

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18390368

研究課題名（和文） 高速マイクロダイセクションによる膵癌遺伝子診断とナノテクノロジーによる治療予測

研究課題名（英文） Gene expressions in microdissected target cells as the diagnostic markers of pancreatic cancer and the prediction of treatment outcome using nano-technology

研究代表者

水元 一博（KAZUHIRO MIZUMOTO）

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：90253418

研究成果の概要：

我々は、高速マイクロダイセクションを利用して膵切除組織より採取した標的細胞や膵液サンプルを用いて膵癌関連遺伝子の発現解析を行い、膵癌早期診断において有用な遺伝子を複数同定した。また、膵液を含めた細胞診サンプルにも高速マイクロダイセクションを導入し、標的細胞における h-TERT mRNA 定量解析を行い、これまでに報告したテロメラーゼ活性測定法や膵液検体を用いた解析よりも更に高感度な癌精密診断法を確立した。電気化学テロメラーゼ解析を用いて膵液サンプル中のテロメラーゼ活性を測定するために卓上型の機器開発を行い、従来の TRAP 法以上の感度・特異度でテロメラーゼ活性を検出することが可能になった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2007 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2008 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：膵臓外科学

1. 研究開始当初の背景

他の消化器癌などにおける飛躍的な治療法の改善とは対照的に、膵癌は欧米や日本でもここ30年以上ほとんど生存率の改善が見られない取り残された癌腫である。早期診断の難しさや早期の遠隔転移・播種、高い治療抵抗性などがその主因と考えられる。難治癌である膵癌の治療成績向上のためには、早期診断法の確立と、治療効果予測に基づく的確な個別化治療が重要である。近年、マイクロアレイにより膵癌の網羅的遺伝子解析が急速に進展し、数百個に及ぶ膵癌関連遺伝子が同定され、診断と治療の標的分子として注目されている。

2. 研究の目的

本研究の第1の目的は、この膵癌関連候補遺伝子群の中から高速マイクロダイセクションを利用して臨床診断に応用できる遺伝子群を選別し、膵液微量RNA解析による膵癌診断法を確立することである。さらに、新たな電気化学チップによって高感度・簡便・迅速・安価な膵癌診断機器開発の基盤研究を進める。

診断標的分子の探索は同時に、遺伝子の機能解析と発現抑制研究により分子標的治療への道を拓く。本研究の第2の目的は、選択された治療標的分子を対象とし、ナノテクノロジーに基づく新しい独自の光学的手法を用いて、短時間に膵癌治療効果を予測でき個別治療を可能とする機器開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 膵癌組織マイクロダイセクションサンプルにおける mRNA 定量解析。

- A) 候補遺伝子の選択及び高感度 primer の作成。
- B) 培養細胞、癌切除バルク組織を用いた mRNA 相対定量解析。
- C) マイクロダイセクションサンプルにおける mRNA 相対定量解析。

(2) 膵液中の膵癌標的遺伝子の mRNA 定量解析。
膵液サンプルより total RNA を抽出してその quality を評価し、組織解析の結果、有効と考えられた標的遺伝子群の mRNA の解析を行う。

(3) 膵液細胞診マイクロダイセクションサンプルの mRNA 定量解析。

膵液細胞診サンプルからマイクロダイセクションで選択的に標的細胞のみを抽出し、膵液を同様に標的遺伝子の mRNA 定量解析を行う。

(4) ホルマリン固定パラフィン包埋サンプルからの mRNA 定量解析。

ホルマリン固定サンプルを用いて、mRNA 定量解析を実施し、臨床情報との関連検索によって膵癌治療効果に関連する遺伝子の分析を行う。

(5) siRNA による機能解析。

分子標的治療のターゲットとなりうるものを選択するために、siRNA による抑制実験を行い、膵癌治療に有効な遺伝子の機能評価を行う。

(6) 電気化学的テロメラーゼ活性検出。

電気化学テロメラーゼ解析を用いて膵液サンプル中のテロメラーゼ活性を測定する。

4. 研究成果

(1) Muc family を対象として mRNA 定量解析を行った結果、Muc 1 と Muc5AC は膵発癌過程において段階的に発現増強があり、膵液を用いた解析によって膵癌診断の一助となることが判明した(Ohuchida et al., Int J Cancer, 2006)。MUC2 は一部の膵癌、あるいは膵癌の前癌病変の一部である IPMN の特定のサブタイプにおいて発現増強していることがわかった。

(2) h-TERT の mRNA 定量解析を行ったところ、膵癌と IPMN、膵炎との鑑別に有用であった(Ohuchida et al., Clin Cancer Res, 2006)。

