

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860242

研究課題名(和文)胆道良性および悪性疾患における分離腺管のエピジェネティクス解析

研究課題名(英文)The epigenetic analysis of benign and malignant biliary tract disease with crypt isolation technique

研究代表者

塩井 義裕 (Shioi, Yoshihiro)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：00714346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では腺管分離法を用いて胆道癌の腫瘍性腺管と非腫瘍性腺管における癌抑制遺伝子のプロモーター領域のメチル化を解析し、胆道癌において癌抑制遺伝子のメチル化がどのように関与しているかを検証した。胆管癌切除標本31例から組織サンプルを採取し、腺管分離法を用いて腫瘍腺管と非腫瘍性腺管のみを採取した。DNAを抽出し、癌関連遺伝子のプロモーター領域のメチル化をBisulfite-pyrosequencing法で解析した。胆管癌における癌関連遺伝子のメチル化の頻度と、ゲノムワイドなメチル化の程度について検索した。

研究成果の概要(英文)：We analysed the DNA methylation of its promoter region of cancer suppressor genes with cancerous glands and non-cancerous glands of bile duct cancer by crypt isolation technique. We verified the relation between the DNA methylation of cancer suppressor genes and bile duct cancer. In 31 cases of resected bile duct cancer, we picked up the fresh samples and collect cancerous glands and non-cancerous glands with crypt isolation technique. We extracted the DNA and analysed the DNA methylation of its promoter region by Bisulfite-pyrosequencing. We examined the frequencies of cancer related genes and the genome wide methylation.

研究分野：人体病理学

キーワード：胆管癌 癌抑制遺伝子 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

胆道癌(肝門部胆管癌,胆管癌,胆嚢癌,乳頭部癌)の標準治療は手術治療であるが,切除例での予後は未だ不良である.しかし,これまで胆道癌の分子生物学的機序は,種々の遺伝子異常を中心に解明されてきたが,未だ十分な解明はされていない¹⁾.

DNA のメチル化は塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現を制御する機構であるが,発癌に関与するメチル化異常では,ゲノムワイドな低メチル化と特定の癌抑制遺伝子のプロモーター領域の CpG island の高メチル化が考えられている.癌抑制遺伝子のプロモーター領域の高メチル化は,遺伝子変異や欠損に次ぐ第3の癌抑制遺伝子の不活化機構として注目されてきた.本学病理学講座でのこれまでの研究を含め,消化管癌において癌抑制遺伝子がプロモーター領域のメチル化により不活性化されていることが報告されてきたが,胆道癌についての検証は不十分である.

胆道癌の発癌の仮説として,Adenoma-carcinoma sequence による発癌(Vogelstein 仮説),胆石などを起因とする慢性炎症に伴う炎症性発癌,膵胆管合流異常に伴う膵液の暴露による化学性発癌などが考えられている.その中で癌抑制遺伝子のメチル化異常が発癌における一つの原因として考えられているが,発癌過程にどのように関連しているかは明らかにされていない²⁾.

2. 研究の目的

胆道癌の発癌過程における癌関連遺伝子のメチル化異常を明らかにする.

胆道癌,胆嚢腺腫,膵胆管合流異常,胆石症,基礎疾患のない正常胆嚢粘膜における癌抑制遺伝子のメチル化を比較して,胆道癌の発癌過程におけるメチル化の関与を検証する.胆道癌で過去にメチル化されている癌抑制遺伝子に加え,ほかの消化管癌でメチル化が指摘されている癌抑制遺伝子から絞り込み,胆道癌で癌抑制遺伝子がどのようにメチル化されているかを明らかにする.また,胆道癌については,癌部と癌周囲粘膜のメチル化の比較検討も行う.

胆道癌では周囲粘膜における発癌の素地の有無も検証する:癌部と非癌部のメチル化比較

H.Pylori 関連胃癌や潰瘍性大腸炎合併大腸癌では癌部だけでなく,非癌部(周囲粘膜)にもエピジェネティックな異常がすでに蓄積していることが報告されている³⁾.これは非癌部にも癌抑制遺伝子のメチル化異常などの発癌の素地(Field defect)が存在することを示唆している.本研究では,胆道癌の癌部と非癌部の癌抑制遺伝子のメチル化解析も合わせて行い,胆道癌の非癌部にエピジェネ

ティックな異常が蓄積されているか否かを検証する.

