

膵液中のSARP2遺伝子のメチル化測定による膵癌診断へのアプローチ

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/40448

膵癌診断の将来展望

膵液中の *SARP2* 遺伝子のメチル化測定による膵癌診断へのアプローチ*渡邊 弘之¹⁾・大坪 公士郎¹⁾・岡田 源作¹⁾
毛利 久継¹⁾・土山 智也¹⁾・澤 武紀雄¹⁾

要約：Secreted apoptosis-related protein 2 (*SARP2*) は、膜貫通型 frizzled protein の cysteine-rich domain (CRD) に対する相同物であり、Wnt 癌化シグナル伝達系に対して抑制的に作用し、さらに apoptosis に対して誘導的に作用するとされる。*SARP2* のプロモーター領域のメチル化による転写抑制により、ヒト癌では、Wnt シグナル系の活性化が生じ、癌化が促進されることが明らかにされている。膵液上清中の *SARP2* メチル化の検討では、MSP 法で、膵癌で 75% (24/32)、IPMN 悪性群で 82% (9/11)、良性群で 89% (8/9)、慢性膵炎で 5% (1/19)、コントロール群で 0% (0/10) であり、IPMN 以上の病変で有意に陽性率が高かった。さらに、Real-time を用いた定量的 MSP では、ある程度、癌特異性を高めることが可能であった。このように、今後、膵液や十二指腸液を用いた *SARP2* メチル化の測定は、膵腫瘍性病変のスクリーニング法として期待される。

Key words：*SARP2* メチル化異常，膵癌，IPMN，膵液

はじめに

今日、各種画像診断法の向上により、ある程度の大きさの膵癌の診断能は向上したが、依然として根治切除可能な症例は少なく、また、自己免疫性膵炎をはじめとする腫瘍形成性膵炎や嚢胞性膵疾患など良悪性の鑑別困難な症例も少なくない。これは、膵癌では、胃癌や大腸癌のように生検が容易でなく、また膵液細胞診もいまだ十分な診断感度を有していないことによるところが大きい。最近、正常膵管上皮より膵管上皮内腫瘍を経て、浸潤性膵管癌に進展する新しい病理分類 (PanIN 分類) が提唱され、遺伝子異常との対比も活発に検討されている。最近では、*K-ras* コドン 12 や *p53* 変異、欠失などの genetic な異常のみならず、各遺伝子の発現調節に関わる epigenetic な因子にも変化がみ

られることが明らかにされている。

膵管上皮由来の膵管癌は、膵液に異常が反映されやすいことより、膵液遺伝子検査は、臨床的な膵癌の早期診断法や確定診断法として期待されている。われわれも、これまで、膵液中の *K-ras* 変異、*p53* 変異、*p16* 変異、*mesothelin* mRNA などの検出による膵癌診断の有用性を報告してきた¹⁻¹¹⁾。

最近、ジョンスホプキンス大学から、microarray を用いたメチル化の検討により、*SARP2* のメチル化は膵癌細胞株で 91% (20/22)、切除膵癌組織で 95% (40/42) にみられたが、正常膵組織ではみられず、膵癌の phenotype として注目されている¹²⁾。

本稿では、膵液中 *SARP2* のメチル化測定による膵癌診断へのアプローチについて解説する。

I. メチル化異常と癌との関連

最近の発癌機構において、DNA メチル化のような epigenetic な変化の重要性が注目されている。すなわち、遺伝子変異を生じなくても、遺伝子のプロモーター領域の CpG 配列部位が高メチル化されることにより、

* Measurement of Aberrant Methylation of *SARP2* in the Pure Pancreatic Juice for the Diagnosis of Pancreatic Neoplasms

1) 金沢大学がん研究所腫瘍内科 (〒920-8641 金沢市宝町 13-1)

