

令和 2 年 4 月 16 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08738

研究課題名(和文) 自己免疫性膵炎からの発癌責任分子の同定と病理診断への応用

研究課題名(英文) Identification of an oncogenic gene associated with autoimmune pancreatitis and its application to pathological diagnosis

研究代表者

上原 剛 (Uehara, Takeshi)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：80402121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性膵炎(AIP)のメチル化異常についてイルミナ社のInfinium MethylationEPIC Kitを用いて全ゲノム網羅的なメチル化アレイ解析を行った。コントロール群に比べて、AIPでプロモータ領域が異常メチル化されている発癌に関与する遺伝子を複数選択し、再検証をメチル化特異的PCR法で行った。選択遺伝子のうちSKIはメチル化特異的PCR法でもメチル化異常を呈しており、AIPにおける発癌責任遺伝子である可能性が示唆された。IgG4関連胆管炎でも同様の結果を得た。網羅解析で得られた候補遺伝子の解析を臓器横断的に続ける予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IgG4関連疾患の代表的疾患は、自己免疫性膵炎(AIP)であるが、これらIgG4関連疾患がもたらす発癌リスクについては殆ど検討がされていない。慢性胃炎や炎症性腸疾患など多くの炎症性疾患は発癌と関与しており、その原因はメチル化異常が関与している。そこでAIPが、がん関連遺伝子のメチル化異常を誘発し、発癌に関与するという仮説を立て、病理学的、分子生物学的視点から検証した。AIPにもがん関連遺伝子に特異的なメチル化異常が見出され、他の炎症性疾患と同様に発癌リスクがあることを証明したことは学術的意義がある。またIgG4関連疾患患者に対して発癌リスクを啓蒙し予防していく根拠となり社会的意義もある。

研究成果の概要(英文)：Autoimmune pancreatitis (AIP) is thought to be caused by the body's immune system attacking the pancreas. Methylation abnormalities have been detected in tumor suppressor genes related to AIP. We performed whole-genome methylation profiling using the Infinium MethylationEPIC Kit (Illumina, USA). We detected multiple oncogenic genes with abnormally methylated promoter regions in patients with AIP compared with healthy controls. Selected genes were validated by methylation-specific PCR. Among them, we identified a gene encoding SKI proto-oncogene, which suggested SKI may be associated with carcinogenesis in AIP. Similar results have been reported for IgG4-related cholangitis. Comprehensive analysis of the candidate oncogenic genes will be continued across organs.

研究分野：人体病理

キーワード：メチル化特異的定量PCR法 IgG4関連疾患

## 1. 研究開始当初の背景

AIP は、自己抗体の存在や、免疫グロブリンの上昇、膵のびまん性腫大と主膵管のびまん性狭窄、リンパ球と形質細胞を主体とした著明な細胞浸潤と線維化、さらにステロイドが著効してこれらの所見が改善する特異的な慢性炎症である。比較的高齢者に多く、近年増加傾向にある。

AIP は 2001 年に信州大学医学部附属病院消化器内科の浜野らにより、血清学的に IgG4 の上昇がみられることが発見され、病因を解明するための糸口がつかめた(Hamano et al. The New England Journal of Medicine, 2001)。本研究には申請者も黎明期より参加して病理学的解析を担当している。病理組織学的解析では、膵管周囲に多数の IgG4 陽性の形質細胞の浸潤が認められる特徴がある。また後腹膜線維症、シェーグレン症候群、硬化性胆管炎や前立腺炎など多くの炎症性疾患が合併もしくは単独発生することが知られており、これらの多くは AIP と同様に多数の IgG4 陽性の形質細胞の浸潤が認められることがある。これらの共通する臨床病理学的特徴を有する疾患を IgG4 関連疾患と呼んでいる。

申請者はこれまで AIP に合併する硬化性胆管炎、前立腺炎、胃炎、リンパ節炎の病理組織学的検討(上原ら Pathol International, 2005) (上原ら Pathol International, 2008) (上原ら American journal of Surgical Pathology, 2010) (上原ら Annals of Diagnostic Pathology, 2013)を行ってきた。また、AIP に合併した硬化性胆管炎と、原発性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis ; 以下 PSC)を病理組織学的に比較検討し、AIP に合併する硬化性胆管炎には膵臓に見られるものと同様に IgG4 陽性形質細胞の浸潤などの特徴的な所見が見られ、ステロイド治療が著効することを報告した(上原ら Pathol International, 2005)。さらに AIP に合併する前立腺炎、胃炎、リンパ節炎においても AIP と同様の病態が認められ、ステロイド治療が著効するものがあると報告するなど(上原ら Pathol International, 2008) (上原ら American journal of Surgical Pathology, 2010) (上原ら Annals of Diagnostic Pathology, 2013)、AIP に関連する前立腺炎、胃炎、リンパ節炎の存在を明らかにしてきた。