胆道癌のゲノムワイドなメチル化を検証する

他の消化器癌と同様に,胆道癌でも DNA メチル化は発癌に重要な役割を担っていると考えられる.近年,Kaneda ら⁴⁾が大腸癌においてゲノムワイドの DNA メチル化の程度を分類する検討を行ったが,この報告によると,メチル化による腫瘍のタイプ化は腫瘍細胞の特性を知る上で有用とされている.これを受けて胆道癌におけるゲノムワイドの DNA メチル化レベルの検討を行う.

3. 研究の方法

対象と期間

2008年6月から岩手医科大学外科学講座およびその関連病院で手術を施行した胆道癌を対象とする.胆道癌とは肝門部胆管癌,胆管癌,胆嚢癌,乳頭部癌を指し,胆道良性疾患とは,胆石症や胆嚢腺腫などの胆嚢疾患,またそのほかの疾患で胆嚢や胆管の切除を必要とした症例である.これらには膵胆管合流異常による胆嚢・胆管の予防的切除も含む.

サンプル採取と腺管分離法

腺管分離法は,組織から間質成分を除き,腫瘍性腺管および非腫瘍性腺管のみを分離する方法である⁵⁾.胆道粘膜の特徴として,生体から切除すると胆汁による自己融解を早期にきたすため,手術で摘出した直後のサンプル処理が必須である.胆道標本を切除後,新鮮胆道腫瘍片または粘膜片を採取して剃刀でそれぞれを 3mm 程度に細切し,それらを 30 mmol/l ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を含む CMF Hanks 溶液 20ml に入れ,37 °C で 50 分間加温振盪する.1,600 回転で 5 分間遠心分離し,分離腺管と間質を含んだ組織片を沈降させ,上澄みを捨てる.次に CMF Hanks 溶液を 20ml 加え,37 °C で 30 分間加温振盪後,同様に遠心分離を行い,上澄みを捨てる.70%エタノールを加えて固定し,実体顕微鏡(SZX16, Olympus, Tokyo)下に分離腺管を回収した.

サンプル作製と DNA 抽出

腺管分離法を用いて上皮成分のみを分離したのち,DNA 抽出用サンプルと,組織標本作製用サンプルに分けて回収した.前者は DNA を抽出してメチル化解析を行い,後者は分離腺管の形態解析のためパラフィン包埋して hematoxylin and eosin (HE) 染色標本作製し,間質を含まない腺管であることを確認した.

メチル化解析

凍結した新鮮標本と、腺管分離法を用いて分離した分離腺管からDNAを抽出したのち、癌関連遺伝子のプロモーター領域のメチル化を Bisulfite-pyrosequencing 法で解析した。メチル化解析を行う癌関連遺伝子は過去の胆道癌の報告例および他の消化器癌の報告例^{4,6,7)}から現時点では下記の9遺伝子(*LOX*, *MINT31*, *RUNX3*, *ELMO1*, *THBD*, *NEUROG1*, *SOCS1*, *p16*, *hMLH1*)とした。腫瘍組織のない胆嚢粘膜を基準とし、DNAメチル化率30%以上をDNAメチル化陽性とした。

DNAのメチル化状態については、KanedaらのTwo panel methodに従って、High Methylation Epigenotype (HME), Intermediate Methylation Epigenotype (IME), Low Methylation Epigenotype (LME)に分類した^{4,6)}。

4. 研究成果

1) 検体が得られた胆管癌31症例の臨床病理学的特徴を表1に示す。(胆嚢癌については現在、実験を継続して行っている。)

2) 腫瘍部分における新鮮標本と分離腺管のメチル化頻度の比較

腫瘍部分から採取した新鮮標本のDNAと、腫瘍部分から採取した分離腺管のDNAの両者が得られた症例15例について、メチル化の頻度を比較した(図1)。両者のメチル化の頻度はほぼ同等であったが、*LOX*, *ELMO1*, *NEUROG1*において腫瘍部分の新鮮サンプルより分離腺管のメチル化が1例ずつ多かったものの、有意差は見られなかった。