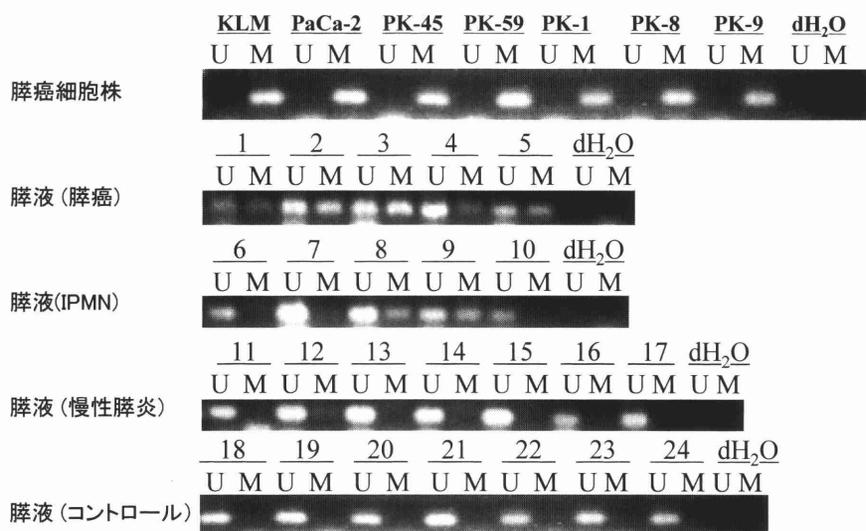


図 1 SARP2 メチル化に関する methylation-specific PCR (MSP) 法による電気泳動図 (SYBR Green I 染色)
U: 非メチル化プライマー, M: メチル化プライマー, dH₂O: 蒸留水

表 1 各種膵疾患における膵液中 SARP2 メチル化の陽性率

膵疾患	膵液	SARP2 メチル化の陽性率
膵癌	上清	75% (24/32)
	沈渣	75% (15/20)
	合計	79% (26/33)
IPMN 悪性群	上清	82% (9/11)
	合計	85% (17/20)
IPMN 良性群	上清	89% (8/9)
慢性膵炎	上清	5% (1/19)
コントロール群	上清	0% (0/10)

IPMN: intraductal papillary mucinous neoplasm
*: p<0.001

表 2 MSP 法による膵液中 SARP2 のメチル化の陽性率と膵癌の臨床病理学的因子との対比

臨床病理学的因子	膵液中 SARP2 メチル化の陽性率
腫瘍径 (TS)	
TS ₁ ≤ 2.0 cm	50% (1/2)
2.0 < TS ₂ ≤ 4.0 cm	73% (11/15)
4.0 < TS ₃ ≤ 6.0 cm	86% (12/14)
6.0 < TS ₄ ≤ 8.0 cm	100% (2/2)
占拠部位	
頭部	78% (14/18)
体部	83% (10/12)
尾部	67% (2/3)
臨床病期	
I	100% (1/1)
II	0% (0/2)
III	67% (2/3)
IV	85% (23/27)

プロモーター結合蛋白の結合が抑制されることで、遺伝子の転写が抑制され、不活化される。したがって、これに伴って癌抑制遺伝子の転写が抑制され、発癌や癌の進展が促進される。

II. SARP2 の機能・作用

Secreted apoptosis-related protein 2 (SARP2) は、膜貫通型 frizzled protein の cysteine-rich domain (CRD) に対する homologue であり、Wnt 癌化シグナル伝達系に対して抑制的に作用し、さらに apoptosis に対して誘導的に作用するとされている¹³⁾。SARP2 のプロモーター領域のメチル化による転写抑制により、ヒト癌では、Wnt シグナル系の活性化が生じ、癌化が促進されることが明らかにされている。このように、Wnt シグナル系の負の調節因子としての SARP2 の役割は、癌化の過程で重要な意味を持つ。

SARP2 遺伝子をトランスフェクトされたヒト乳癌細胞株 (MCF 7) は、細胞内 β-カテニン濃度が低下し、TNF やセラミドのような前アポトーシス刺激に対する感受性が亢進する¹³⁾。一方、メチル化による SARP2 の転写抑制は、アポトーシスに対する抵抗性を獲得し、癌細胞の増殖能を高める作用がみられる。

この SARP family は、secreted frizzle-related protein (SFRP) family と同一であることが判明し、さらに SARP2 は SFRP-1 と同一であることが確認された¹³⁾。

最近、SFRP-1 のメチル化が大腸癌¹⁴⁾や食道癌¹⁵⁾で高頻度に見られることが報告されており、さらに SFRP-1 の転写抑制が前癌性病変ともされる大腸粘膜の aberrant crypt foci¹⁶⁾や Barrett 食道¹⁵⁾でも検出