(3) S100 family 蛋白を対象として mRNA 定量解析を行った結果、S100P や S100A11 は膵発癌の早期マーカーとして有用であることが判明した(Ohuchida et al., Clin Cancer Res, 2006、Ohuchida et al., Clin Cancer Res., 2006)。また、S100A2 は膵発癌の晩期マーカーとして有用であること(Ohuchida et al., J Pathol, 2007)、S100A6 が膵発癌において段階的に発現が増強すること(Ohuchida et al., Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006)も報告した。

(4) 胎児関連遺伝子である Twist の膵癌における解析を行い、報告した(Ohuchida et al., Int J Cancer, 2007)。

(5) 転写因子である LM04 の膵発癌過程における段階的発現増強を発見し報告した(Yu et al., Mol Cancer, 2008)。

(6) 膵液を含めた細胞診検体から高速マイクロダイセクション法により採取した標的細胞における h-TERT mRNA 定量解析を行い、これまでに報告したテロメラーゼ活性測定法や膵液検体を用いた解析よりも更に高感度な癌精密診断法を確立し報告した(Fujita et al., Cancer Sci, 2008)。

(7) 約 140 症例の膵切除組織ホルマリン固定パラフィン包埋サンプルから RNA を抽出し、過去の報告をもとに膵癌の予後因子となる遺伝子群の発現を網羅的に qRT-PCR で解析した。新たな膵癌切除後の予後因子や抗癌剤治療感受性に関わるいくつかの興味深い分子を同定した。

(8) 電気化学テロメラーゼ解析を用いて膵液サンプル中のテロメラーゼ活性を測定するために卓上型の機器開発を行い、電気化学チップの改良を加え、さらなる高感度を実現した定量装置を開発した。これにより、現在の TRAP 法以上の感度・特異度でテロメラーゼ活性を検出することが可能になった。

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 11 件)

1. Ohuchida K et al., Quantitative analysis of MUC1 and MUC5AC mRNA in pancreatic juice for preoperative diagnosis of pancreatic cancer, Int J Cancer, 118, 405-411, 2006

2. Ohuchida K et al., Quantitative Analysis of Human Telomerase Reverse Transcriptase in Pancreatic Cancer, Clin Cancer Res, 12(7), 2066-2069, 2006

3. Ohuchida K et al., S100P Is an Early Developmental Marker of Pancreatic Carcinogenesis, Clin Cancer Res, 12(18), 5411-5416, 2006

4. Ohuchida K et al., S100A11, A Putative Tumor Suppressor Gene, Is Overexpressed in Pancreatic Carcinogenesis, Clin Cancer Res, 12(18), 5417-5422, 2006

5. Ohuchida K et al., Sonic hedgehog is an early developmental marker of intraductal papillary mucinous neoplasms: clinical implications of mRNA levels in pancreatic juice, J Pathol, 210, 42-48, 2006

6. Ohuchida K et al., S100A6 is increased in a stepwise manner during pancreatic carcinogenesis: Clinical values of expression analysis in 98 pancreatic juice samples, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 16(4), 649-654, 2007

7. Ohuchida K et al., Over-expression of S100A2 in pancreatic cancer correlates with progression and poor prognosis, J Pathol, 213, 275-282, 2007

8. Ohuchida K et al., Twist, a novel oncogene, is upregulated in pancreatic cancer: Clinical implication of Twist expression in pancreatic juice, Int J Cancer, 120, 1634-1640, 2007

9. Yu J et al., LIM only 4 is overexpressed in late stage pancreas cancer, Mol Cancer, 7, 2008

10. Fujita H et al., Quantitative analysis of hTERT mRNA levels in cells microdissected from cytological specimens, Cancer Sci, 99, 2244-2251, 2008

11. 大内田研宙ら、膵液中腫瘍マーカーと膵疾患、胆と膵、29、751-756、2008

[学会発表](計 1 件)

1. Fujita H, Quantitative analysis of hTERT mRNA levels in cells microdissected from cytological specimens, Joint meeting of European Pancreatic Club and The International Association of Pancreatology, 27, June, 2008, Kodz, Poland

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水元 一博 (KAZUHIRO MIZUMOTO)
九州大学・大学病院・准教授
研究者番号：90253418

(2) 研究分担者

永井 英司 (EISHI NAGAI)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：30264021

竹中 繁織 (SHIGEORI TAKENAKA)
九州工業大学・工学部・教授
研究者番号：60188208

小名 俊博 (TOSHIHIRO ONA)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：10346835

当間 宏樹 (HIROKI TOMA)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：80437780

大内田 研宙 (KENOKI OHUCHIDA)
九州大学・大学院医学研究院・特任助教
研究者番号：20452708

(3) 連携研究者

なし