3) 癌部の分離腺管と癌周囲上皮の分離腺管におけるメチル化頻度の比較

癌部の分離腺管(T [CI])と癌周囲上皮の分離腺管(CBD [CI])の両方の分離腺管を採取できた25症例のDNAについて、9遺伝子のメチル化頻度を検索した(図2)。HMEを分類するマーカーでは*RUNX3*がもっとも陽性率が高く、IME, LMEを示すマーカーでは*ELMO1*と*NEUROG1*の陽性率が高かったが、癌部と非癌部のメチル化の頻度に有意差はみられなかった。

4) Two Panel 法による癌部の分離腺管と癌周囲上皮の分離腺管におけるゲノムワイドのメチル化の比較

癌部の分離腺管(T [CI])と癌周囲上皮の分離腺管(CBD [CI])の両方の分離腺管を採取できた25症例のDNAについて、Two Panel 法に基づき、ゲノムワイドのメチル化の割合を検索した(図3)。HMEの頻度は同等であったが、癌部では、IMEの頻度が高い傾向がみられた。

表1. 解析症例の臨床病理学的特徴

	Bile duct carcinoma
Number	31
Sex (M/F)	23:8
Age (Median, Range)	69 (45-86)
Location (A/Bi/Bm/Bs/Bp)	9/10/6/3/3
Size (mm)	34.9 (8-75)
Histology (pap/well/mod/muc)	8/10/12/1
In situ (-/+)	13/18
T(1/2/3/4)	2/16/12/2
N(0/1)	17/14
M(0/1)	30/1
Stage(/ / /)	13/15/1/2

図1 腫瘍部分における新鮮標本と分離腺管のメチル化頻度の比較 (N=15)

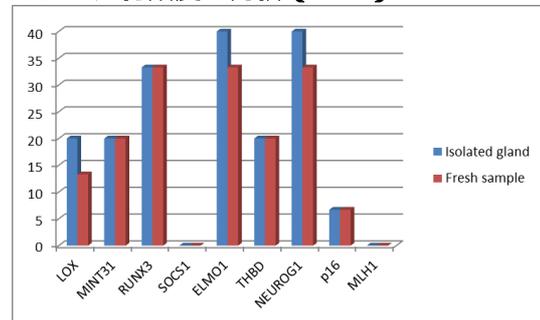


図2 分離腺管による癌部と癌周囲粘膜におけるメチル化頻度の比較 (N=25)

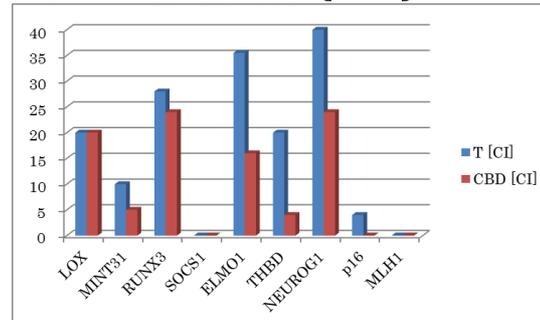


図3 Two Panel 法による癌部の分離腺管と癌周囲上皮の分離腺管におけるゲノムワイドのメチル化の比較. 25症例中の症例数を示す.(%)

	HME	IME	LME
T [CI]	3 (12)	7 (28)	15 (60)
CBD [CI]	3 (12)	3 (12)	19 (76)

まとめ

2)の結果より, 腺管分離法を利用した DNA メチル化の検索は, 新鮮サンプルを利用した検索とほぼ同等であるが, 一部のマーカーで陽性率がやや高く, 有用な可能性がある.

3)の結果より癌部の腫瘍腺管及び, 癌周囲上皮の腺管で検索したマーカーのメチル化の頻度は上昇しており, 癌部で高くなっている傾向がみられた.

4)の結果より, 癌部でよりゲノムワイドのメチル化がみられる傾向がある.

