

厚生労働科学研究委託費
(革新的がん医療実用化研究事業)
研究報告(総括)

膵管内乳頭粘液腫瘍患者における超早期膵癌捕捉技術の開発
(H26-革新的がん-一般-026)

研究代表：大阪市立大学医学研究科肝胆膵内科 病院講師 萩原淳司

研究要旨：

DNAメチル化状態とmiRNAの発現の関係を利用し膵管内乳頭粘液腫瘍患者における超早期膵癌捕捉技術の開発を試みる。DNAメチル化は発癌メカニズムの一つである。前癌病変においてもDNAメチル化は次第に蓄積されるためDNA全体のメチル化状態を調べることで、発癌予測や癌の早期発見が出来る。しかし、膵管内乳頭粘液腫瘍(IPMN)は前癌病変異変と言われるが、生検は禁忌である。定期検査をしているにも関わらず、切除不能膵癌となることがあり、癌化するIPMNをより正確に見つけることが急務である。miRNAは末梢血中に安定な形態で存在し、その発現もまた、メチル化により制御されている。2014年09月から膵癌及び前癌病変患者、膵疾患患者のRNA及びDNA抽出開始した。現在、DNAメチル化及びmicroRNA発現解析しており、結果が期待されることである。

研究代表：
大阪市立大学医学研究科肝胆膵内科
病院講師 萩原淳司

A. 背景及び目的

目的：DNAメチル化状態とmiRNAの発現の関係を利用した膵管内乳頭粘液腫瘍患者における超早期膵癌捕捉技術の開発を試みる。
背景：DNAメチル化は発癌メカニズムの一つである。筆者らは膵癌で27個、新規のメチル化異常を発見し(Hagihara et al. Oncogene 2004)、診断キット化を試みた(特願2003-322821, 322822, 322823, 322824, 322825, 322826, 322827, US Patent 7763422)。さて、前癌病変においてもDNAメチル化は次第に蓄積されるためDNA全体のメチル化状態を調べることで、発癌予測や癌の早期発見が出来る。膵臓は生検により膵炎を発症するリスクが高く、膵液採取にても重篤な膵炎が起こりうる。膵管内乳頭粘液腫瘍(IPMN)は前癌病変異変と言われるが、生検は禁忌である。定期検査をしているにも関わらず、切除不能膵癌となることがあり、癌化するIPMNをより正確に見つけることが急務である。miRNAは末梢血中に安定な形態で存在し、その発現もまた、メチル化により制御されている。血中のmiRNAの発現からメチル化の蓄積状態を類推することで発癌リスクの高いIPMNを同定する。膵癌とIPMNのmiRNA発現を単に比べるのではなく、血中に存在するmiRNAから、組織でのDNAメチル化の蓄積状態を類推することでIPMNにおける膵癌の発癌予測が出来る。従って、

超早期膵癌を捕捉することが可能となる。

B. 研究方法

本研究「膵管内乳頭粘液腫瘍(IPMN)患者における超早期膵癌捕捉技術の開発」は、大阪市立大学医学部附属病院へ通院中または入院中の患者の検体を使い施行される。DNAメチル化により癌抑制遺伝子がサイレンシングされることが発癌メカニズムの一つである。前癌病変において重要でない遺伝子のメチル化が次第に蓄積されていき最後に癌抑制遺伝子など重要な遺伝子のメチル化が起こることが知られている。膵管内乳頭粘液腫瘍(IPMN)患者及び膵癌患者のメチル化解析を行う。(担当 山下)
miRNAもまた、メチル化によりその発現が制御されており(Saito and Jones. Cell Cycle 2006)、膵癌においても、miR-132, miR-148a, miR-107, miR-34, miR-124の報告がある(Wang et al. Oncogene 2014)。miRNAは末梢血中に安定な形態で存在する(Mitchel, et al. Proc Natl Acad Sci 2008, Murakami, et al. PLOS one 2012)。血清中のエクソソーム濃縮画分より抽出したRNAをマイクロアレイ(アジレントヒトmiRNA マイクロアレイ Rel 14.0)にてmiRNA発現解析を行う。また、統計解析支援環境のRを用いて膵癌及びIPMNに特異的なmiRNA発現プロファイルを作成する。(担当 村上)
膵管内乳頭粘液腫瘍患者における超早期膵癌捕捉技術の開発の目処がいたら、別の病院(京都大学付属病院)で実証試験を行う。(担当 金井)

