘍化する最初期は解明が遅れている。これは、腫瘍発生最初期は異常の蓄積が少なく、アプローチが限定されていることが一因にある。

2018 年に、膵癌の risk factor である糖尿病からのアプローチが報告された (Wu et al. *Nature* 2018)。Wu らは、糖尿病患者の末梢血単核細胞では健常人と比較して 5hmC レベルが有意に低下していることに着目し、その原因が高グルコースによる TET2 の不安定化にあることを証明した。更に、黒色腫細胞株を用いて、TET2 の不安定化および 5hmC レベルの低下が、腫瘍形成の増強につながることを明らかにした。この結果、糖尿病と癌の潜在的な関係性が明らかになった。しかしながら、膵腫瘍最初期における DNA 脱メチル化と腫瘍発生の直接的な因果関係は、マウスモデルにおいてもヒト臨床検体においても実証されていない。

2. 研究の目的

膵前癌病変において、既に DNA 脱メチル化異常が起きていることの実証と、上流因子である TET の軽微な変化が多様な遺伝子の発現異常を惹起していることを証明することを本申請課題の目的とした。

3. 研究の方法

[Step 1] 検体と臨床情報の収集

膵癌および前癌病変 (PanIN、IPMN、IOPN、MCN) および正常膵管の FFPE 標本を収集する。またこれらの基本的な臨床情報を収集する。

[Step 2] 5hmC と TET の免疫染色

5hmC、TET 抗体はいずれも市販されている。予備実験として、5hmC と TET1 染色の条件検討をしたのち、収集した FFPE 標本を染色し、H-score を算出する。さらに、TET の発現量と 5hmC の相関関係を検索する。同様に TET2 関しても同様の実験を行う。TET2 に関しては、抗体の特異性が問題となったため、TET2 を過剰発現させた HEK293T 細胞を組織標本

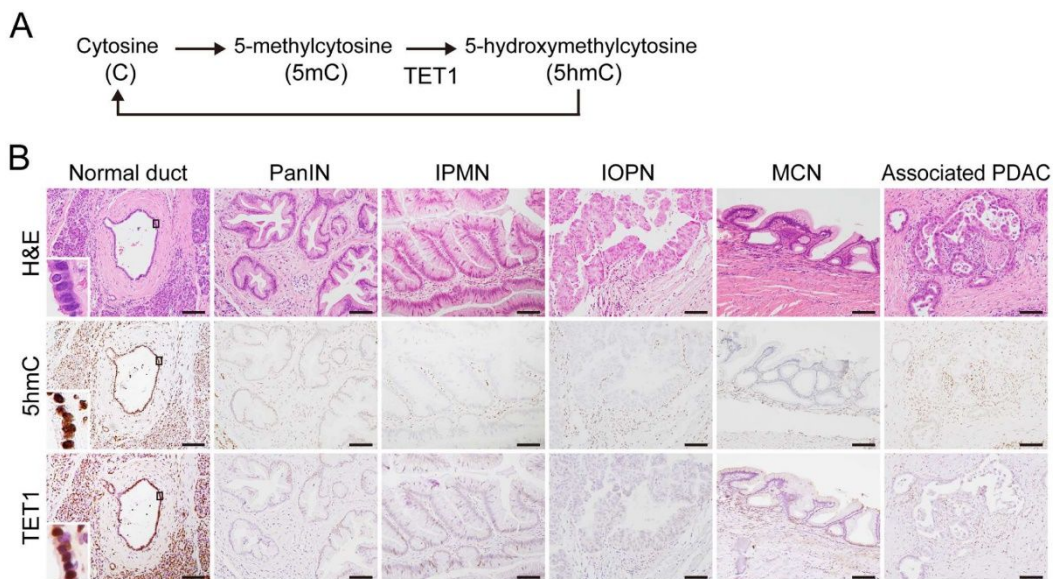
と同様にパラフィン包埋し、抗体の評価を行った。

[Step 3] 予後解析

得られた H-score から、cut off 値を設定し、予後に関する臨床データから、Kaplan Meier の予後曲線を算出する。

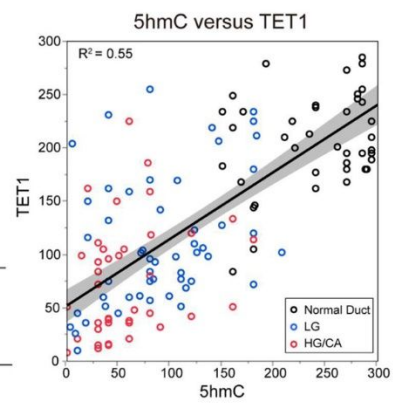
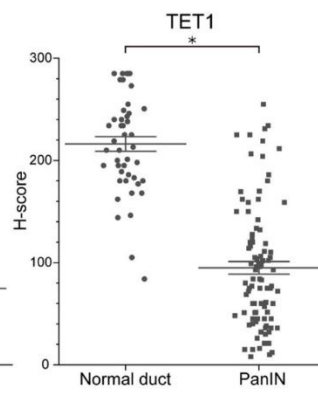
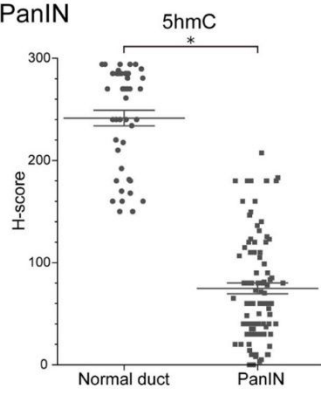
4 . 研究成果

