

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究委託事業

(委託業務題目) 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)

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 萩原 淳司

平成27(2015)年 3月

委託業務成果報告書目次

目 次

I . 委託業務成果報告 (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 (H 2 6 - 革新的がん - 一般 - 0 2 6)	----- 4
大阪市立大学医学研究科 肝胆膵病態内科 病院講師 萩原 淳司	
II . 委託業務成果報告 (業務項目)	
1 . DNAメチル化を利用した早期膵癌診断マーカーの開発 ----- 8	
国立がん研究センター研究所 エピゲノム解析分野 ユニット長 山下 聡	
2 . エクソソーム中miRNAを利用した早期膵癌診断マーカーの開発 ----- 11	
大阪市立大学医学研究科 肝胆膵病態内科 准教授 村上 善基	
3 . 血清中のエクソソーム回収方法と回収効果の検討と miRNAの発現パターンに関する研究 ----- 14	
大阪市立大学医学研究科 肝胆膵病態内科 博士研究員 上田 貴子	
4 . エクソソーム中miRNAを利用した早期膵癌診断マーカーの開発 ----- 15	
京都大学医学部 臨床腫瘍薬理学講座 講師 金井 雅史	
5 . 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 ----- 17	
大阪市立大学医学研究科 肝胆膵病態内科 教授 河田 則文	
6 . 膵癌および膵嚢胞性疾患患者の臨床背景と予後に関する研究 ----- 18	
大阪市立大学医学研究科 肝胆膵病態内科 准教授 田守 昭博	
7 . 膵管内乳頭粘液性腫瘍切除に関する研究 ----- 19	
大阪市立大学医学研究科 腫瘍外科 教授 平川 弘聖	
III . 学会等発表実績 ----- 21	
IV . 研究成果の刊行物・別刷 ----- 24	

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、結果が期待される所である。

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、結果が期待されるところである。

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、結果が期待されるところである。

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。

DNA メチル化を利用した早期膵癌診断マーカーの開発

業務分担責任者 山下 聡

国立がん研究センター研究所・エピゲノム解析分野・ユニット長

研究要旨

膵管内乳頭粘液性腫瘍（IPMN）患者の中でも、がん化リスクがより高い、高リスクな患者を早期に特定できれば、臨床上非常に有用である。DNA メチル化異常は、ヒト発がんに関与することがよく知られるが、IPMN における DNA メチル化異常についての研究例は限られている。本研究では、膵癌、IPMN、膵臓非腫瘍部の網羅的 DNA メチル化解析を行い、膵癌リスクに関連してメチル化状態が変化する領域を特定し、その後のリスクマーカー開発に応用することを目的とした。本年度は合計 31 サンプルについて、網羅的 DNA メチル化解析を行い、10 個のリスクマーカー候補領域を同定した。

A．研究目的

膵管内乳頭粘液性腫瘍（Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm, IPMN）は膵管内に乳頭状に増殖する膵腫瘍である。いわゆる「通常の膵がん」とは異なり、良性から悪性まで様々な段階があって、経過中に悪性化することがあることも知られる。よって、IPMN 患者の中でも、がん化リスクがより高い、高リスクな患者を早期に特定できれば、臨床上非常に有用である。

DNA メチル化異常は、ヒト発がんに関与することがよく知られ、各種臨床マーカーへの応用展開も始まっているが、IPMN における DNA メチル化異常についての研究例は限られている。

そこで本研究では、膵癌、IPMN、膵臓非腫瘍部の網羅的 DNA メチル化解析を行い、膵癌リスクに関連してメチル化状態が変化する領域を特定し、その後のリスクマーカー開発に応用することを目的とした。このメチル化変化に同調して発現が変化する miRNA を特定し、血中の存在量を測定する（村上分担者による）ことで、血液を用いたリスク診断の可能性が開ける。また、血漿中の cell free DNA は非常に量が少なく、DNA メチル化解析は困難であるが、仮に安定した解析が可能になれば、DNA メチル化測定によるリスク診断の可能性もある。

本年度は、そのアプローチの途中段階として、少数サンプルについて膵癌、IPMN、膵臓非腫瘍部の網羅的 DNA メチル化解析を行い、リスクマーカー候補の同定を試みた。