倫理面への配慮：

本研究はヘルシンキ宣言および「臨床研究に関する倫理指針」（平成20年厚生労働省告示第415号）、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成25年厚生労働省施行通知）に従う。

C. 研究結果：

2014年5月、「膵管内乳頭粘液腫瘍患者における超早期膵癌捕捉技術の開発」（H26 - 革新的がん - 一般 - 026）研究開始。2014年06月1日、大阪市立大学において倫理委員会の承認を得た。倫理委員会承認後、血液検体収集を開始し現時点で148例収集している。また同時に、手術凍結標本の収集も開始し、現時点で32例収集している。2014年06月20日、第1回班会議開催し、分担研究者の役割を確認した。2014年09月から膵癌及び前癌病変患者、膵疾患患者のRNA及びDNA抽出開始した。2014年10月から少数例でDNAメチル化及びmicroRNA発現解析を開始しており、結果が期待されることである。

さて、血液中を循環するmiRNAは、エキソソームという脂質二重膜で形成される直径40nm~100nm程度の小胞に内包されている。エキソソームは、どの細胞からも放出されている膜粒子であるが、内包されているmiRNAの種類は、細胞により異なる。従って、がん細胞由来のエキソソームと正常細胞からのそれは異なる。血液中に循環するエキソソームは、がんの進行に比例してがん細胞由来の比率が高くなると考えられ、それに内包されるmicroRNA発現パターンにも変化があると予想される。そこで、血液からがん細胞由来のエキソソーム含有画分を分離するのに最適な方法を検討中である。

D. 考察：

厚生労働省は、「対がん10ヵ年総合戦略」を策定し、予防、診断、治療等の研究及びその成果の普及に取り組んできた。しかしながら、膵癌は、発見時にはすでに切除不能になっていることが多く難治癌である。従って、超早期発見のための革新的なバイオマーカーの開発研究が急務である。また、個人の発現リスクに応じた対応が必要である。「DNAメチル化状態とmiRNAの発現の関係を利用した膵管内乳頭粘液腫瘍患者における超早期膵癌捕捉技術の開発」により、膵癌発症のリスクを推定することが出来る。

さて、がん診療連携拠点病院などにおいて、がんの個別化予防や新たな検診手法の実用化を目指した前向き大規模追跡研究を行うためには、対象者の捕捉と追跡が不可欠である。どのような対象者を捕捉するかを決める判断材料に「DNAメチル化状態とmiRNAの発現の関係を利用した膵管内乳頭粘液腫瘍患者における超早期膵癌捕捉技術の開発」は大いに貢献すると思われる。また、この手法は、他の癌（胃癌、大腸癌、肝癌、肺癌、乳癌など）でも応用できるので、臨床現場においてシーケンス解析が活用される切掛けになるとと思われる。

E. 結論：

膵癌及び前癌病変患者、膵疾患患者のRNA及びDNA抽出し、DNAメチル化及びmicroRNA発現解析しており、結果が期待されることである。

F. 健康危険情報：

特に無し

G. 研究発表：

論文発表：

萩原淳司：

1. Kawamura E, Shiomi S, Kotani K, Kawabe J, Hagihara A, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Enomoto M, Murakami Y, Tamori A, Kawada N.

Positioning of 18F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography imaging in the management algorithm of hepatocellular carcinoma.

J Gastroenterol Hepatol. 2014 Sep;29(9):1722-7.

2. Hagihara A, Ikeda M, Ueno H, Morizane C, Kondo S, Nakachi K, Mitsunaga S, Shimizu S, Kojima Y, Suzuki E, Katayama K, Imanaka K, Tamai C, Inaba Y, Sato Y, Kato M, Okusaka T.

A phase I study of the combination chemotherapy of sorafenib and transcatheter arterial infusion with cisplatin for advanced hepatocellular carcinoma.

Cancer Sci. 2014 Mar;105(3):354-8

3. Motoyama H, Komiya T, Thuy le TT, Tamori A, Enomoto M, Morikawa H, Iwai S, Uchida-Kobayashi S, Fujii H, Hagihara A, Kawamura E, Murakami Y, Yoshizato K, Kawada N.