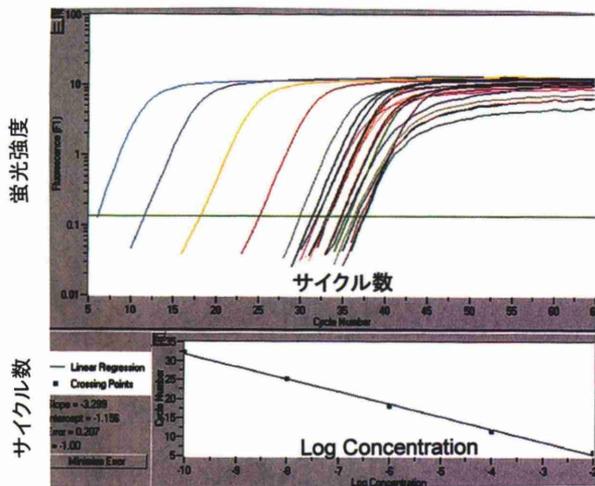


図2 SARP2 に対する定量的 real-time MSP の標準曲線 (Mia PaCa-2 希釈系列) と純膵液サンプルの蛍光曲線 (上段) ならびに検量線 (下段)

表3 定量的 real-time MSP 法を用いた膵液中 SARP2 メチル化の陽性率 (カットオフ値: 8×10^{-11})

膵疾患	定量的 real-time MSP 法による SARP2 メチル化の陽性率
膵癌	58% (19/33)
IPMN 悪性群	55% (6/11)
良性群	33% (3/9)
慢性膵炎	11% (2/19)

IPMN: intraductal papillary mucinous neoplasm

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.005$

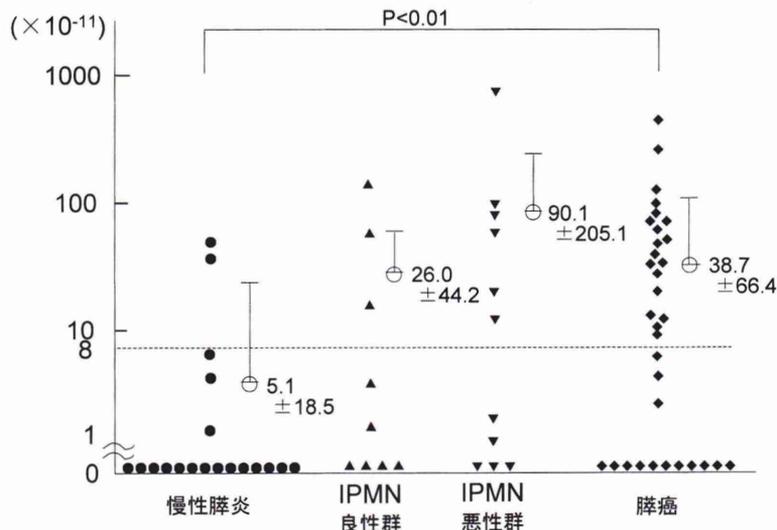


図3 各種膵疾患患者膵液中の SARP2 メチル化定量値/GAPDH 定量値の比による片対数グラフ
 平均値 ± 標準偏差 ($\times 10^{-11}$)

されている。さらに、糞便中 SFRP のメチル化の検出による大腸癌のスクリーニングに応用を試みた報告もみられる¹⁷⁾。

III. MSP 法による膵液中 SARP2 メチル化の検討

膵癌細胞株と各種膵疾患患者から十二指腸内視鏡下経乳頭的に採取した純膵液をもとに、methylation-specific PCR (MSP) 法¹⁸⁾を用いて検討した成績を示す¹⁹⁾。すなわち、膵癌細胞株や膵液上清から DNA を抽出後、sodium bisulfite 処理を行い、SARP2 のコアプロモーターを含む領域について methylated primers

と unmethylated primers の 2 組を用いて、PCR を行い、PCR バンドの有無により、メチル化の有無を判定する方法である。

図1に、MSP 法による膵癌細胞株と各種膵疾患別の膵液を用いて、SARP2 のメチル化状態を電気泳動図として示した。図1に示した膵癌細胞株では、全てメチル化されており、非メチル化の PCR 産物はみられなかった。9 種類の膵癌細胞株中 PANC-1 を除く 8 株 (89%) にメチル化がみられた。

