

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791384

研究課題名(和文) 消化器癌におけるCDH3プロモーター領域の脱メチル化の意義

研究課題名(英文) Significance of P-cadherin overexpression and methylation status in gastrointestinal cancer.

研究代表者

今井 克憲 (imai, katsunori)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：60555746

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)：当科で外科的根治切除を行った肝内胆管癌59例と膵癌73例において免疫染色を行い、P-cadherinの発現解析を行った。多変量解析において、P-cadherinの高発現は肝内胆管癌、膵癌患者の無再発生存の独立規定因子であった。胆管癌細胞株および膵癌細胞株を用いたin vitro assayにて、P-cadherinの発現は癌細胞の浸潤、遊走に關与しており、プロモーター領域の脱メチル化がその発現に寄与していた。肝内胆管癌及び膵癌におけるP-cadherinの発現は癌細胞の浸潤、遊走能の亢進を介して予後に影響を与え、その発現はプロモーター領域の脱メチル化を介していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Clinicopathological and prognostic significance of P-cadherin expression in 59 intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) and 73 pancreatic cancer patients were examined by immunohistochemistry. Multivariate analyses revealed that P-cadherin expression was the independent prognostic factor for disease-free survival in both cancers. Down-regulation of P-cadherin by siRNA suppressed the migration and invasion of both ICC and pancreatic cancer cells, and overexpression of P-cadherin induced the opposite effects in these cancer cells. Methylation-specific PCR analysis revealed that P-cadherin expression was found to be related to its promoter methylation status in both cancer cell lines and tissues. P-cadherin overexpression may serve as a useful biomarker of invasive phenotype and poor prognosis in patients with ICC and pancreatic cancer. The expression of P-cadherin is found to be regulated by its promoter methylation.

研究分野：消化器外科学

キーワード：P-cadherin CDH3 肝内胆管癌 膵癌 脱メチル化

1. 研究開始当初の背景

P-cadherin は cadherin super family の一つで、その発現は皮膚の基底膜層などに限られており、細胞の増殖や分化に関わっているといわれている。近年、P-cadherin は膵癌や乳癌、子宮体癌、大腸癌、口腔癌など様々な癌腫において、悪性度や予後と関連することが報告されている。我々は以前、膵癌や胃癌、大腸癌などの様々な癌腫において、その癌部に限局して高発現する分子として P-cadherin を同定した。その HLA-A2 拘束性 CTL エピトープを同定し、その抗腫瘍免疫誘導能を証明し、抗腫瘍免疫療法におけるターゲットとしての有用性を報告した。

近年 DNA のメチル化やヒストン脱アセチル化などのエピジェネティックな異常が癌の発生や進展に重要な役割を果たす事が明らかとなり、癌のエピジェネティクス研究はポストゲノム時代における重要な研究課題の一つとなっている。その中で P-cadherin と同じ cadherin super family に属する E-cadherin は、癌抑制遺伝子との観点からそのプロモーター領域のメチル化と発癌や上皮間葉転換 (EMT) 等との関連が多数報告されている。しかし、P-cadherin に関しては、メチル化異常を含むエピジェネティクスと癌との関連に関する報告は少ない。メチル化異常を含むエピジェネティック内情は可逆的な反応であり、癌治療のターゲットとして非常に有用であると考えられる。

2. 研究の目的

消化器癌、特に肝内胆管癌と膵癌における P-cadherin 発現の臨床病理学的意義を明らかにし、さらに P-cadherin の発現を制御するメカニズムとしての、プロモーター領域の脱メチル化の意義を明らかにすること。

3. 研究の方法

1) 熊本大学消化器外科にて外科的根治切除を行った肝内胆管癌 59 例と膵癌 73 例において、免疫組織学的に P-cadherin の発現解析を行い、P-cadherin の発現と臨床病理学的因子や再発、予後との関連を検証。

2) 胆管癌及び膵癌細胞株における P-cadherin 遺伝子の knock-in および knock-out の系を樹立し、P-cadherin の発現が癌細胞の増殖や浸潤、遊走に与える影響を検証。

3) 肝内胆管癌及び膵癌の癌細胞株及び切除検体において、P-cadherin の発現とそのプロモーター領域のメチル化の状態の相関を検証。

4. 研究成果

1) P-cadherin の発現は、胆管癌における腫瘍径とリンパ節転移、膵癌における性別と後部組織および他臓器浸潤と有意に相関していた。多変量解析において、P-cadherin の発現は肝内胆管癌及び膵癌患者の無再発生存の独立規定因子であった (肝内胆管癌: ハザード比 2.93、 $P=0.044$ 、膵癌: ハザード比 2.68、 $P=0.005$)。