B．研究方法

(1) ヒトゲノム DNA サンプル

ヒト膵癌関連臨床材料（大阪市立大学病院の膵癌患者の手術後凍結標本に由来する膵癌、IPMN、膵臓非腫瘍部）およびヒト膵臓上皮細胞株（HPDE4）のゲノム DNA は、萩原主任研究者から供与を受けた。ヒト膵臓がん細胞株は、ATCC から購入または JCRB から分与を受け、フェノール・クロロホルム法によりゲノム DNA を抽出した。

(2) ゲノム網羅的 DNA メチル化解析

ヒトゲノム DNA の網羅的メチル化解析には、Infinium HumanMethylation450 beadchip(Illumina)を用いた。重亜硫酸処理したゲノム DNA を増幅し、482,421 CpG 部位および 3,091 non-CpG 部位が解析可能な BeadChip にハイブリダイズして、プライマー伸長反応後、iSCAN (Illumina)スキャナを用いてデータを取得した。完全メチル化を 1、完全非メチル化を 0 とする 値を用いてメチル化の程度を判定した。

(3) DNA メチル化を用いた腫瘍組織中のがん細胞含有率の測定

膵臓非がん部での 値が 0.2 以下（正常で非メチル化）のプローブを抽出した。これらのプローブに限定して腫瘍組織の 値のヒストグラムを描画することにより、がん細胞特異的にメチル化されている CpG の 値を取得、腫瘍組織中のがん細胞含有率とした。

（倫理面への配慮）

臨床材料は同意を得て採取した材料を、文部科学

省・厚生労働省「疫学研究に関する倫理指針」に従い使用した。

C. 研究結果

DNA メチル化異常が膵癌リスクに関連しているゲノム領域の同定

膵癌 (N = 5)、IPMN (がんを伴う高リスク IPMN N = 1, がんを伴わない低リスク IPMN N = 4)、膵臓非腫瘍部 (膵炎を伴うもの N = 6, 膵炎を伴わないもの N = 8)、ヒト膵癌細胞株 (N = 6)、ヒト膵臓上皮細胞株 (N = 1) について、HumanMethylation450 を用いてゲノム網羅的 DNA メチル化解析を行った (合計 31 サンプル)。別の研究で解析した末梢血 (N = 3) の結果を併せて DNA メチル化プロファイルの階層的クラスター解析を行った。

ゲノム全体の CpG を用いた解析、転写開始点近傍の CGI (TSS200 CGI) の解析の双方において、膵癌のサンプルは全て非腫瘍部の一部と同一のクラスターに分類され、膵癌細胞株とは大きく異なるメチル化プロファイルを示した。そこで、膵癌のサンプルにおけるがん細胞の含有率を測定したところ、5 個中 1 個は 40% 程度であったが、残りの 4 個は 20% 以下であり、がん細胞特異的 DNA メチル化解析には用いることができないことがわかった。非腫瘍部については、胃や肝臓で認められるような慢性炎症に伴う高度なメチル化異常が膵臓では認められなかった。

膵癌およびがんを伴う高リスク IPMN それぞれ 1 個を用いて、リスクに伴い異常 DNA メチル化を示すゲノム領域の同定を試みた。膵臓非腫瘍部、血液で非メチル化 (値 < 0.2) を示す CpG 148,587 個にまず限定し、膵癌細胞株の半数以上でメチル化 (値 > 0.8) を示す CpG 6,106 個に絞った。これら膵癌細胞特異的に異常 DNA メチル化を示す CpG の中で、リスクに対応して異常 DNA メチル化を示す CpG、即ち、低リスク IPMN で非メチル化 (値 < 0.2) かつ、膵癌およびがんを伴う高リスク IPMN の少なくとも 1 個で DNA メチル化異常 (値 > 0.2) を示す CpG を検索し、529 個を抽出した。該当するプローブがゲノム中で 3 個以上連なっている領域を特定した結果、10 領域が同定された。そのうち 5 領域は、遺伝子転写開始点近傍のプロモーター CpG island (TSS200 CGI) に存在していた。

D. 考察

本研究で同定された 10 領域は、膵癌のリスクマーカー候補領域であるが、膵癌およびがんを伴う高

リスク IPMN はそれぞれ 1 個であるため、偶然選ばれた可能性が非常に高い。また、今回同定された領域には直接的に特定の miRNA の発現に関係すると考えられる領域 (miRNA のプロモーター領域) は含まれていなかった。サンプル数を増加させることによって、より確からしい、他の候補領域が同定可能と考えられるので、今後、サンプル数を増加させて検討を進める。また、最新のゲノム annotation と照合することで、miRNA の発現に関係すると考えられる異常メチル化領域の同定も可能と考えられる。