症例収集の結果、研究コホートとして、低悪性度および高悪性度の PanIN (n=95) 、 IPMN (すべてのサブタイプ、n=129) 、 IOPN (n=12) および MCN (n=144) を解析することとした。5hmC および TET1 の免疫染色を実施したところ、正常な膵管上皮と比較して、すべてのタイプの前癌病変および関連する浸潤性膵管腺癌で有意に発現低下しており (すべて $p < 0.001$) 5hmC の発現は TET1 の発現と正の相関を示した。5hmC と TET1 の低下は低悪性度前癌病変のほとんどで観察された。一方で、TET2 も検索を行ったが、5hmC との相関関係はみられなかった。

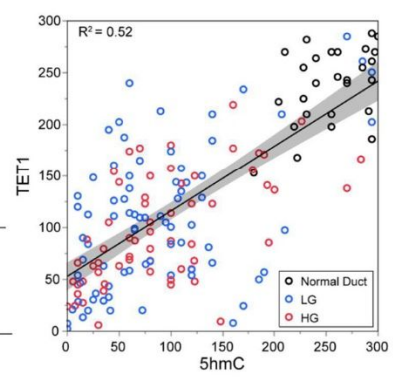
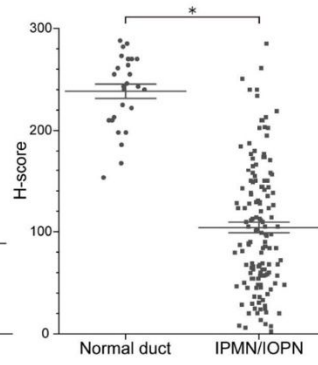
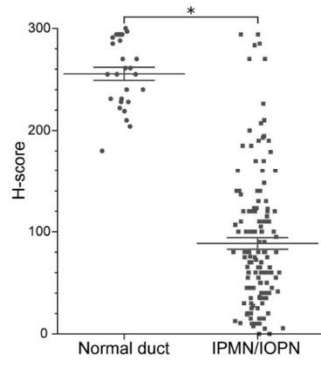


5hmC のレベルと臨床病理学的因子との間に明確な関連は見られなかったことから、前癌病変全体に共通するエピジェネティックな異常であることが示唆された。5hmC と TET1 の低下は、膵臓腫瘍形成の初期イベントの一つであると考えられた。

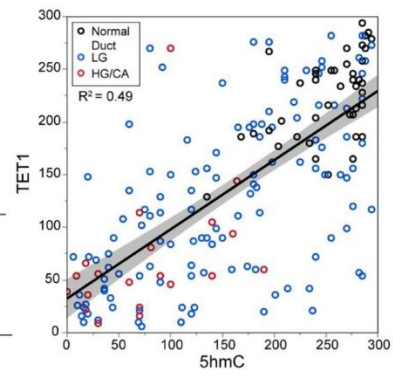
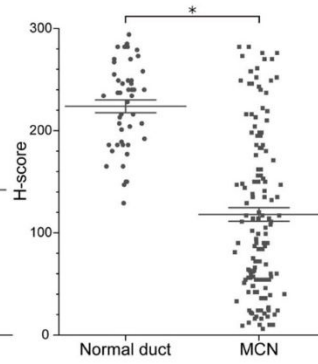
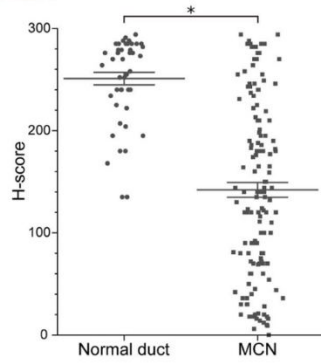
PanIN



IPMN/IOPN



MCN



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujikura Kohei, Alruwaili Zainab, Haffner Michael C, Trujillo Maria A, Roberts Nicholas J, Hong Seung Mo, Macgregor Das Anne, Goggins Michael G, Roy Sujayita, Meeker Alan K, Ding Ding, Wright Michael, He Jin, Hruban Ralph H, Wood Laura D	4. 巻 254
2. 論文標題 Downregulation of 5 hydroxymethylcytosine is an early event in pancreatic tumorigenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 279 ~ 288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5682	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 該当する

1. 著者名 Fujikura Kohei, Hosoda Waki, Felsenstein Matthias, et al.	4. 巻 70
2. 論文標題 Multiregion whole-exome sequencing of intraductal papillary mucinous neoplasms reveals frequent somatic <i>KLF4</i> mutations predominantly in low-grade regions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gut	6. 最初と最後の頁 928 ~ 939
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/gutjnl-2020-321217	査読の有無 無
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 Fujikura Kohei, Yamashita Daisuke, Yoshida Makoto, Ishikawa Takayuki, Itoh Tomoo, Imai Yukihiro	4. 巻 74
2. 論文標題 Cytogenetic complexity and heterogeneity in intravascular lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Pathology	6. 最初と最後の頁 244 ~ 250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jclinpath-2020-206573	査読の有無 無
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 Fujikura Kohei, Uesaka Kazuma	4. 巻 74
2. 論文標題 Genetic variations in the human severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor <i>ACE2</i> and serine protease <i>TMPRSS2</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Pathology	6. 最初と最後の頁 307 ~ 313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jclinpath-2020-206867	査読の有無 無
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 Fujikura Kohei, Yoshida Makoto, Uesaka Kazuma	4. 巻 73
2. 論文標題 Transcriptome complexity in intravascular NK/T-cell lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Pathology	6. 最初と最後の頁 671 ~ 675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jclinpath-2020-206461	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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