2) P-cadherin の発現を認めない癌細胞株 RBE (胆管癌) と MiaPaCa-2 (膵癌) に P-cadherin を強制導入したところ、増殖能は不変であったが、浸潤能、遊走能は有意に亢

進した。また、P-cadherin 高発現株である HuCCT-1 (胆管癌) および PK59 (膵癌) において、si-RNA を用いて P-cadherin の knockdown を行ったところ、浸潤能、遊走能の有意な低下を認めた。

3) メチル化特異的 PCR の手法を用いて P-cadherin のプロモーター領域のメチル化の有無を検討したところ、P-cadherin 高発現株ではプロモーター領域の脱メチル化を認める傾向にあった。P-cadherin 低発現株である MiaPaCa-2 に 5-AZA を添加すると同部は脱メチル化されたが、それに伴って P-cadherin の発現上昇を認めた。さらに、肝内胆管癌切除症例のうち、免疫染色にて P-cadherin が高発現していた 10 例及び低発現の 10 例につき、P-cadherin のプロモーター領域のメチル化の有無を検証した。その結果、P-cadherin 低発現症例では 10 例中全例でそのプロモーター領域のメチル化が認められたが、高発現症例では 10 例中 6 例で脱メチル化されていた。

以上より、P-cadherin は肝内胆管癌および膵癌における悪性度や予後を規定するバイオマーカーであり、その発現はプロモーター領域の脱メチル化に制御されていた。P-cadherin は、肝内胆管癌や膵癌の診断や治療において、有用な標的分子となる可能性が示唆された。

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 44 件)

1. Imai K, Doi Y, Takata N, Yoshinaka I, Harada K. Successful conservative treatment of pneumatosis intestinalis associated with intraperitoneal free air: Report of a case. *Surg Today* 42: 992-996, 2012. 査読有
2. Chikamoto A, Nakahara O, Abe S, Imai K, Nitta H, Hayashi H, Ikuta Y, Doi K, Ishiko T, Takamori H, Beppu T, Baba H. A novel technique for treatment of intrahepatic biliary obstruction using an endobronchial ultrasound system. *Clin J Gastroenterol* 5: 195-198, 2012. 査読有
3. Beppu T, Ishiko T, Chikamoto A, Okabe H, Imai K, Hayashi H, Nitta H, Masuda T, Okabe K, Doi K, Takamori H, Baba H. Bright side and dark side of thermal ablation for hepatocellular carcinoma. *J Microwave Surg* 30: 109-117, 2012. 査読有
4. 坂本快郎, 別府透, 今井克憲, 林洋光, 宮本裕士, 近本亮, 渡邊雅之, 馬場秀夫. 切除可能な大腸癌肝転移に対する治療方針術前化学療法からの立場から *癌と化学療法* 39: 1628-1631, 2012. 査読無
5. 中村健一, 高森啓史, 中原修, 生田義明, 黒木秀幸, 中川茂樹, 美馬浩介, 岡部弘尚, 新田英利, 今井克憲, 近本亮, 土居浩一, 石河隆敏, 別府透, 猪山賢一, 馬場秀夫. 播種性骨髄癌症を呈した膵尾部癌の1例 *癌と化学療法* 39: 1275-1277, 2012. 査読有