血漿中 cell free DNA の安定的な DNA メチル化解析についても検討を進める。最近、良好な回収実績が報告されている血漿中 cell free DNA の抽出法を試みると共に、DNA 抽出と同一のチューブ内で重亜硫酸処理を行う One-step MSP 法 (Yamamoto et al. Breast Cancer Res Treat, 2012) を試みる予定である。

E. 結論

膵癌、IPMN、膵臓非腫瘍部等の合計 31 サンプルについて、網羅的 DNA メチル化解析を行い、10 個のリスクマーカー候補領域を同定した。今後サンプル数を増加させて同様の解析を行う。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

本研究費に謝辞があるもの

該当無し

本研究費に密接に関係するもの

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.

学会発表

1. Yamashita S, Nanjo S, Rehnberg E, Ando T, Maekita T, Ichinose M, Sugiyama T, Ushijima T CpG islands and genomic regions with basal low-level methylation to aberrant DNA methylation induction 第8回日本エピジェネティクス研究会年会 2014年5月26日 東京
2. 山下 聡, 岸野 貴賢, 永野 玲子, 牛島俊和 遺伝子点突然変異のターゲットシーケンシングによる高感度解析法の開発と Genetic な発がんの素地の解析 第29回発癌病理研究会 2014年9

月3日 いわき

3. Yamashita S, Kishino T, Nagano R, Ushijima T High-Sensitivity Analysis of Aberrant DNA Methylation by Targeted Deep Sequencing using a Benchtop Sequencer 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月25日 横浜

H.知的財産権の出願、登録状況

- 1.特許取得
なし
- 2.実用新案登録
なし
- 3.その他
なし

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)
研究報告書

エクソソーム中 miRNA を利用した早期膵癌診断マーカーの開発

分担研究者 村上善基

大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科学・准教授

研究要旨

本邦において膵癌は増加傾向にあり、年間死亡者数は約 2 万人に達している。膵癌の根治療法として切除術が行われているが、切除可能例が少なく予後は非常に悪い。今回我々はエクソソーム中の miRNA の発現プロファイルを利用して、早期膵癌診断法の作成を行う。

A. 研究目的

本邦における膵癌死亡者は約 2 万人である。根治的な治療は切除であるが切除例が 20-40%程度で、1 年生存率も切除可能例は 68.9%であるのに対し、切除不能例で 20.6%、5 年生存率は切除可能例で 26.8%であるのに対し切除不能例は 0%であり、非常に予後不良である。この原因としては早期に診断することが非常に困難であることによる。

エクソソームは血中など体液中に存在している細胞膜成分を持つ直径 100nm 程度の小粒子である。エクソソームは細胞間情報伝達を担うことが報告されており (Thery C et al. Nat Rev Immuno 2009)、その中に miRNA を含んでいる。我々はエクソソーム中の miRNA の発現を利用して慢性肝疾患の原因検索、炎症、線維化の程度を診断する

ことが可能であることを報告した (Murakami Y et al. PLoS ONE 2012)。

また次世代シーケンサー (NGS) 技術の発達により高感度かつ網羅的に小分子 RNA の発現解析を行うことが可能になった。我々は肝細胞癌組織中の total RNA を利用し miRNA の発現解析を NGS にておこなった。マイクロアレイ解析と遜色のない発現感度と、またマイクロアレイでは行うことのできない新規 miRNA の検出を行うことが可能であることを示した (Murakami Y et al. PLoS ONE 2014)。

今回我々はエクソソーム中の miRNA を NGS にて解析し、早期膵癌診断方法の開発を行う。

B. 研究方法

NGS 解析

血清よりエクソクイック(SBI)を使用してエクソソーム成分を濃縮し total RNA を miRNeasy mini kit (Qiagen)を使って抽出する。TruSeq Small RNA Sample Prep Kit (Illumina)を用いライブラリーを作成し、MiSeq (Illumina)を用い、その後 miRDeep2 にて miRbase 20 に準拠した precursor、mature miRNA の発現を解析した。その結果をと miRDeep*にて確認を行った。

(倫理面の配慮)

