

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 日本医療研究開発機構研究開発委託費 革新的がん医療実用化研究事業
(英語) AMED, Practical Research for Innovative Cancer Control

研究開発課題名：(日本語) 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
(英語) Developing a diagnostic method for pancreatic cancer at the very early stage

研究開発担当者 (日本語) 大阪市立大学医学研究科 肝胆膵病態内科学 講師 萩原淳司
所属 役職 氏名：(英語) Osaka City University Medical School,
Department of Internal Medicine, Lecturer,
Atsushi Hagihara

実施期間：平成26年5月01日～平成29年3月31日

研究開発分担者 (日本語) 大阪市立大学 医学部 附属病院長 平川弘聖
所属 役職 氏名：(英語) Osaka City University Medical School,
Hospital Director,
Kousei Hirakawa

研究開発分担者 (日本語) 大阪市立大学 大学院医学研究科 肝胆膵病態内科学・教授 河田則文
所属 役職 氏名：(英語) Osaka City University Medical School,
Department of Internal Medicine, professor,
Norifumi Kawada

研究開発分担者 (日本語) 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 田守昭博
所属 役職 氏名：(英語) Osaka City University Medical School,
Department of Internal Medicine, Associate professor,
Akihiro Tamori

研究開発分担者 (日本語) 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
所属 役職 氏名 : (英 語) National Cancer Center Research Institute,
Division of Epigenomics, Laboratory Head
Satoshi Yamashita

研究開発分担者 (日本語) 京都大学 臨床腫瘍薬理学・緩和医療学講座 特定准教授 金井雅史
所属 役職 氏名 : (英 語) Kyoto University
Department of Clinical Oncology, Pharmacogenomics, and Palliative Medicine,
Associate professor,
Masashi Kanai

II. 成果の概要（総括研究報告）

（和文）

膵癌は予後不良の難治癌である。定期的に人間ドックを受診しているにも関わらず、切除不能な膵癌が見つかることがあり、早期膵癌や膵発癌する対象を正確に見つけることが急務である。このため、申請者らは、膵臓の前癌病変と言われる膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)患者を前向きに観察して来た。IPMN 患者では、膵発癌が数%/年と高頻度であり、膵癌発見率(担膵癌比率)が 0.004%と低い人間ドック受診者を対象にするよりも、費用対効果の面で優れていることがわかった。なお、IPMN 患者は、大阪市立大学単施設だけでも 2014 年 5 月から 2016 年 9 月までに 400 名以上登録され、決して稀な疾患ではない(UMIN No. 17958)。

さて、その研究で申請者らは、膵癌患者、IPMN 患者、健常者それぞれの血清 900 μ l より、細胞が細胞間情報伝達物質として放出するエクソソーム画分を濃縮し total RNA を抽出した後に miRNA マイクロアレイ(Ver 21.0)(Agilent)と次世代シーケンサー(NGS)Miseq(Illumina)より miRNA 発現解析を行った。その結果、マイクロアレイ解析では 11 種の miRNA (miR-3960, miR-4281, miR-4459, miR-4516, miR-451a, miR-6089, miR-6090, miR-6125, miR-6800, miR-7107, miR-7975)の発現情報で膵臓疾患(膵癌+IPMN)と非膵臓疾患の分別が 91.6%の正確性で行う事が出来た。また NGS ではマイクロアレイの分別の時と異なった 19 種の miRNA(let-7a, let-7f, let-7i, miR-10a, miR-10b, miR-122, miR-142, miR-146a, miR-151a, miR-16, miR-181a, miR-191, miR-22, miR-25, miR-26a, miR-30d, miR-423, miR-451a, miR-92a)の発現情報で 95.8%の正確性で膵臓疾患(膵癌+IPMN)と非膵臓疾患の分別が可能であった(Hagihara et al. ASCO 2016)。また、NGS 解析によって得られた新規 168 種の miRNA 候補使って分別を試みたところ、そのうち 10 種は、その発現量・パターンから膵癌と IPMN の分別に有用と考えられ特許申請した(特願 2016-42008)。