6. 土居浩一, 別府透, 近本亮, 美馬浩介, 岡部弘尚, 林洋光, 今井克憲, 新田英利, 坂本快郎, 宮本裕士, 渡邊雅之, 石河隆敏, 馬場秀夫. 【「切除困難例」への化学療法後の手術 - 根治切除はどこまで可能か】切除不能大腸癌肝転移に対するconversion therapy
臨床外科 67: 46-53, 2012. 査読無
7. 近本亮, 別府透, 林洋光, 今井克憲, 新田英利, 馬場秀夫. 長期予後からみた3cm, 3個以下の肝細胞癌に対する治療方針
消化器内科 55: 627-633, 2012. 査読無
8. Sakamoto Y, Beppu T, Miyamoto Y, Okabe H, Ida S, Imai K, Chikamoto A, Watanabe M, Takamori H, Baba H. Feasibility and short-term outcome of adjuvant FOLFOX after resection of colorectal liver metastases.
J Hepatobiliary Pancreat Sci 20: 307-12, 2013. 査読有
9. Imai K, Beppu T, Chikamoto A, Doi K, Okabe H, Hayashi H, Nitta H, Ishiko T, Takamori H, Baba H. Comparison between hepatic resection and radiofrequency ablation as first-line treatment for solitary small-sized hepatocellular carcinoma of 3 cm or less.
Hepatol Res 43: 853-864, 2013. 査読有
10. Mima K, Hayashi H, Imai K, Kuroki H, Nakagawa S, Okabe H, Chikamoto A, Watanabe M, Beppu T, Baba H. High CD44s expression is associated with the EMT expression profile and intrahepatic dissemination of hepatocellular carcinoma after local ablation therapy.
J Hepatobiliary Pancreat Sci 20: 429-34, 2013. 査読有
11. Kinoshita H, Okabe H, Beppu T, Chikamoto A, Hayashi H, Imai K, Mima K, Nakagawa S, Ishimoto T, Miyake K, Yokoyama N, Ishiko T, Baba H. Cystine/glutamic acid transporter is a novel marker for predicting poor survival in patients with hepatocellular carcinoma.
Oncol Rep 2: 685-689, 2013. 査読有
12. Kinoshita H, Okabe H, Beppu T, Chikamoto A, Hayashi H, Imai K, Mima K, Nakagawa S, Yokoyama N, Ishiko T, Shinriki S, Jono H, Ando Y, Baba H. CYLD downregulation is correlated with tumor development in patients with hepatocellular carcinoma.
Mol Clin Oncol 1: 309-314, 2013. 査読有
13. Nitta H, Beppu T, Imai K, Hayashi H, Chikamoto A, Baba H. Adjuvant hepatic arterial infusion chemotherapy after hepatic resection of hepatocellular carcinoma with macroscopic vascular invasion.
World J Surg 37: 1034-1042, 2013. 査読有
14. Okabe H, Beppu T, Nakagawa S, Yoshida M, Hayashi H, Masuda T, Imai K, Mima K, Kuroki H, Nitta H, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Watanabe M, Yamashita Y, Baba H. Percentage of future liver remnant volume before portal vein embolization influences the degree of liver regeneration after hepatectomy.
J Gastrointest Surg 17: 1447-1451, 2013. 査読有
15. Ishiko T, Beppu T, Chikamoto A, Imai K, Okabe H, Hayashi H, Nitta H, Baba H. Thoracoscopic local ablation with diaphragmatic incision method for liver surface tumor in the hepatic dome.
Surg Laparosc Endosc Percutan Tech 23: 415-418, 2013. 査読有
16. Nakagawa S, Okabe H, Sakamoto Y, Hayashi H, Hashimoto D, Yokoyama N, Sakamoto K, Kuroki H, Mima K, Nitta H, Imai K, Chikamoto A, Watanabe M, Beppu T, Baba H. Enhancer of zest homolog 2 (EZH2) promotes progression of cholangiocarcinoma cells by regulating cell cycle and apoptosis.
Ann Surg Oncol 20: S667-675, 2013. 査読有
17. 今井克憲, 別府透, 石河隆敏, 藏元一崇, 新田英利, 林洋光, 近本亮, 馬場秀夫. エキスパートが教える内視鏡外科手術: ポイントとなる解剖の理解 テーマ(4) 鏡視下局所凝固療法
消化器外科 36: 804-812, 2013. 査読無
18. 新田英利, 別府透, 藏元一崇, 今井克憲, 林洋光, 石河隆敏, 馬場秀夫. 【最近の肝細胞癌の診断と治療】肝細胞癌に対する局所治療
コンセンサス癌治療 12:, 77-82, 2013. 査読無
19. 林洋光, 別府透, 新田英利, 今井克憲, 近本亮, 馬場秀夫. 【最新 肝胆膵脾外科アトラス】肝臓 腹腔鏡用手補助下肝切除術
手術 67: 749-753, 2013. 査読無
20. 別府透, 林洋光, 今井克憲, 新田英利, 橋本大輔, 近本亮, 石河隆敏, 馬場秀夫. 血管浸潤を伴う肝切除の進歩 (特集 肝切除をめぐる最近の話題)
外科 75: 1200-1208, 2013. 査読無
21. 別府透, 林洋光, 新田英利, 今井克憲, 橋本大輔, 近本亮, 石河隆敏, 馬場秀夫. 肝細胞癌の最新外科治療 - 内視鏡外科治療とIVR併用肝切除を中心に.
日本インターベンショナルラジオロジー学会誌 28: 391-397, 2013. 査読無
22. Hayashi H, Beppu T, Masuda T, Okabe H, Imai K, Hashimoto D, Ikuta Y, Chikamoto A, Watanabe M, Baba H. Large splenic volume may be a useful predictor for partial splenic embolization-induced liver function improvement in cirrhotic patients.
J Hepatobiliary Pancreat Sci 21: 51-57, 2014. 査読有
23. Okabe H, Beppu T, Chikamoto A, Hayashi H, Yoshida M, Masuda T, Imai K, Mima K, Nakagawa S, Kuroki H, Nitta H, Ishiko T, Hashimoto D, Yamashita Y, Baba H. Remnant liver volume-based predictors of postoperative liver dysfunction after hepatectomy: analysis of 625 consecutive patients from a single institution.