今年度はなし

C. 結果

エクソソーム回収方法

従来の超遠心法、エクソクイック、ExoRNeasy Kit (Qiagen)を用いてエクソソーム内、とエクソソーム外の miRNA の発現プロファイルを作成した。ゲル濾過法を使って miR-16, 92a はエクソソーム外に多く存在しており、let-7a はエクソソーム内に多く存在していることを利用した(Arroyo JD et al. Proc Natl Acad Sci USA 2011)。超遠心法と ExoRNeasy Kit はエクソソーム外の miRNA を効率よく除去できるため、特異度は高いが感度が低くなる可能性があることに対し、エクソクイックではエクソソーム外の miRNA も回収してしまうので、特異性は低いが感度が高くなる可能性を示した。

エクソソーム中の miRNA 解析

マイクロアレイ解析では total RNA とし

て 50-60ng 程度でも解析可能であったが、NGS 解析では 200-300ng 程度の total RNA が必要であることが判った。

エクソソーム中の small RNA は miRNA だけではなく piwi RNA、ribosomal RNA (rRNA)、transfer RNA (tRNA)、messenger RNA (mRNA)、YRNA などが含まれており、特に YRNA が多く含まれていることが報告されている(Vojtech L et al. Nucleic Acid Res 2014)、そのため NGS 解析の彩に問題になる非特異的な read を減らし、より特異性を高めるために、LNA を用いて YRNA の中でもっとも多く含まれている Y4RNA を除去した。その結果 mapping rate は除去前が 54.8%であるのに対し、除去後は 85.1%となった。LNA にて Y4RNA を除去後に miRDeep2、miRDeep*で解析を行ったところヒト miRNA の中で mir-486-1 と mir-486-2 の read が全体の 70%以上を占めることが判った。そのため LNA にて mir-486-1/2 の除去を行った解析が妥当であるか否かの検討を現在行っている。

D. 考察

エクソソーム中の miRNA 解析には手間が簡便で現在まで慢性肝疾患の診断で実績のあるエクソクイックを用いて行うことが適当であると考えている。また NGS 解析においてエクソソーム中の miRNA 以外の small RNA の存在が解析の阻害になることを考え、それらを subtraction した後に解析をすることが適当と考えている。またヒト由来の miRNA であるが

mir-486-1/2 が大半の read を占めていることの意義を理解した上で診断ツールとして除去することが適当であるかどうかを検討する必要がある。

E. 結論

超早期肝癌診断のためエクソソーム中の miRNA を NGS にて解析し、診断アルゴリズムを作成する。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Murakami Y, Tanahashi T, Okada R, Toyoda H, Kumada T, Enomoto M, Tamori A, Kawada N, Taguchi Y-h, and Azuma T. High-throughput Analysis of miRNA Expression Profile in Hepatocellular Carcinoma using Next Generation Sequencing. PLoS One. 2014 Sep 12;9(9):e106314. doi: 10.1371/journal.pone.0106314. eCollection 2014.

2. Taguchi Y-h and Murakami Y. Universal disease biomarker: can a fixed set of blood microRNAs diagnose multiple diseases? BMC Res Notes. 2014 Aug 30;7:581. doi: 10.1186/1756-0500-7-581.

学会発表

1. 藤井英樹、豊田秀徳、村上善基. エクソソーム中のマイクロ RNA 発現解析は脂肪肝診断に有用である. 第 18 回 日本肝臓学会大会 シンポジウム 平成 26 年 10 月 23 日 神戸市
2. 村上善基 miRNAによる肝線維化の抑制 第41回日本毒性学会学術集会 シンポジウム 平成26年7月3日 神戸市

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究委託費（膵管内乳頭粘液腫瘍患者における超早期膵がん捕捉技術の開発研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

血清中のエキソソーム回収方法と回収効果の検討とmiRNAの発現パターンに関する研究

業務分担者 上田 貴子 博士研究員

研究要旨

エキソソームは、細胞から分泌される直径30 nm-150 nmの膜小胞であり、タンパク質やRNA、DNAを内包している。エキソソームは、血液中に放出され体内を循環しており、内包している分子を介して、細胞間の情報の授受を行っているといわれている。正常細胞と同様に、がん細胞からもエキソソームは分泌されており、内包されているmiRNAの種類は、がん細胞によって異なる。そのため、エキソソーム内包RNAは、がんの診断マーカー分子となるとして注目されている。