一方で AIP を含む IgG4 関連疾患がもたらす発癌リスクについては殆ど検討がされていない。慢性胃炎や炎症性腸疾患など多くの炎症性疾患は発癌と関与しており、その原因はメチル化異常が関与している。申請者は発癌と AIP の関係にも早くから着目しており、AIP と膵臓癌での線維化巣の病理組織学的検討(上原ら Pathol International, 2014)や、AIP を背景とする大腸腺腫の病理組織学的検討(上原ら Pathol International, 2014)を行ってきた。これまでの病理組織学的な知見を踏まえ、分子病理学的な手法を導入して発癌の予防や治療に応用できる確実な診断方法の確立を目指した解析を行ってみたいと考えている。

近年エピゲネティックな手法を用いての病態解明は著しい進歩を遂げている。自己免疫性疾患においても例外ではなく、特に浸潤する炎症細胞に対しては、分子生物学的手法や遺伝学的手法を用いた研究が数多く行われ成果を挙げている。そこで私は病理医として強みを生かし、同様の研究手法を被障害臓器にも広げ研究を行っていきたいと考える。

## 2．研究の目的

本研究の目的は、AIP の炎症細胞浸潤が、がん抑制遺伝子の DNA のメチル化異常を誘発し、発癌に関与するという仮説を、病理学的、分子生物学的視点から検証し、発癌の予防や治療に応用することである。

## 3．研究の方法

選択症例から保存病理検体を集め、発癌原因となるようなエピゲネティック異常が生じているか網羅的メチル化アレイ解析法を行い、原因候補をさらに特定し、今までに同定してある原因候補遺伝子と合わせて、より確実な発癌危険因子の同定を目指す。再検証には定量 Methylation Specific PCR(MSP)法を用い、特定した遺伝子の mRNA 発現を解析するために高感度 RNA in situ 法である RNAscope を用いて解析を行った。

## 4．研究成果

コントロール群に比べて、AIP でプロモータ領域が異常メチル化されている発癌に関与する遺伝子を複数選択し、再検証を MSP 法で行った。選択遺伝子のうち SKI はメチル化特異的 PCR 法でもメチル化異常を呈しており、AIP における発癌責任遺伝子である可能性が示唆された。一方で mRNA 発現について RNAscope を用いて解析したが、SKI の RNA 発現はいずれも極めて微量であり、疾患による違いや部位による違いを同定できなかった。資料の採取時期が古いことや、検体保存法などに問題がある可能性がある。

臓器横断的なメカニズム解析の観点から IgG4 関連胆管炎に対して SKI の解析をを行ったところ、AIP とほぼ同様の結果を得た。IgG4 関連疾患では共通の発癌メカニズムがある可能性が指摘された。

AIP に対するメチル化アレイ解析で新たに候補遺伝子となった、TAF4 について MSP 法を行って解析した。AIP と閉塞性膵炎で異常メチル化が認められたが両者に大きな差はなく、AIP に特異的な変化ではない可能性が示唆された。

