

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	腫瘍制御学領域 消化器外科学研究分野 氏名 原 裕太郎
<p>(論文題目)</p> <p>Dual epigenetic changes in diabetes mellitus-associated pancreatic ductal adenocarcinoma correlate with downregulation of E-cadherin and worsened prognosis</p> <p>(2 型糖尿病は複数の異なる後天的遺伝子修飾機序により E-cadherin の発現を低下させ、浸潤性膵管癌の予後を悪化する)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>背景：浸潤性膵管癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma: PDAC) は近年世界的に増加している悪性度が高い癌腫であり、未だ 5 年生存率は 10% 以下である。特に、2 型糖尿病 (T2D) は PDAC における予後不良因子である。T2D による PDAC の予後悪化機序として、後天的遺伝子修飾の関与がある。我々は細胞接着因子である E-cadherin (E-cad) をコードする CDH プロモーターメチル化が長期 2 型糖尿病で亢進、E-cad の発現を低下し、PDAC の予後低下に関与することを報告した。しかしながら、癌の増殖・転移に関わる後天的遺伝子修飾は単一ではない。プロモーターメチル化のみではなく、機能性 RNA であるマイクロ RNA (miR) の発現変化も含まれる。T2D によりこれら後天的遺伝子修飾因子が互いにどのように関与するか未だ明らかになっていない。これらを明らかにすることにより、T2D による PDAC 予後悪化機序を明らかにし、新しい診断法、治療法の確立の可能性がある。そこで今回、PDAC の外科手術材料を用いて、臨床病理組織学的変化と CDH1 プロモーターメチル化、miR の発現変化についてどのような相関があるか検討を加えた。</p> <p>対象：当院で PDAC の根治手術を施行された 132 例を対象とした。T2D の治療歴を含めた臨床病理学的特徴を後方視的に検討した。切除標本癌中心部の免疫組織化学染色より E-cad および β-catenin の発現を評価した。E-cad は既報の分類を参考し、50% 以上の癌細胞が染色される場合を high stein group、50% 以下の癌細胞が染色される場合 low stein group として定義した。さらに、癌中心部より抽出した DNA および RNA を使用し、CDH1 プロモーターのメチル化および miR-100-5p の発現を解析した。DNA メチル化に関しては、バイサルファイト処理後に CDH1 のプロモーターをターゲットしたメチル化特異的 PCR を施行し、電気泳動法で特異的バンドの出現を確認した。miR は、内在性コントロールを RNU6B として mir-100-5p の発現量の相対定量を施行した。</p> <p>結果： T2D 患者は 65 例であり、T2D 罹患後 3 年以上経過した患者 (long DM) は 33 例であった。Body mass index は T2D 症例で有意に高値だった (23.5 vs 21.8, $p < 0.01$)。E-cad の発現低下には T2D ($p < 0.05$) および低分化癌 ($p < 0.05$) が関与していた。また、HbA1c $\geq 6.5\%$ および long DM 症例で E-cad の発現低下が起きていた ($p < 0.05$)。さらに、β-catenin の核内移行は T2D ($p < 0.05$)、HbA1c $\geq 6.5\%$ ($p < 0.05$)、long DM ($p < 0.05$) および低分化癌症例 ($p < 0.05$) で有意に高かった。CDH1 プロモーターメチル化に関しては、T2D (57% vs 43%, $p < 0.05$) および E-cad 発現低下 (61% vs 39%, $p < 0.01$) が有意な関連因子であった。long DM (70% vs 30%, $p < 0.01$) と関連があるものの、short-DM (44% vs 56%, $p = 0.69$) および HbA1c $\geq 6.5\%$ (58% vs 42%, $p = 0.10$) とは関連がなかった。miR-100-5p の発現量に関しては、T2D (6.0 vs 3.5, $p < 0.05$) と E-cad 発現低下 (6.00 vs 3.90, $p < 0.01$) が有意な関連因子であり、術前 HbA1c 値</p>	

($R=0.34$, $p<0.01$) および β -catenin index ($R=0.35$, $p<0.01$) と相関した。また、long DM と関連する傾向はあるものの (6.0 vs 3.7 , $p=0.06$)、糖尿病罹患期間と相関がなかった ($R=0.06$, $p=0.70$)。2型糖尿病症例では、低分化癌、ly2-3、および E-cad 発現低下症例の割合が、後天的遺伝子修飾の数とともに増加した。さらに、2型糖尿病症例において miR-100-5p 高値かつ CDH1 プロモーターメチル化を有する症例 (dual epigenetic change: D-epi) は、v2-3、ne2-3、リンパ節転移陽性、切除可能境界膵癌および腫瘍径 ≥ 30 mm の症例が有意に多かった。全生存期間に関しては、単変量解析において、腫瘍径 ≥ 30 mm ($p<0.05$)、リンパ節転移陽性 ($p<0.05$)、CA19-9 ≥ 200 U/ml ($p<0.01$)、術後補助化学療法なし ($p<0.01$)、HbA1c $\geq 6.5\%$ ($p<0.05$)、long DM ($p<0.05$)、miR-100-5p ≥ 4.13 ($p<0.05$)、CDH1 プロモーターメチル化 ($p<0.01$) が有意に予後を短縮させた。多変量解析において腫瘍径 ≥ 30 mm ($p<0.05$)、術後補助化学療法なし ($p<0.01$)、miR-100-5p ≥ 4.13 ($p<0.05$)、CDH1 プロモーターメチル化 ($p<0.05$) が全生存期間の独立した予後不良因子であることが明らかになった。無病生存期間期間に関しては、単変量解析において、腫瘍径 ≥ 30 mm ($p<0.05$)、リンパ節転移陽性 ($p<0.001$)、CA19-9 ≥ 200 U/ml ($p<0.01$)、術後補助化学療法なし ($p<0.001$)、HbA1c $\geq 6.5\%$ ($p<0.05$)、miR-100-5p ≥ 4.13 ($p<0.05$)、CDH1 プロモーターメチル化 ($p<0.01$) が有意に予後を短縮させた。多変量解析において、腫瘍径 ≥ 30 mm ($p<0.05$)、CA19-9 ≥ 200 U/ml ($p<0.05$)、術後補助化学療法なし ($p<0.01$)、miR-100-5p ≥ 4.13 ($p<0.05$) および CDH1 プロモーターメチル化 ($p<0.05$) が、無病生存期間期間の独立因子した予後不良因子であることが明らかになった。全生存期間の Kaplan-Meier 曲線において、後天的遺伝子修飾の数が増加するにつれて予後が悪化することが明らかになった。さらに、2型糖尿病症例のうち、HbA1c $\geq 6.5\%$ かつ long DM の症例は、全生存期間と無病生存期間期間に関して予後不良であることが明らかになった。

考察と結語：miR-100-5p 高値および CDH1 プロモーターメチル化症例はそれぞれ独立して全生存期間と無病生存期間を有意に短縮させた。T2D における PDAC の予後悪化には、CDH1 プロモーターメチル化と miR-100-5p を介した E-cad 発現制御が関与していると考えられた。また、CDH1 プロモーターメチル化には T2D の罹患期間が関与する一方で、mir-100-5p の発現上昇には高血糖が関与する可能性が示唆された。このことは、罹患期間および血糖値という T2D の異なる機序を介した後天的遺伝子修飾が PDAC の予後に影響しており、後天的遺伝子修飾を利用した新規治療法や予後を規定するバイオマーカーになり得る可能性がある。