しかしながら、エキソソームの同定方法は確立されておらず、また汎用されているエキソソーム回収方法は、エキソソーム単独溶液となるものではなく、エキソソーム含有溶液である。そのため、すい臓がんのエキソソーム由来miRNAとして報告されているmiRNAの発現パターンは、論文により大きく異なる。エキソソーム内包miRNAは、診断マーカーとして非常に魅力的であるが、血清中のtotal RNAと比較し、血清中のエキソソームを回収したときのmiRNAの発現パターンが大きく変化するか、また血清中に放出されているがん細胞由来のエキソソームは、エキソソーム回収効果が反映される程に多く含まれているのかどうかということは、明らかになっていない。本研究では、いくつかのエキソソーム回収方法を用いて、それらの違いによりmiRNAの発現パターンに差異があるかどうか、エキソソーム回収効果がmiRNAの発現パターンによく反映されるのは、どの回収方法かなどを検討し、「膵管内乳頭粘液腫瘍患者における超早期膵がん捕捉技術の開発」における手法の礎となる基礎データを収集した。

A．研究目的

血清中に存在するmiRNAは、エキソソーム内胞miRNA、アルゴナートタンパク複合体miRNA、アポトーシス小胞内胞miRNA、リポプロテイン複合体miRNA等様々な形で存在している。この中の、がん細胞由来エキソソーム内胞miRNAの発現パターンを調べ、血清total RNAの発現パターンとの比較により、エキソソーム回収効果を調べる。がん特有のmiRNAの発現パターンが最もよく反映され、血液診断可能な方法を調べる。

B．研究方法：

エキソソーム回収方法とされている、(1)超遠心法、(2)サイズ排除クロマトグラフィー、(3)高分子疎水凝集効果を用いた回収法、(4)静電的相互作用を利用したカラムフィルトレーションの四つの方法を用いて、エキソソーム画分とその他の上清に分離し、それぞれの画分に存在するmiRNAの発現パターンの差異を調べた。

エキソソーム含有画分であることは、エキソソームの表面抗原のひとつであるCD63の有無や、電子顕微鏡による30 nm-150 nmの粒子の存在から確認した。

（倫理面への配慮）

血清サンプルは、記号化し個人情報が流出しないように努めた。

C．研究結果：

健常者の血清を用いて、エキソソーム内に多く存在するとされているmiRNA(let 7a, miR-142)とエキソソーム外に多く存在するとされているmiRNA(miR-16, miR-92)の発現量を比較した結果、エキソソーム画分のlet7aは、その他の上清中のlet7aと比較し、発現量はわずかに多く、また上清中のmiR-16, miR-92は、エキソソーム画分のmiR-16, miR-92の発現量よりも有意に多かった。しかしながら、l

et7a, miR-142, miR-16, miR-92の発現量順位は、エキソソーム画分と上清で同様の結果であった (miR-16 > miR-92 > let7a > miR-142)。

また、サイズ排除クロマトグラフィーにより、280 nmの波長で分離した4つのフラクションについて、上記の四種類のmiRNAの発現を調べた。四つのフラクションは、エキソソームが含まれると考えられるフラクション、含まないと考えられるフラクションすべてにおいて、miRNAの発現があり、発現量順位は先に記した通りであった。

D．考察：

エキソソーム画分とその他の画分、またクロマトグラフィーの各フラクションのmiRNAの発現量順位に変化がないということは、エキソソームは、miRNAを保護する役割を有する膜小胞であるが、そこに内包されるmiRNAは、選択された特定のものではなく、細胞内の各miRNAの存在比率が保持された状態である可能性が考えられる。がん細胞由来エキソソームの比率が大きくなれば、miRNAの発現量順位が変化することも考えられるが、著しい変化になるかは分からない。

E．結論：

がん細胞由来エキソソームが含まれるエキソソーム画分において、健常血清との差異が明確になるように、健常血清におけるmiRNAの発現パターンと発現量の正常範囲を決定する必要がある。

F．健康危険情報：

なし

G．研究発表：

なし

H．知的財産権の出願・登録状況：

なし

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)
研究報告書

エクソソーム中 miRNA を利用した早期膵癌診断マーカーの開発

分担研究者 金井 雅史

京都大学医学部附属病院 臨床腫瘍薬理学講座 特定講師

研究要旨

本研究の最終目標は血中の miRNA を利用した膵癌の早期診断であり、分担研究者は本研究の実証試験の役割を担っている。分担研究者が所属する京都大学がんセンターでは 2013 年よりバイオバンクを構築し、京都大学がんセンターで診断、治療を受ける膵癌症例より、血漿を含む生体試料を収集し、詳細な臨床データと共に保管管理している。この 1 年間で 80 症例近くの症例が集積されており、今後も増加が見込まれる。これらバンクに保管された血漿検体を用いることにより、候補 miRNA の実証試験を迅速に行うことが可能である。