今後も網羅解析で得られた候補遺伝子の解析を臓器横断的に続ける予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kinugawa Y, Uehara T (corresponding author), Matsuda K, Kobayashi Y, Nakajima T, Hamano H, Kawa S, Higuchi K, Hosaka N, Shiozawa S, Ishigame H, Nakamura T, Maruyama Y, Nakazawa K, Nakaguro M, Sano K, Ota H	4. 巻 214
2. 論文標題 Promoter hypomethylation of SKI in autoimmune pancreatitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pathol Res Pract	6. 最初と最後の頁 492-497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.prp.2018.03.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 上原剛, 衣川康弘	4. 巻 76
2. 論文標題 【肝胆膵疾患のエピジェネティクスを学ぶ】 膵疾患のエピジェネティクス 自己免疫性膵炎における癌抑制遺伝子のメチル化	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 肝・胆・膵	6. 最初と最後の頁 933-937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kinugawa Y, Uehara T, Sano K, Matsuda K, Maruyama Y, Kobayashi Y, Nakajima T, Hamano H, Kawa S, Higuchi K, Hosaka N, Shiozawa S, Ishigame H, Ota H.	4. 巻 46
2. 論文標題 Methylation of Tumor Suppressor Genes in Autoimmune Pancreatitis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 pancreas	6. 最初と最後の頁 614-618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPA.0000000000000804	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurokawa T, Hamano H, Muraki T, Uehara T, Masuo S, Murata T	4. 巻 9
2. 論文標題 Immunoglobulin G4-related dacryoadenitis presenting as bilateral chorioretinal folds from severely enlarged lacrimal glands	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Ophthalmol Case Rep	6. 最初と最後の頁 88-92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoc.2018.01.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto H, Yasuo M, Komatsu M, Ushiki A, Hamano H, Hori A, Nakajima T, Uehara T, Fujinaga Y, Matsui S, Hanaoka M	4. 巻 120
2. 論文標題 Comparison of the chemokine profiles in the bronchoalveolar lavage fluid between IgG4-related respiratory disease and sarcoidosis: CC-chemokine ligand 1 might be involved in the pathogenesis of sarcoidosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cytokine	6. 最初と最後の頁 125-129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cyto.2019.04.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Usami Y, Ichihara K, Uehara T, Sugano M, Ishimine N, Kawasaki K, Yamauchi K, Hamano H, Honda T	4. 巻 501
2. 論文標題 Evaluation of a novel serum IgG4 assay and determination of reference interval for the Japanese population	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Chim Acta	6. 最初と最後の頁 136-141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cca.2019.10.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宇佐美 陽子, 菅野 光俊, 照内 友也, 石嶺 南生, 川崎 健治, 上原 剛, 浜野 英明, 本田 孝行
2. 発表標題 2社のIgG4測定試薬の比較
3. 学会等名 日本臨床検査自動化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宇佐美 陽子, 菅野 光俊, 照内 友也, 石嶺 南生, 川崎 健治, 上原 剛, 浜野 英明, 本田 孝行
2. 発表標題 IgG4測定試薬「N-アッセイLA IgG4ニットロー」の評価
3. 学会等名 日本臨床検査自動化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上原剛
2. 発表標題 IgG4関連疾患の診断と検査 国内初の汎用自動分析装置用試薬の開発まで
3. 学会等名 日本臨床検査自動化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本 洋, 安尾 将法, 小松 雅宙, 曾根原 圭, 市山 崇史, 立石 一成, 牛木 淳人, 漆畑 一寿, 花岡 正幸, 川上 聡, 堀 敦詞, 上原 剛, 濱野 英明, 川 茂幸, 松井 祥子
2. 発表標題 サルコイドーシスのBAL液中各種メディエーターの解析 IgG4関連吸器疾患との比較
3. 学会等名 日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤 翔平, 倉石 康弘, 芦原 典宏, 小澤 真希子, 中村 晃, 渡邊 貴之, 伊藤 哲也, 村木 崇, 上原 剛, 濱野 英明, 川 茂幸
2. 発表標題 限局型自己免疫性膵炎の膵切除を回避する為に 自験3切除例から学んだ事
3. 学会等名 日本消化器病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上原剛
2. 発表標題 IgG4関連疾患 - 自己免疫性膵炎を中心に -
3. 学会等名 日本消化器病学会甲信越支部例会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林 翔太, 玉田 恒, 佐藤 碧, 神宮 邦彦, 大月 聡明, 草間 由紀子, 上原 剛, 太田 浩良, 山田 光則, 本田 孝行
2. 発表標題 多発脳神経麻痺を呈したIgG4関連肥厚性硬膜炎の1剖検例
3. 学会等名 日本病理学会 第63回秋期特別総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Usami Y. Uehara T
2. 発表標題 Difference in IgG4-RD cut-off values between three reagents
3. 学会等名 American Pancreatic Association (APA) Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上原剛
2. 発表標題 IgG4関連疾患の診断と検査 - 汎用自動分析装置用試薬開発への挑戦 -
3. 学会等名 「免疫血清研修会 免疫セミナーin代々木」第26回免疫血清検査合同研修会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上原剛
2. 発表標題 IgG4関連疾患とIgG4汎用機測定試薬の開発
3. 学会等名 2019年度日臨技 首都圏支部・関甲信支部 医学検査学会(第56回)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	増本 純也  (Masumoto Junya)  (20334914)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授    (16301)	