参考文献

- 1) Wistuba II, Gazdar AF. Gallbladder cancer: lessons from a rare tumour. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:695-706.
- 2) Letelier P¹, Brebi P, Tapia O, Roa JC. DNA promoter methylation as a diagnostic and therapeutic biomarker in gallbladder cancer. *Clin Epigenetics*. 2012 Jul 13;4:11.
- 3) Ushijima T, Nakajima T, Maekita T. DNA methylation as a marker for the past and future. *J Gastroenterol*. 2006 May;41:401-7.
- 4) Kaneda A, Yagi K. Two groups of DNA methylation markers to classify colorectal cancer into three epigenotypes. *Cancer Sci*. 2011;102:18-24.
- 5) Nakamura S, Goto J, Kitayama M, Kino I. Application of the crypt-isolation technique to flow-cytometric analysis of DNA content in colorectal neoplasms. *Gastroenterology*. 1994 Jan;106:100-7.
- 6) Sugimoto R, Sugai T, Habano W, Endoh M, Eizuka M, Yamamoto E, Uesugi N, Ishida K, Kawasaki T, Matsumoto T, Suzuki H. Clinicopathological and molecular alterations in early gastric cancers with the microsatellite instability-high phenotype. *Int J Cancer*. 2016;138:1689-97.
- 7) 杉本 亮, 織笠 俊輔, 松井 雄介, 肥田 圭介, 若林 剛, 菅井 有. 胃癌分離腺管および周囲粘膜における分離腸上皮化生腺管、分離非腸上皮化生腺管の分子病理学的解析. *岩手医学雑誌*. 2013;654:271-283.

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 4 件)

- 1) Shioi Y, Sasaki A, Nitta H, Umemura A, Baba S, Iwaya T, Kimura Y, Otsuka K, Koeda K, Mizuno M, Kumagai K, Kamada T, Mukaida M, Okabayashi H. Two-stage surgery to repair a dissecting abdominal aortic aneurysm in a severely obese patient: Open bifurcated graft replacement after laparoscopic sleeve gastrectomy. *Asian J Endosc Surg*. 2016;9:149-151.

- 2) Akiyama Y, Iwaya T, Shioi Y, Endo F, Ishida K, Kashiwaba M, Otsuka K, Nitta H, Koeda K, Mizuno M, Kimura Y, Sasaki A. Successfully treated advanced esophageal cancer with left axillary lymph node metastasis and synchronous right breast cancer: a case report. *Surg Case Rep*. 2015;1:94.

- 3) Akiyama Y, Iwaya T, Shioi Y, Endo F, Chiba T, Otsuka K, Nitta H, Koeda K, Mizuno M, Uesugi N, Kimura Y, Sasaki A. Effectiveness of neoadjuvant chemotherapy with cisplatin and irinotecan followed by surgery on small-cell carcinoma of the esophagus: A case report. *Int J Surg Case Rep*. 2015;17:121-5.

- 4) Akiyama Y, Iwaya T, Konosu M, Shioi Y, Endo F, Katagiri H, Nitta H, Kimura T, Otsuka K, Koeda K, Kashiwaba M, Mizuno M, Kimura Y, Sasaki A. Curative two-stage resection for synchronous triple cancers of the esophagus, colon, and liver: Report of a case. *Int J Surg Case Rep*. 2015;13:1-4.

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) 塩井義裕, 他. 食道癌に対してドセタキセル/シスプラチン/5-FU 併用化学療法後に門脈ガス血症、腸管気腫症をきたした 2 例. 第 77 回 日本臨床外科学会総会, 福岡, 2015.

- 2) 塩井義裕, 他. 腹部大動脈解離患者に手術リスク軽減のために腹腔鏡下スリーブ状胃切除術を先行して施行した 1 例. 第 27 回 日本内視鏡外科学会総会, 盛岡, 2014.

- 3) 塩井義裕, 他. 完全腹腔鏡下肝切除術と腹腔鏡補助下肝切除術における術後急性期疼痛の比較. 第 26 回 日本肝胆膵外科学会総会, 和歌山, 2014.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

塩井 義裕 (Shioi, Yoshihiro)
岩手医科大学・外科学講座・助教
研究者番号: 00714346

(2)研究分担者

菅井 有 (Sugai, Tamotsu)
岩手医科大学・病理学講座・教授
研究者番号: 20187628

(3)連携研究者

佐々木 章 (Sasaki, Akira)

岩手医科大学・外科学講座・教授

研究者番号：40275540