A. 研究目的

難治性がんの一つである膵癌は早期診断がまだ困難であり、早期診断法の開発が切に望まれている。本研究では最小限の侵襲で得られる末梢血を利用し、エクソソーム中の miRNA を次世代シーケンスにて解析、早期膵癌診断のバイオマーカーとなりうる miRNA の探索・同定を目指す。

2013 年よりバイオバンクを構築し、同がんセンターで診断、治療を受け、バイオバンクへの協力に同意が得られた全症例より、DNA、血漿、凍結組織といった生体試料を収集し、専属の生体試料管理者が連結可能匿名化後、臨床データと共に保管管理している。さらに血漿に関しては 1 ポイントのみではなく治療開始前後で経時的に採取している。

B. 研究方法

分担研究者は大阪市立大学医学部附属病院のコホートを用いて選別された膵癌早期診断のバイオマーカー候補となる miRNA の発現について、京都大学がんセンターのコホートを用いて実証する役割を担っている。京都大学がんセンターでは

C. 結果

約 1 年で 500 近くの症例がバンクに登録された。このうち膵癌は 80 症例近くを占めており、これらの症例の DNA、血漿、血漿中遊離 DNA が現在京大がんセンターバイオバンクに保管されている。

D. 考察

本研究の実証試験を行う際には約 150 症例を超える膵癌症例の検体の利用が可能と見込まれ、実証試験の検体数としても十分と考える。

E. 結論

膵癌の早期診断のバイオマーカー候補となる miRNA の実証試験が迅速に行えるよう、今後もバンクを利用した症例登録を継続する。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Kanai M.

“Therapeutic application of curcumin for patients with pancreatic cancer” World Journal of Gastroenterology 2014 Jul 28;20(28):9384-9391. Review

2. 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.

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 Apr; 3(2):406-15.

学会発表

1. 「**京都大学病院がんセンターキャンサーバイオバンクプロジェクト**」金井雅史、他 9 名
第 12 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2014/7/17 福岡

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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(分担)

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

分担研究者: 河田則文
大阪市立大学医学研究科肝胆膵内科 教授

研究要旨:

miRNAはnon-coding RNAの一つであり、バイオマーカーとして用いることが可能である。炎症反応や線維化反応でmiRNAがコラーゲン産生を調節する。そのうち、Cyclin E1発現を制御するmiRNAとしてmiR-195を同定した。

A. 背景及び目的:

本邦での膵癌死亡者は約2万人である。癌の膵癌治療法は進歩しているが、膵癌罹患患者のほとんどが膵癌で死亡するという難治癌である。膵癌は高度な線維化を伴い、膵癌と線維化の関係が示唆される。線維化のメカニズムを解明することが膵癌早期発見と治療に役立つと考えられる。

B. 研究方法:

本研究では星細胞(HSC)/筋線維芽細胞(hMF B)のmicroRNA発現を検討した。既にHSC活性化とともに変動するmicroRNAを同定した。それらを強制発現させて、HSC/hMF Bの増殖、コラーゲンやサイトカイン産生に及ぼす影響を検討した。一方、C型肝炎では肝線維化進行群(stage3-4)はHCVの遺伝子型に関わらずIFN治療によるウイルス駆除率が不良であるが、ウイルス側因子のみでは説明できない。そこで宿主側因子を明らかにする目的で、肝組織中におけるmicroRNA発現の相違を、線維化軽度群(stage1-2)と比較検討した。

C. 結果及びD. 考察:

microRNA検出arrayにより、マウス星細胞の活性化とともに発現変動するmicroRNAを網羅的に解析した。星細胞活性化に伴い上昇する8 microRNA (miR-23b, 34c, 125b, 210, 214, 218, 221, 222)と低下する9 microRNA(miR-p2, 143, 195など)を同定した。また、miR-195にはHSC/hMF Bの増殖抑制効果があり、Cyclin Eを介することを見出した。

E. 結論:

HSC/hMF Bの機能調節にmicroRNA発現関与することが確認された。

F. 健康危険情報:

特に無し

G. 研究発表:

1.) 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.

2.) 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.

3.) Fujii H, Kawada N. Fibrogenesis in alcoholic liver disease. World J Gastroenterol. 2014 Jul 7;20(25):8048-54.