Cytoglobin is expressed in hepatic stellate cells, but not in myofibroblasts, in normal and fibrotic human liver.

Lab Invest. 2014 Feb;94(2):192-207.

4. Hai H, Tamori A, Enomoto M, Morikawa H, Uchida-Kobayashi S, Fujii H, Hagihara A, Kawamura E, Thuy le TT, Tanaka Y, Kawada N.

Relationship between inosine triphosphate genotype and outcome of extended therapy in hepatitis C virus patients with a late viral response to pegylated-interferon and ribavirin.

J Gastroenterol Hepatol. 2014 Jan;29(1):201-7.

5. Hagihara A, Teranishi Y, Kawamura E, Fujii H, Iwai S, Morikawa H, Enomoto M, Tamori A, Kawada N.

A complete response induced by 21-day sorafenib therapy in a patient with advanced

hepatocellular carcinoma.
Intern Med. 2013;52(14):1589-92.

6. Hagihara A, Miyamoto K, Furuta J, Hiraoka N, Wakazono K, Seki S, Fukushima S, Tsao MS, Sugimura T, Ushijima T.

Identification of 27 5' CpG islands aberrantly methylated and 13 genes silenced in human pancreatic cancers.

Oncogene. 2004 Nov 11;23(53):8705-10.

山下聡 :

1. Takahashi T, Yamashita S, Matsuda Y, Kishino T, Nakajima T, Kushima R, Kato K, Igaki H, Tachimori Y, Osugi H, Nagino M and Ushijima T. ZNF695 methylation predicts a response of esophageal squamous cell carcinoma to definitive chemoradiotherapy. J Cancer Res Clin Oncol, 141:453-463 (2015).

2. Yamaguchi T, Mukai H, Yamashita S, Fujii S and Ushijima T. Comprehensive DNA methylation and extensive mutation analyses of HER2-positive breast cancer. Oncology, online.

3. Zong L, Hattori N, Yoda Y, Yamashita S, Takeshima H, Takahashi T, Maeda M, Katai H, Nanjo S, Ando T, Seto Y, and Ushijima T. Establishment of a DNA Methylation Marker to Evaluate Cancer Cell Fraction in Gastric Cancer. Gastric Cancer, in press.

4. Takeshima H, Wakabayashi M, Hattori N, Yamashita S, Ushijima T.

Identification of coexistence of DNA methylation and H3K27me3 specifically in cancer cells as a promising target for epigenetic therapy.

Carcinogenesis. 2014 Dec 4. pii: bgu238. [Epub ahead of print]

金井雅史 :

1. Xue P, Kanai M, Mori Y, Nishimura T, Uza N, Kodama Y, Kawaguchi Y, Takaori K, Matsumoto S, Uemoto S, Chiba T.

Comparative outcomes between initially unresectable and recurrent cases of advanced pancreatic cancer following palliative chemotherapy.

Pancreas. 2014 Apr;43(3):411-6.

2. Kanai M.

Therapeutic application of curcumin for patients with pancreatic cancer

World Journal of Gastroenterology 2014 in press

3. Xue P, Kanai M, Mori Y, Nishimura T, Uza N, Kodama Y, Kawaguchi Y, Takaori K, Matsumoto S, Uemoto S, Chiba T.

Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio for Predicting Palliative Chemotherapy Outcomes in Advanced Pancreatic Cancer Patients

Cancer Medicine 2014 Feb 12. Doi: 1002/cam4.204

河田則文 :

1. Fujii H, Kawada N.

Fibrogenesis in alcoholic liver disease.

World J Gastroenterol. 2014 Jul 7;20(25):8048-54.

2. Kawaguchi T, Shiraishi K, Ito T, Suzuki K, Koreeda C, Ohtake T, Iwasa M, Tokumoto Y, Endo R, Kawamura NH, Shiraki M, Habu D, Tsuruta S, Miwa Y, Kawaguchi A, Kakuma T, Sakai H, Kawada N, Hanai T, Takahashi S, Kato A, Onji M, Takei Y, Kohgo Y, Seki T, Tamano M, Katayama K, Mine T, Sata M, Moriwaki H, Suzuki K.