一方、膵液を用いた検討では、メチル化されていない DNA を有する正常膵管上皮細胞の混入のため、非メチル化 PCR 産物は、必ず検出される。したがって、メチル化 DNA の PCR 産物の有無により、SARP2 の

メチル化遺伝子の有無を判定することになる。膵癌と Intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) でメチル化バンドが高率にみられたが、一方、慢性膵炎や結果的に膵疾患のみられなかったコントロール群では、メチル化バンドはほとんどみられなかった。

表1に、各種膵液中 *SARP2* 遺伝子のメチル化異常の頻度を示した。MSP法を用いた膵液の検討では、膵癌で79% (26/33)、膵管内乳頭粘液腫瘍 (IPMN) で85% (17/20) [悪性群で82% (9/11)、良性群で89% (8/9)]、慢性膵炎で5% (1/19)、コントロール群で0% (0/10)との成績が得られ、有意に膵管内乳頭粘液腫瘍以上で高頻度に見られた。なお、IPMNの悪性群は、手術組織で境界病変以上であった3例と、各種画像診断で、①主膵管径7mm以上、②嚢胞径30mm以上、③壁在結節6mm以上のいずれかを認めた8例の計11例とし、良性群は、手術組織で、腺腫あるいは過形成であった2例と、前述のいずれも満たさない7例の計9例とした。また、表2に示すように、膵液中 *SARP2* メチル化の陽性率と膵癌の腫瘍径、占拠部位、臨床病期との間には、有意な相関はみられず、膵癌の早期段階から検出された。

IV. Real-time MSP法を用いた膵液中 *SARP2* メチル化の定量的検討

LightCycler®を用いたreal-time MSP法により、*SARP2*メチル化の定量的測定を行った成績を示す¹⁹⁾。図2には、MiaPaCa-2を陽性コントロールに用いた希釈系列による標準曲線により検量線を求め、5桁以上の定量性を確認した。膵液サンプルについても、標準曲線と同様なパターンを示した。*GAPDH*についても定量値を求め、膵液上清中の *SARP2* メチル化の定量値と内部コントロールの *GAPDH* の定量値の比を片対数グラフにプロットした (図3)。平均値と標準偏差を求め、Welch's t-testを用いた検討では、膵癌と慢性膵炎の間に有意差がみられた。さらに、 8×10^{-11} をカットオフ値に設定すると、表3に示すように、膵癌で58%、IPMNの悪性群で55%、良性群で33%、慢性膵炎で11%となった。膵癌と慢性膵炎の間ならびにIPMNの悪性群と慢性膵炎の間に、有意差がみられた。

以上のように、十二指腸内視鏡下経乳頭的に採取した膵液中の *SARP2* のメチル化は、IPMNと膵癌で80%前後の高率に検出されたのに対して、慢性膵炎やコントロール群では陽性率がきわめて低率であった。さらに、Real-timeによる定量的MSPでは、*SARP2*

のメチル化は慢性膵炎に比し、膵癌やIPMNの悪性群で、有意に高率であり、癌特異性のある程度高めることが可能である。一方、ジョーンズホプキンス大学の成績では、手術中に採取した膵液の検討で、*SARP2*のメチル化は、膵癌で46% (11/24)にみられるが、慢性膵炎8例の膵液では、全例陰性であると報告されている¹²⁾。

したがって、今後、内視鏡下に採取した膵液や十二指腸液を用いて、*SARP2*のメチル化を測定することは、膵腫瘍スクリーニング法として期待されると思われる。また、一般的にメチル化は、癌化の早期段階で生じるものが多い傾向にあるが、DNA microarrayによる解析などから、より癌特異性の高いメチル化マーカーの登場も期待される。