発癌メカニズムの一つとして、DNA メチル化により癌抑制遺伝子の RNA 発現がサイレンシングされることが挙げられる。申請者らは膵癌で 27 個、新規のメチル化異常を発見した(Hagihara et al. 2004)。同様に、miRNA 発現の一部(let-7a, MiR-16 など)は、DNA メチル化により制御されていることが示唆された。IPMN 患者において、膵発癌を認めた患者とそうでない患者の miRNA 発現パターンと DNA メチル化パターンを比較することで、膵発癌にかかわるメカニズムが究明されつつある。

（英文）

Pancreatic cancer (PC) is one of the most deadly cancers. Existing tumor markers, such as carbohydrate antigen 19-9 and carcinoembryonic antigen, have relatively poor diagnostic sensitivity and specificity. Intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) is related to pancreatic carcinogenesis and is treated as a precursor of PC. We analyzed the miRNA expression profiles of exosome-rich fractionated blood of IPMN, PC and control patients to identify biomarkers that would facilitate early diagnosis of PC. RNA from the exosome-rich fraction was extracted from PCs, IPMNs and control patients. Extracted RNA was subjected to miRNA profiling using an Agilent miRNA microarray and Illumina next-generation sequencer (NGS).

IPMN and PC patients were discriminated from controls with 91.6% and 95.8% accuracy, respectively, using the expression profiles of 11 and 19 miRNAs determined by microarray and NGS analyses, respectively. Using NGS, 168 novel miRNA candidates were identified. Six candidate miRNAs were detected in patients with PC but not in those with IPMN or controls. One candidate miRNA was detected among all patients with PC but not those with IPMN. The results of our analysis of miRNAs associated with pancreatic disease were highly reproducible. We could identify pancreatic disease with a high probability using the expression profiles of existing miRNAs and novel candidate miRNAs. Therefore, miRNA expression profiles show promise for the early diagnosis of PC at the precancerous stage. More than 400 IPMN patients are already registered from May, 2014 to September, 2016 at Osaka City University Hospital. So it's never a rare disease (UMIN No. 000017958).

Epigenetic alterations are known to be involved in pancreatic cancers by methylation of promoter CpG islands. We reported 27 CpG islands aberrantly methylated and 13 genes silenced in human pancreatic cancers (Hagihara et al. 2004). Equally, part of the miRNA expressions is suggested to be controlled by DNA methylations. The mechanism investigation will compare the miRNA expression patterns and the DNA methylation patterns in PC patients, IPMN patients and controls.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 件、国際誌 件)

1. Kimura K, Amano R, Yamazoe S, Ohira G, Nishio K, Hirakawa K, Ohira M.
The Clinical Indications for Limited Surgery of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas.
World J Surg. 2017 May;41(5):1358-1365.
2. Miura K, Kimura K, Amano R, Yamazoe S, Ohira G, Nishio K, Kametani N, Hirakawa K, Ohira M.
Analysis of the origin of anaplastic pancreatic cancer and the mechanism of its dedifferentiation.
J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2017 Mar;24(3):176-184.
3. Sato-Matsubara M, Kawada N.
New player in tumor-stromal interaction: Granulin as a novel therapeutic target for pancreatic ductal adenocarcinoma liver metastasis.
Hepatology. 2017 Jan;65(1):374-376.
4. Nishio K, Kimura K, Amano R, Yamazoe S, Ohira G, Nakata B, Hirakawa K, Ohira M.
Preoperative predictors for early recurrence of resectable pancreatic cancer.
World J Surg Oncol. 2017 Jan 10;15(1):16.