- Int J Clin Oncol* 19: 614-621, 2014. 査読有
24. Kaida T, Chikamoto A, Kiyozumi Y, Nitta H, Imai K, Nakahara O, Ikuta Y, Doi K, Ishiko T, Beppu T, Baba H. Neuroendocrine tumor in the Glissonian pedicle of the hepatic hilum: report of a case. *Int Canc Conf J* 3: 72-76, 2014. 査読有
 25. Chikamoto A, Hashimoto D, Ikuta Y, Tsuji A, Abe S, Hayashi H, Imai K, Nitta H, Ishiko T, Watanabe M, Beppu T, Baba H. Effects of the closing speed of stapler jaws on bovine pancreases. *Surg Endosc* 28: 336-340, 2014. 査読有
 26. Ikuta Y, Yakamori H, Sakamoto Y, Hashimoto D, Chikamoto A, Kuroki H, Sakata K, Sakamoto K, Hayashi H, Imai K, Nitta H, Hirota M, Kanemitsu K, Beppu T, Baba H. The modified Glasgow prognostic score (mGPS) is a good predictor of indication for palliative bypass surgery in patients with unresectable pancreatic and biliary cancers. *Int J Clin Oncol* 19: 629-635, 2014. 査読有
 27. Beppu T, Sakamoto Y, Imai K, Hayashi H, Nitta H, Miyamoto Y, Chikamoto A, Watanabe M, Baba H. A patient with paraaortic lymph node metastases with colorectal liver metastases who survived for 7 years. *Int Canc Conf J* 3: 153-157, 2014. 査読有
 28. Nakagawa S, Beppu T, Okabe H, Sakamoto K, Kuroki H, Mima K, Nitta H, Imai K, Hayashi H, Sakamoto Y, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Watanabe M, Baba H. Triple-positive tumor markers predict recurrence and survival in early-stage hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 44: 964-974, 2014. 査読有
 29. Okabe H, Ishimoto T, Mima K, Nakagawa S, Hayashi H, Kuroki H, Imai K, Nitta H, Saito S, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Watanabe M, Nagano O, Beppu T, Saya H, Baba H. CD44s signals the acquisition of the mesenchymal phenotype required for anchorage-independent cell survival in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 110: 958-966, 2014. 査読有
 30. Beppu T, Miyamoto Y, Sakamoto Y, Imai K, Nitta H, Hayashi H, Chikamoto A, Watanabe M, Ishiko T, Baba H. Chemo- and targeted therapy for patients with initially unresectable colorectal liver metastases, focusing on conversion hepatectomy and long-term survival. *Ann Surg Oncol* 21: Supple 3, 405-413, 2014. 査読有
 31. Okabe H, Beppu T, Hayashi H, Mima K, Nakagawa S, Kuroki H, Imai K, Nitta H, Masuda T, Hashimoto D, Chikamoto A, Watanabe M, Ishiko T, Yoshida M, Yamashita Y, Baba H. Rank classification based on the combination of indocyanine green retention rate at 15 min and 99mTc-DTPA-galactosyl human serum albumin scintigraphy predicts the safety of hepatic resection. *Nucl Med Commun* 35: 478-483, 2014. 査読有
 32. Imai K, Emi Y, Iyama KI, Beppu T, Ogata Y, Kakeji Y, Samura H, Oki E, Akagi Y, Maehara Y, Baba H. Splenic volume may be a useful indicator of the protective effect of bevacizumab against oxaliplatin-induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome. *Eur J Surg Oncol* 40: 559-566, 2014. 査読有
 33. Imai K, Beppu T, Chikamoto A, Mima K, Okabe H, Hayashi H, Nitta H, Ishiko T, Baba H. Salvage treatment for local recurrence of hepatocellular carcinoma after local ablation therapy. *Hepatol Res* 44: E335-345, 2014. 査読有
 34. Beppu T, Nitta H, Tsukamoto M, Imai K, Hayashi H, Okabe H, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Baba H. *Asian J Endosc Surg* 7: 188-192, 2014. 査読有
 35. Imai K, Beppu T, Yamao T, Okabe H, Hayashi H, Nitta H, Daisuke H, Mima K, Nakagawa S, Sakamoto K, Chikamoto A, Ishiko T, Baba H. Clinicopathological and prognostic significance of preoperative serum zinc status in patients with hepatocellular carcinoma after initial hepatectomy. *Ann Surg Oncol* 28: 3817-3826, 2014. 査読有
 36. Komori H, Beppu T, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Hayashi H, Imai K, Nitta H, Watanabe M, Baba H. Irinotecan Plus S-1 Followed by Hepatectomy for a Patient with Initially Unresectable Colorectal Liver Metastases, Who Showed Severe Drug Rash with Oxaliplatin Plus 5-FU and Leucovorin (FOLFOX). *Case Rep Gastrointest Med* 906759, 2014. 査読有
 37. Miyamoto Y, Beppu T, Sakamoto Y, Imai K, Hayashi H, Nitta H, Ishiko T, Watanabe M, Baba H. Simultaneous laparoscopic resection of primary tumor and liver metastases for colorectal cancer: Surgical technique and short-term outcome. *Hepatogastroenterology* 2014(in press). 査読有
 38. 林洋光, 坂本快郎, 宮本裕士, 黒木秀幸, 東孝暁, 坂本慶太, 新田英利, 今井克憲, 近本亮, 石河隆敏, 別府透, 馬場秀夫. 肝転移 - 切除不能大腸癌に対する conversion therapy - CareからCureへの conversion. *臨床外科* 69: 454-460, 2014. 査読無
 39. 竹山秀晶, 新田英利, 東孝暁, 坂本慶太, 中川茂樹, 林洋光, 今井克憲, 橋本大輔, 近本亮, 石河隆敏, 別府透, 馬場秀夫. 高度脈管侵襲陽性肝細胞癌に対する術後短期肝動注療法の有用性. *癌と化学療法* 41: 1506-1508, 2014. 査読無