4.) Enomoto M, Morikawa H, Murakami Y, Tamori A, Kawada N. Adjuvant epoetin-β with peginterferon-α and ribavirin in Japanese ribavirin-intolerant relapsed patients with chronic hepatitis C genotype 2. Hepatol Res. 2014 Oct;44(10):E290-6.

H. 知的財産権の出願及び登録状況:
なし

膵癌および膵嚢胞性疾患患者の臨床背景と予後に関する研究

分担研究者 田守 昭博 大阪市立大学准教授

研究要旨：膵嚢胞性疾患は、膵癌の前癌病変である可能性がありそれを有する患者の取り込みは重要な課題である。一方、膵嚢胞による特異的な自覚症状はなく、健診や他疾患での画像検査において初めて膵嚢胞の存在を指摘される。今回、当院にて膵嚢胞を指摘された症例の背景を解析するとともに臨床現場における膵嚢胞疾患の対応を調査した。また膵嚢胞疾患からの膵癌への進展を前向きに解析するための臨床研究を企画し、臨床マーカー検索のためのサンプル収集とデータベース作成に着手した。

A．研究背景と目的

膵嚢胞性疾患、中でも膵管内乳頭粘液腫瘍（IPMN）は前癌病変と考えられているが、自覚症状を呈することが極めて稀である。その存在は、健診や他疾患で実施された腹部画像検査（腹部超音波検査（US）、CT、MRI）にて偶然診断されることが多い。本研究の対象である膵管内乳頭粘液腫瘍（IPMN）患者の取り込みには、膵嚢胞性疾患の拾い上げが重要である。そこで本年度は当院にて膵嚢胞性疾患の存在を指摘された患者の臨床背景を調査し、診断の契機となった病歴・併存疾患について解析した。また対象例を登録して前向きに追跡する臨床研究を企画した。さらに膵嚢胞性疾患から膵癌への進展を診断する臨床マーカー探索のため、膵癌症例、膵嚢胞性疾患例のサンプル収集とデータベース作成を開始した。

B．研究方法

本班研究を遂行するため、病院輸血部肝炎センターにサンプル収集とそれとリンクしたデータベース作成を行う分門を設置した。外来・病棟にてサンプル提供を呼びかけ同意を得た対象は、2014年6月から2015年1月までに大阪市立大学病院の通院患者の内、膵嚢胞性疾患の存在を指摘された107例である。また膵癌と診断された52例と臨床背景を比較検討した。膵嚢胞性疾患例の内訳は男性51例、女性56例であり年齢の中央値69歳（36歳—88歳）。一方、膵癌例の内訳は男性32例、女性20例であり年齢の中央値68歳（46歳—81歳）。

C．研究結果

膵嚢胞性疾患例の臨床背景は、飲酒歴あり：52（49%）、糖尿病合併：31（29%）。一方、膵癌例では飲酒歴あり：52（38%）、糖尿病合併：31（40%）。膵癌例の内、3例において既往に

膵嚢胞のため通院していた病歴を確認した。

D．考察

膵嚢胞性疾患例では、飲酒歴を有する患者が半数存在していた。飲酒が膵嚢胞の発症に関係していると考えより、飲酒が受診の契機となり、腹部画像検査にて膵嚢胞の存在が診断されたものと推測される。無症状の膵嚢胞生疾患例を取り込むことが今後の課題と考える。初年度に膵嚢胞性疾患を診断し登録できた症例について追跡を開始した。膵癌症例も含めて経時的にサンプル収集を行い、診断・予後等の詳細な臨床推移をデータベース化する計画である。

E．結論

慢性肝疾患例、胆道疾患におけるスクリーニング検査から膵嚢胞性の合併例を抽出し、膵癌への進展に関する前向き研究への登録を開始した。

G．研究発表

1. 論文発表

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.

2. 学会発表

なし

H .知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
特になし。

別紙 3

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ペー ジ	出版年

膵管内乳頭粘液性腫瘍切除に関する研究

分担研究者 平川 弘聖 大阪市立大学教授

研究要旨：浸潤型の膵管内乳頭粘液性腫瘍（IPMN）を有する患者に対する切除の妥当性を検討した。浸潤型膵管内乳頭粘液腫瘍（IPMN）の予後は、癌の浸潤距離が10mm以下と10mm以上で有意に異なった。また、10mm以上の浸潤を示す浸潤型膵管内乳頭粘液腫瘍（IPMN）予後は、膵癌の予後と有意差がなかった。膵管内乳頭粘液性腫瘍（IPMN）と粘液嚢胞性腫瘍（MCN）に関する国際診療ガイドライン（2012年）に示されている「high-risk stigmata」に属す腫瘍は手術されるべきである。