5. Takeshima H, Niwa T, Toyoda T, Wakabayashi M, Yamashita S, Ushijima T.
Degree of methylation burden is determined by the exposure period to carcinogenic factors.
Cancer Sci. 2017 Mar;108(3):316-321.
6. Ikeda M, Shimizu S, Sato T, Morimoto M, Kojima Y, Inaba Y, Hagihara A, Kudo M, Nakamori S, Kaneko S, Sugimoto R, Tahara T, Ohmura T, Yasui K, Sato K, Ishii H, Furuse J, Okusaka T.
Sorafenib plus hepatic arterial infusion chemotherapy with cisplatin versus sorafenib for advanced hepatocellular carcinoma: randomized phase II trial.
Ann Oncol. 2016 Nov;27(11):2090-2096.
7. Hirakawa T, Yashiro M, Doi Y, Kinoshita H, Morisaki T, Fukuoka T, Hasegawa T, Kimura K, Amano R, Hirakawa K.
Pancreatic Fibroblasts Stimulate the Motility of Pancreatic Cancer Cells through IGF1/IGF1R Signaling under Hypoxia.
PLoS One. 2016 Aug 3;11(8):e0159912.
8. Matsumoto Y, Itami S, Kuroda M, Yoshizato K, Kawada N, Murakami Y.
MiR-29a Assists in Preventing the Activation of Human Stellate Cells and Promotes Recovery From Liver Fibrosis in Mice.
Mol Ther. 2016 Oct;24(10):1848-1859.
9. Ito T, Tanaka S, Iwai S, Takemura S, Hagihara A, Uchida-Kobayashi S, Shinkawa H, Nishioka T, Kawada N, Kubo S.
Outcomes of laparoscopic hepatic resection versus percutaneous radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma located at the liver surface: A case-control study with propensity score matching.
Hepatol Res. 2016 May;46(6):565-74.
10. Miura K, Kimura K, Amano R, Yamazoe S, Ohira G, Murata A, Nishio K, Hasegawa T, Yashiro M, Nakata B, Ohira M, Hirakawa K.
Establishment and characterization of new cell lines of anaplastic pancreatic cancer, which is a rare malignancy: OCUP-A1 and OCUP-A2.
BMC Cancer. 2016 Apr 11;16:268.
11. Kou T, Kanai M, Yamamoto M, Xue P, Mori Y, Kudo Y, Kurita A, Uza N, Kodama Y, Asada M, Kawaguchi M, Masui T, Mizumoto M, Yazumi S, Matsumoto S, Takaori K, Morita S, Muto M, Uemoto S, Chiba T.
Prognostic model for survival based on readily available pretreatment factors in patients with advanced pancreatic cancer receiving palliative chemotherapy.
Int J Clin Oncol. 2016 Feb;21(1):118-25.
12. Matsuda Y, Ishiwata T, Yoshimura H, Yamashita S, Ushijima T, Arai T.
Systemic Administration of Small Interfering RNA Targeting Human Nestin Inhibits Pancreatic Cancer Cell Proliferation and Metastasis.
Pancreas. 2016 Jan;45(1):93-100.

13. Amano R, Kimura K, Nakata B, Yamazoe S, Motomura H, Yamamoto A, Tanaka S, Hirakawa K.
Pancreatectomy with major arterial resection after neoadjuvant chemoradiotherapy gemcitabine and S-1 and concurrent radiotherapy for locally advanced unresectable pancreatic cancer.
Surgery. 2015 Jul;158(1):191-200.
14. 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. 2015 Feb;36(2):192-201.
15. Tamori A, Kioka K, Sakaguchi H, Enomoto M, Hai H, Kawamura E, Hagihara A, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Murakami Y, Kawasaki Y, Tsuruta D, Kawada N.
Effects on anemia of drug adjustment in patients with chronic hepatitis C during telaprevir-combined therapy.
Ann Hepatol. 2015 Jan-Feb;14(1):28-35.
16. 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
17. 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.
18. 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.
19. Kanai M.
Therapeutic applications of curcumin for patients with pancreatic cancer.
World J Gastroenterol. 2014 Jul 28;20(28):9384-91.
20. 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.
Phase I study of combination chemotherapy using sorafenib and transcatheter arterial infusion with cisplatin for advanced hepatocellular carcinoma.
Cancer Sci. 2014 Mar;105(3):354-8.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Atsushi Hagihara, Yoshiki Murakami, Akihiro Tamori, Kenjiro Kimura, Ryosuke Amano, Kosei Hirakawa, Norifumi Kawada
Pancreatic cancer biomarkers among exosome-fractionated circulating miRNAs.
2016 ASCO Annual Meeting proceeding, J Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr e15671)(海外)
2. 萩原 淳司, 村上 善基, 田守 昭博, 木村 健二郎, 天野 良亮, 平川 弘聖, 河田 則文
次世代シーケンサーによる循環血中の膵癌関連 miRNA 探索(会議録)(国内)
日本消化器病学会雑誌 (0446-6586)113 巻臨増総会 Page A235(2016.03)
3. 萩原 淳司, 村上 善基, 河田 則文
循環血中の早期膵癌関連 miRNA 探索(会議録)
日本臨床腫瘍学会雑誌 Page 102(2016.07) (国内)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし

(4) 特許出願

特許出願 (日本) :

出願番号： 特願 2016-42008 号