

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16418

研究課題名(和文) 肝内胆管癌におけるDNAメチル化とIDH変異に関する包括的検討

研究課題名(英文) DNA methylation and IDH mutations in intrahepatic cholangiocarcinoma

研究代表者

宮田 辰徳(Miyata, tatsunori)

熊本大学・生命科学研究部(医)・特定研究員

研究者番号：80594887

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)：肝内胆管癌(ICC)における臨床病理学的因子とLINE-1メチル化レベルの解析において、低メチル化群で有意にリンパ節転移の頻度が高く( $p=0.04$ )、全生存期間で有意に予後不良であった(Log-rank  $p=0.045$ )。

次に、IDH変異(IDH1及びIDH2)を72例中9例(12.5%)にIDH変異を認め、内訳はIDH1変異8例(11.1%)、IDH2変異1例(1.4%)であった。患者情報を入手できた67例において、臨床病理学的因子とIDH変異の関係について評価したが、両群間で臨床病理学的因子、短期的・長期予後、LINE-1のメチル化レベルに統計学的な有意差は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ICCは予後不良な肝がんの一組織型である。術後も早期に再発することから、その予後を予測し再発や予後が不良なICCを同定することは重要である。本研究により、ICCのLINE-1メチル化が低い症例はリンパ節転移が有意に多く、肝切除後の予後が悪かった。しかしながら、IDH変異との関連は示されなかった。より大きなサンプルを用いてLINE-1メチル化を用いたICCの予後予測についてさらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Methylation of LINE-1 promoter region in cancerous and noncancerous areas was measured in resected samples of intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC). In the analysis of clinicopathologic factors and LINE-1 methylation levels, the hypomethylated group had a significantly higher frequency of lymph node metastases ( $p=0.04$ ) and a significantly worse prognosis in overall survival (Log-rank  $p=0.045$ ), but there was no difference between the two groups in recurrence-free survival.

IDH mutations (IDH1 and IDH2) were found in 9 of 72 patients (12.5%), including 8 patients (11.1%) with IDH1 mutation and 1 patient (1.4%) with IDH2 mutation. The relationship between clinicopathological factors and IDH mutations was evaluated in the 67 patients for whom patient information was available, and no statistically significant differences in clinicopathological factors, prognosis, or LINE-1 methylation levels were found between the two groups.

研究分野：消化器外科、肝胆膵癌

キーワード：肝内胆管癌 LINE-1 DNAメチル化 エピジェネティクス IDH変異

## 1. 研究開始当初の背景

本邦における肝癌の約5%を占める肝内胆管癌 (Intrahepatic cholangiocarcinoma: ICC) の予後は極めて不良であり、その5年生存率は約20%と報告されている。現在、治癒が望める治療は根治的肝切除のみであり、化学療法や放射線治療に抵抗性を示すなどから効果的な補助療法が確立しておらず、ICCに対する対策は急務である。現状としては、ICCを早期に発見し、いかに早期に切除を行え得るかが予後の向上に極めて重要である。さらに、再発に対する再肝切除の有効性も報告されており、ICCの発癌や再発予測のバイオマーカーを見出すことは、ICC患者の予後改善を図る上で非常に有用である。

近年のポストゲノム研究として、DNA塩基配列の変化を伴わないエピジェネティックな変化が注目されている。エピジェネティックな研究により、発癌は癌遺伝子及び癌抑制遺伝子の異常だけでなく、DNAメチル化等のエピジェネティックな異常によっても起こることが明らかになってきており、癌の早期発見、治療、予防の標的として注目されてきた。近年の大規模な癌のゲノム解析により、ICCにおける重要なドライバー遺伝子として isocitrate dehydrogenase (IDH) のミスセンス変異が報告された。IDH変異により産生される代謝産物 2-hydroxyglutarate (2-HG) は、5-メチルシトシン (5mC) の脱メチル化に寄与する Ten-eleven translocation (TET) タンパクを阻害することから、エピジェネティクス制御に重要な役割を果たしている。しかしながら、DNAメチル化の surrogate マーカーである LINE-1 のメチル化と、ICCに特徴的な IDH 変異との関連についてはこれまで報告がされておらず、ICCのエピジェネティクスを軸とした新規治療ターゲット、あるいはバイオマーカーとしての観点での研究が必要と考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ICC (癌部及び非癌部) のLINE-1のメチル化の状態及びICCのエピジェネティクスの制御として重要であるIDH変異の状態と臨床病理学的項目との関連について包括的に評価することにより、LINE-1及びIDH変異を予後改善のための革新的な治療ターゲットやバイオマーカーとして確立させ、ICCの予後改善に貢献することである。