A．研究背景と目的

浸潤型の膵管内乳頭粘液腫瘍（IPMN）は通常型膵癌に比べ予後が良いとの報告があるが、浸潤距離の観点からの報告は少ない。この研究の目的は、浸潤距離の観点から浸潤型IPMNの性質を調べることである。それに加えて、膵管内乳頭粘液性腫瘍（IPMN）と粘液嚢胞性腫瘍（MCN）に関する国際診療ガイドライン（2012年）に示されている「worrisome features」と「high-risk stigmata」の妥当性についての検討もおこなった。

B．研究方法

大阪市立大学で1989年から2013年にかけて切除されたIPMN患者88例につき遡及的に検討した。それら症例を癌の浸潤距離により以下に分類した。T1a（浸潤距離 5 mm以下）、T1b（浸潤距離: 5～10 mm）、T1c and ≥ T2（浸潤距離: 10 mm以上）。また、術前に画像により、膵管内乳頭粘液性腫瘍（IPMN）と粘液嚢胞性腫瘍（MCN）に関する国際診療ガイドライン（2012年）に示されている「worrisome features」と「high-risk stigmata」の妥当性についての検討も行った。

C．研究結果

浸潤型膵管内乳頭粘液腫瘍（IPMN）の予後は、癌の浸潤距離が10mm以下と10mm以上で有意に異なった。また、10mm以上の浸潤を示す浸潤型膵管内乳頭粘液腫瘍（IPMN）予後は、膵癌の予後と有意差がなかった。5mm以上の浸潤を示す浸潤型膵管内乳頭粘液腫瘍（IPMN）は、全て膵管内乳頭粘液性腫瘍（IPMN）と粘液嚢胞性腫瘍（MCN）に関する国際診療ガイドライン（2012年）に示されている「high-risk stigmata」に属していた。

D．考察

膵管内乳頭粘液性腫瘍（IPMN）と粘液嚢胞性腫瘍（MCN）に関する国際診療ガイドライン（2012年）に示されている「high-risk stigmata」は妥当と考える。

E．結論

膵管内乳頭粘液性腫瘍（IPMN）と粘液嚢胞性腫瘍（MCN）に関する国際診療ガイドライン（2012年）に示されている「high-risk stigmata」に属す腫瘍は手術されるべきである。

G．研究発表

1. 論文発表

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.

2. 学会発表

1 主要動脈浸潤を伴う局所進行膵癌に対する化学放射線療法後の外科切除の意義
天野良亮、木村健二郎、山添定明、平田啓一郎、永原央、豊川貴弘、久保尚士、田中浩明、六車一哉、大谷博、八代正和、前田清、仲田文造、平川弘聖（OP-009 第114回日本外科学会定期学術集会）日本外科学会雑誌 115（臨時増刊号_2），328，2014-03-05）

2 Significance of Ductal Region in Anaplastic Pancreatic Cancer. K. Miura, K. Kimura, R. Amano, S. Yamazoe, G. Ohira, K. Nishio, M. Shibutani, K. Sakurai, H. Nagahara, T. Toyokawa, N. Kubo, H. Tanaka, K. Muguruma, H. Otani, M. Yashiro, K. Maeda, M. Ohira, K. Hirakawa.

APA/JPS 45th Anniversary Meeting November 5-8, 2014 Hawaii, Meeting Proceeding p29, P1-51.

3 Importance of the Invasive Distance in Invasive IPMN as a Prognostic Factor. K. Kimura, R. Amano, S. Yamazoe, K. Miura, G. Ohira, K. Nishio, M. Shibutani, K. Sakurai, H. Nagahara, T. Toyokawa, N. Kubo, H. Tanaka, K. Muguruma, H. Otani, K. Maeda, M. Ohira, K. Hirakawa.
APA/JPS 45th Anniversary Meeting November 5-8, 2014 Hawaii, Meeting Proceeding p40, P2-80

4 Persisting Elevation of Postoperative CRP Predicts Outcome of Patients with Curative Distal Pancreatectomy for Pancreatic Cancer. S. Yamazoe, R. Amano, K. Kimura, K. Hirata, K. Miura, K. Hirakawa.
APA/JPS 45th Anniversary Meeting November 5-8, 2014 Hawaii, Meeting Proceeding p47, P3-46.

H .知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)
なし。

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.