40. Hayashi H, Beppu T, Okabe H, Kuroki H, Nakagawa S, Imai K, Nitta H, Chikamoto A, Ishiko T, Baba H. Functional assessment vs. conventional volumetric assessment in the prediction of surgical outcomes after major hepatectomy. *Surgery* 157: 20-26, 2015. 査読有
41. Nagai Y, Beppu T, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Hayashi H, Nitta H, Imai K, Masuda T, Okabe H, Hirashima K, Imamura Y, Baba Y, Chikamoto A, Baba H. Carcinoembryonic antigen half-line is an early predictor of therapeutic effects in induction chemotherapy for liver metastases from colorectal cancer. *Anticancer Res* 2014, 34: 5529-5535. 査読有
42. Nitta H, Beppu T, Itoyama A, Higashi T, Sakamoto K, Nakagawa S, Mima K, Okabe H, Imai K, Hayashi H, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Baba H. Poor outcomes after hepatectomy in patients with ascites infected by methicillin-resistant staphylococci. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 22: 166-176, 2015. 査読有
43. Beppu T, Hayashi H, Okabe H, Imai K, Nitta H, Masuda T, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Kikuchi K, Baba H. Hybrid-including endoscopic versus open hepatectomy for patients with hepatocellular carcinoma meeting the Milan criteria: A propensity-case matched analysis. *Anticancer Res* 35: 1583-1590, 2015. 査読有
44. Sakamoto K, Beppu T, Hayashi H, Nakagawa S, Okabe H, Nitta H, Imai K, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Kikuchi K, Baba H. Antiviral therapy and long-term outcome for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma after curative liver resection in a Japanese cohort. *Anticancer Res* 35: 1647-1655, 2015. 査読有

〔学会発表〕(計3件)

1. 坂本慶太、肝内胆肝癌における P-cadherin の発現と予後との関連、第 68 回日本消化器外科学会、2013/7/18、宮崎
2. 坂本慶太、肝細胞癌における局所凝固療法後の治療部位再発に対するサルベージ治療の検討、第 30 回日本ハイパーサーミア学会、2013/8/30、横浜
3. 坂本慶太、肝細胞癌治療のガイドライン・コンセンサス・アルゴリズムの検証、第 114 回日本外科学会定期学術集会、2014/4/5、京都

〔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：
出願年月日：
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

今井 克憲 (IMAI, katsunori)
熊本大学医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号：60555746