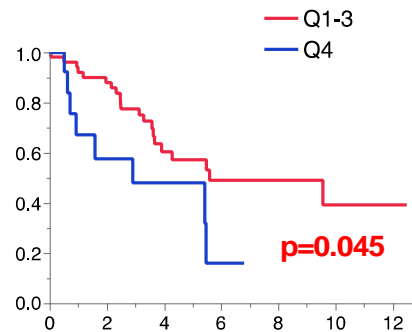
## 3. 研究の方法

熊本大学病院におけるICCの切除サンプルを用いて、LINE-1のプロモーター領域のメチル化レベルを測定し、臨床病理学的背景 (年齢、性別、腫瘍マーカー、腫瘍の大きさ、リンパ節転移、脈管侵襲の有無、進行度等) 及び肝切除後の予後 (無再発生存期間及び全生存期間) との関連を統合的に解析した。また、ICCから抽出した癌部のDNAを用いて、IDH変異 (IDH1及びIDH2) をパイロシーケンス法を用いて評価し、臨床病理学的背景、肝切除後の予後およびLINE-1メチル化レベルとの関連についても併せて評価した。

## 4. 研究成果

67例の癌部および非癌部のサンプルを用いた。LINE-1のメチル化レベルは、癌部で  $81.5 \pm 11.8$  (mean $\pm$ SD)、非癌部で  $84.3 \pm 3.7$  であり、両群間に統計学的有意差は認めなかった。

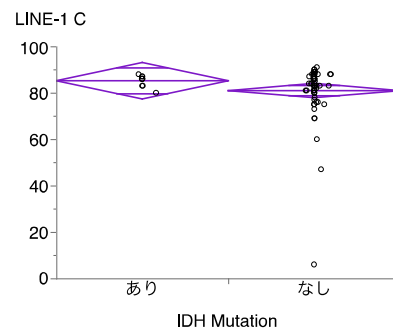
( $p=0.0508$ )。次に、患者群を LINE-1 メチル化レベルの 4 分位点によって 2 群(Q1-3(高 LINE-1 メチル化)および Q4 (低 LINE-1 メチル化))に分け、臨床病理学因子について解析した。年齢、肝炎ウイルス感染、CA19-9 値、腫瘍径、脈管侵襲、腫瘍の分化度において両群間に有意差は認めなかったが、Q4 群において有意にリンパ節転移の頻度が高かった ( $p=0.045$ )。さらに、LINE-1 低メチル化群は高メチル化群に比べ、全生存期間で有意に予後不良であった (Log-rank  $p=0.045$ ) (図 1)。無再発生存期間では、両群間に有意差を認めなかった (Log-rank  $p=0.36$ )。



次に、ICC から抽出した癌部の DNA を用いて、IDH 変異 (IDH1 及び IDH2) についてパイロシーケンス法を用いて評価した。72 例中 9 例 (12.5%) に IDH 変異を認め、内訳は IDH1 変異 8 例 (11.1%)、IDH2 変異 1 例 (1.4%)

であった。臨床データのある 67 例において、臨床病理学的因子と IDH 変異の関係について評価した。年齢、性別、肝炎の有無、アルブミン値、総ビリルビン値、プロトロンビン値、インドシアニングリーン 15 分値、肝硬変の有無において両群間に統計学的有意差を認めなかった。また、腫瘍因子において、腫瘍径、腫瘍個数、CA19-9 値、分化度、脈管侵襲の有無、リンパ節転移の有無についても両群間に統計学的有意差を認めなかった。さらに、癌部、非癌部の LINE-1

LINE-1 メチル化と IDH 変異 (図 2)