参考文献

- 1) Watanabe H, Sawabu N, Ohta H, et al.: Identification of *K-ras* oncogene mutations in the pure pancreatic juice of patients with ductal pancreatic cancers. *Jpn J Cancer Res (Cancer Sci)* **84**: 961-965, 1993.
- 2) Watanabe H, Sawabu N, Songur Y, et al.: Detection of *K-ras* point mutations at codon 12 in pure pancreatic juice for the diagnosis of pancreatic cancer by PCR-RFLP analysis. *Pancreas* **12**: 18-24, 1996.
- 3) Watanabe H, Miyagi C, Yamaguchi Y, et al.: Detection of *K-ras* point mutations at codon 12 in pancreatic juice for the diagnosis of pancreatic cancer by hybridization protection assay: a simple method for the determination of the types of point mutations. *Jpn J Cancer Res (Cancer Sci)* **87**: 466-474, 1996.
- 4) Watanabe H, Yamaguchi Y, Ha A, et al.: Quantitative determination of *K-ras* mutations in pancreatic juice for diagnosis of pancreatic cancer using hybridization protection assay. *Pancreas* **17**: 341-347, 1998.
- 5) Watanabe H, Ha A, Hu YX, et al.: *K-ras* mutations in duodenal aspirate without secretin stimulation for screening of pancreatic and biliary tract carcinoma. *Cancer* **86**: 1441-1448, 1999.
- 6) Yamaguchi Y, Watanabe H, Songur Y, et al.: Detection of mutations of *p53* tumor suppressor gene in pancreatic juice and its clinical application to diagnosis of patients with pancreatic cancer: comparison with *K-ras* mutation. *Clin Cancer Res* **5**: 1147-1153, 1999.
- 7) Okai T, Watanabe H, Yamaguchi Y, et al.: EUS and *K-ras* analysis of pure pancreatic juice collected via a duodenoscope after secretin stimulation

- for diagnosis of pancreatic mass lesion : a prospective study. *Gastrointest Endosc* **50** : 797-803, 1990.
- 8) Ha A, Watanabe H, Yamaguchi Y, et al. : Usefulness of supernatant of pancreatic juice for genetic analysis of *K-ras* in diagnosis of pancreatic carcinoma. *Pancreas* **23** : 356-363, 2001.
 - 9) Ohtsubo K, Watanabe H, Yamaguchi Y, et al. : Abnormalities of tumor suppressor gene *p16* in pancreatic carcinoma : immunohistochemical and genetic findings compared with clinicopathological parameters. *J Gastroenterol* **38** : 663-671, 2003.
 - 10) Wang Y, Yamaguchi Y, Watanabe H, et al. : Detection of *p53* gene mutations in the supernatant of pancreatic juice and plasma from the patients with pancreatic carcinoma. *Pancreas* **28** : 13-19, 2004.
 - 11) Watanabe H, Okada G, Ohtsubo K, et al. : Expression of *mesothelin* mRNA in pure pancreatic juice from patients with pancreatic carcinoma, intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas, and chronic pancreatitis. *Pancreas* **30** : 349-354, 2005.
 - 12) Sato N, Fukushima N, Maitra A, et al. : Discovery of novel targets for aberrant methylation in pancreatic carcinoma using high-throughput microarrays. *Cancer Res* **63** : 3735-3742, 2003.
 - 13) Melkonyan HS, Chang WC, Shapiro JP, et al. : SARPs : a family of secreted apoptosis-related proteins. *Proc Natl Acad Sci* **94** : 13636-13641, 1997.
 - 14) Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, et al. : A genomic screen for gene upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nature Genet* **31** : 141-149, 2002.
 - 15) Zou H, Molina JR, Harrington JJ, et al. : Aberrant methylation of secreted frizzled-related protein genes in esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus. *Int J Cancer* **116** : 584-591, 2005.
 - 16) Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, et al. : Epigenetic inactivation of *SFRP* genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nature Genet* **36** : 417-422, 2004.
 - 17) Muller HM, Oberwalder M, Fiegl H, et al. : Methylation changes in faecal DNA : a marker for colorectal cancer screening? *Lancet* **363** : 1283-1285, 2004.
 - 18) Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al. : Methylation-specific PCR : a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* **93** : 9821-9826, 1996.
 - 19) Watanabe H, Okada G, Ohtsubo K, et al. : Aberrant methylation of *secreted apoptosis-related protein 2* (*SARP2*) in pure pancreatic juice in diagnosis of pancreatic neoplasms. *Pancreas* (in press).

* * *