Branched-chain amino acids prevent hepatocarcinogenesis and prolong survival of patients with cirrhosis.

Clin Gastroenterol Hepatol. 2014 Jun;12(6):1012-8.

村上善基 :

1. Murakami Y, Tanahashi T, Okada R, Toyoda H, Kumada T, Enomoto M, Tamori A, Kawada N, Taguchi YH, Azuma T.

Comparison of hepatocellular carcinoma miRNA expression profiling as evaluated by next generation sequencing and microarray.

PLoS One. 2014 Sep 12;9(9):e106314.

2. Taguchi YH, Murakami Y.

Universal disease biomarker: can a fixed set of blood microRNAs diagnose multiple diseases?

BMC Res Notes. 2014 Aug 30;7:581.

田守昭博 :

1. Hai H, Tamori A, Kawada N.

Role of hepatitis B virus DNA integration in human hepatocarcinogenesis.

World J Gastroenterol. 2014 May 28;20(20):6236-43.

2. Tamori A, Hino M, Kawamura E, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Morikawa H, Nakamae H, Enomoto M, Murakami Y, Kawada N.

Prospective long-term study of hepatitis B virus reactivation in patients with hematologic malignancy.

J Gastroenterol Hepatol. 2014 Sep;29(9):1715-21.

平川弘聖 :

1. Kimura K, Amano R, Nakata B, Yamazoe S,

Hirata K, Murata A, Miura K, Nishio K, Hirakawa T, Ohira M, Hirakawa K.
Clinical and pathological features of five-year survivors after pancreatectomy for pancreatic adenocarcinoma.
World J Surg Oncol. 2014 Nov 27;12:360.

2. Hirata K, Nakata B, Amano R, Yamazoe S, Kimura K, Hirakawa K.
Predictive factors for change of diabetes mellitus status after pancreatectomy in preoperative diabetic and nondiabetic patients.
J Gastrointest Surg. 2014 Sep;18(9):1597-603.

H. 知的財産権の出願及び登録状況：

特許：
特願2012-37586 「テスト体液サンプルの分離方法」 村上善基 (2012-2-23)
特願2010-86966 「遺伝子発現解析を用いた肝線維化の評価方法」 村上善基. (2010-4

-5)

特願2003-322821, 322822, 322823, 322824, 322825, 322826, 322827
哺乳動物由来の検体の癌化度を評価する方法.
発明者：萩原淳司、牛島俊和、出願人：厚生労働省、住友化学工業株式会社

US Patent 7763422
Method of Cancerization degree.
Inventaors: Atsushi Hagihara, Ushijima Toshikazu
Assignee: Japan Government represented by National Cancer Center, Sumitomo Chemical Company Limited.

その他：
なし

作成上の留意事項

1. 「A. 研究目的」について
 - ・厚生労働行政の課題との関連性を含めて記入すること。
2. 「B. 研究方法」について
 - (1) 実施経過が分かるように具体的に記入すること。
 - (2) 「(倫理面への配慮)」には、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意(インフォームド・コンセント)に関わる状況、実験に動物に対する動物愛護上の配慮など、当該研究を行った際に実施した倫理面への配慮の内容及び方法について、具体的に記入すること。倫理面の問題がないと判断した場合には、その旨を記入するとともに必ず理由を明記すること。

なお、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成25年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)、疫学研究に関する倫理指針(平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号)、遺伝子治療臨床研究に関する指針(平成16年文部科学省・厚生労働省告示第2号)、臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(平成18年厚生労働省告示第425号)、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)及び申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守するとともに、あらかじめ当該研究機関の長等の承認、届出、確認等が必要な研究については、研究開始前に所定の手続を行うこと。
3. 「C. 研究結果」について
 - ・当該年度の研究成果が明らかになるように具体的に記入すること。
4. 「F. 健康危険情報」について
 - ・業務項目の担当責任者や研究協力者の把握した情報・意見等についても業務主任者がとりまとめて委託業務成果報告(総括)に記入すること。
5. その他
 - (1) 日本工業規格A列4番の用紙を用いること。
 - (2) 文字の大きさは、10～12ポイント程度とする。