メチル化においても両群間で統計学的な有意差は認め

なかった(図 2)。長期予後について Kaplan-Meier 法を用いてログランク検定で検討すると、両群間において無再発生存率 ( $p=0.06$ )、全生存率 ( $p=0.13$ ) に統計学的有意差を認めなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Miyata T, Wu X, Fan X, Huang E, Sanz-Garcia C, Ross CKC, Roychowdhury S, Bellar A, McMullen MR, Dasarathy J, Allende DS, Caballeria J, Sancho-Bru P, McClain CJ, Mitchell M, McCullough AJ, Radaeva S, Barton B, Szabo G, Dasarathy S, Nagy LE	4. 巻 6
2. 論文標題 Differential role of MLKL in alcohol-associated and non-alcohol-associated fatty liver diseases in mice and humans	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.140180	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 Nakao Yosuke, Nakagawa Shigeki, Yamashita Yo-ichi, Umezaki Naoki, Okamoto Yuya, Ogata Yoko, Yasuda-Yoshihara Noriko, Itoyama Rumi, Yusa Toshihiko, Yamashita Kohei, Miyata Tatsunori, Okabe Hirohisa, Hayashi Hiromitsu, Imai Katsunori, Baba Hideo	4. 巻 -
2. 論文標題 High ARHGEF2 (GEF-H1) Expression is Associated with Poor Prognosis Via Cell Cycle Regulation in Patients with Pancreatic Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-020-09383-9	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 Fan Xiude, Liu Zhengwen, Miyata Tatsunori, Dasarathy Srinivasan, Rotroff Daniel M., Wu Xiaoqin, Poulsen Kyle L., Nagy Laura E.	4. 巻 160
2. 論文標題 Effect of Acid Suppressants on the Risk of COVID-19: A Propensity Score-Matched Study Using UK Biobank	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 455 ~ 458.e5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1053/j.gastro.2020.09.028	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 Miyata Tatsunori, Nagy Laura E.	4. 巻 26
2. 論文標題 Programmed cell death in alcohol-associated liver disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical and Molecular Hepatology	6. 最初と最後の頁 618 ~ 625
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3350/cmh.2020.0142	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 Miyata Tatsunori、Hayashi Hiromitsu、Baba Hideo	4. 巻 27
2. 論文標題 ASO Author Reflections: Prognostic Value of the Preoperative Tumor Marker Index in Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Retrospective Single Institutional Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 903 ~ 904
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-020-09039-8	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 Miyata Tatsunori、Hayashi Hiromitsu、Yamashita Yo-ichi、Matsumura Kazuki、Nakao Yosuke、Itoyama Rumi、Yamao Takanobu、Tsukamoto Masayo、Okabe Hirohisa、Imai Katsunori、Chikamoto Akira、Ishiko Takatoshi、Baba Hideo	4. 巻 28
2. 論文標題 Prognostic Value of the Preoperative Tumor Marker Index in Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Retrospective Single-Institution Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 1572 ~ 1580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-020-09022-3	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 Tokunaga Ryuma、Nakagawa Shigeki、Sakamoto Yasuo、Nakamura Kenichi、Naseem Madiha、Izumi Daisuke、Kosumi Keisuke、Taki Katsunobu、Higashi Takaaki、Miyata Tatsunori、Miyamoto Yuji、Yoshida Naoya、Baba Hideo、Lenz Heinz Josef	4. 巻 147
2. 論文標題 12 Chemokine signature, a predictor of tumor recurrence in colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 532 ~ 541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.32982	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 Fan Xiude、Liu Zhengwen、Poulsen Kyle L.、Wu Xiaoqin、Miyata Tatsunori、Dasarathy Srinivasan、Rotroff Daniel M.、Nagy Laura E.	4. 巻 13
2. 論文標題 Alcohol Consumption Is Associated with Poor Prognosis in Obese Patients with COVID-19: A Mendelian Randomization Study Using UK Biobank	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1592 ~ 1592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu13051592	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 Fan Xiude, Wu Jianguo, Poulsen Kyle L., Kim Adam, Wu Xiaojin, Huang Emily, Miyata Tatsunori, Sanz Garcia Carlos, Nagy Laura E.	4. 巻 5
2. 論文標題 Identification of a MicroRNA-E3 Ubiquitin Ligase Regulatory Network for Hepatocyte Death in Alcohol-Associated Hepatitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 830 ~ 845
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep4.1677	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 Hayashi Hiromitsu, Higashi Takaaki, Miyata Tatsunori, Yamashita Yo ichi, Baba Hideo	4. 巻 5
2. 論文標題 Recent advances in precision medicine for pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Gastroenterological Surgery	6. 最初と最後の頁 457 ~ 466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ags3.12436	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 Helsley RN, Miyata T, Kadam A, Nagy LE, Brown JM et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Gut microbial trimethylamine is elevated in alcohol-associated hepatitis and contributes to ethanol-induced liver injury in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.76554	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 Itoyama R, Yasuda-Yoshihara N, Miyata T, Baba H, Ishimoto T et al.	4. 巻 523
2. 論文標題 Metabolic shift to serine biosynthesis through 3-PG accumulation and PHGDH induction promotes tumor growth in pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 29 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2021.09.007	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 Miyata Tatsunori, Hayashi Hiromitsu, Yamashita Yo-ichi, Matsumura Kazuki, Higashi Takaaki, Imai Katsunori, Nitta Hidetoshi, Chikamoto Akira, Beppu Toru, Baba Hideo	4. 巻 29
2. 論文標題 The Impact of Histologic Liver Inflammation on Oncology and the Prognosis of Patients Undergoing Hepatectomy for Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 893 ~ 902
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-021-10706-7	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 Miyata Tatsunori, Yamashita Yo ichi, Arima Kota, Higashi Takaaki, Hayashi Hiromitsu, Imai Katsunori, Nitta Hidetoshi, Chikamoto Akira, Beppu Toru, Baba Hideo	4. 巻 6
2. 論文標題 Alteration of prognostic efficacy of albumin bilirubin grade and Child Pugh score according to liver fibrosis in hepatocellular carcinoma patients with Child Pugh A following hepatectomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Gastroenterological Surgery	6. 最初と最後の頁 127 ~ 134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ags3.12498	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 Sasaki K, Margonis GA, Miyata T, Pawlik TM et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Nontumor related risk score: A new tool to improve prediction of prognosis after hepatectomy for colorectal liver metastases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.surg.2022.01.030	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 YAMAMURA KENSUKE, BEPPU TORU, MIYATA TATSUNORI, OKABE HIROHISA, NITTA HIDETOSHI, IMAI KATSUNORI, HAYASHI HIROMITSU, AKAHOSHI SHINICHI	4. 巻 42
2. 論文標題 Conversion Surgery for Hepatocellular Carcinoma Following Molecular Therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 35 ~ 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.15454	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 -

〔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
---------	---------