

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18590322

研究課題名（和文） 膵管癌の早期診断法開発を目指した前駆病変の病理学的検討

研究課題名（英文） Pathological analysis of precursor of pancreatic cancer to detect the disease at an early stage.

研究代表者

福嶋 敬宜 (FUKUSHIMA NORIYOSHI)

東京大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40384937

研究成果の概要：

膵管癌の分子診断法の確立のために、その前駆病変とされている異型上皮病変（膵上皮内腫瘍性病変、膵管内腫瘍）について、膵管癌との関連を明らかにすべく解析を行ってきた。その結果、膵管内腫瘍はその発育・進展過程で非浸潤癌の段階でも腫瘍周囲の環境変化（間質の筋線維芽細胞におけるペリオスチンの発現）が始まっていることを明らかにした。これにより早期癌へのアプローチは癌細胞だけでなく、周囲組織（主に間質細胞）にもあり得ることを示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	600,000	3,800,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：腫瘍，病理学，膵癌，前駆病変

1. 研究開始当初の背景

膵管癌のほとんどは進行癌の段階で発見されるため、その非浸潤癌を含む早期癌の実態には不明の点が多い。膵癌と診断された患者の5年生存率は4-5%未満であり、根治はほぼ絶望的である。このような膵管癌の状況を打破するためには早期診断・治療の実現が必須であり、その基盤的研究として膵管癌

の発育進展過程を解明していく必要が有る。

現在、膵管癌の前駆病変と考えられている病変には、膵上皮内腫瘍性病変（PanIN）、膵管内乳頭粘液性腫瘍（IPMN）、腺房細胞の膵管上皮化生などがあるが、これらはいずれも顕微鏡レベルの病変であり、解析のためには、まずその組織学的同定が重要となる。そこで、我々は、ターゲットとするタンパクや mRNA

を病変を標本上で標識して同定する免疫組織化学や *in situ* ハイブリダイゼーション法を重視して解析を行うこととした。

2. 研究の目的

膵管癌の分子診断法の確立を目指して、その前駆病変 (PanINs, IPMN) について組織形態を基盤として、それらの発育進展過程での分子の変化を解析し、膵管癌との関連を明らかにすることを目的とした。また、膵管癌と胆管との類似性を考え、対象を膵のみでなく、胆管癌にも広げ、病理学的検討を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 膵管癌、膵IPMN、慢性膵炎などを含む膵切除病理組織標本(n=81)を見直し、膵上皮内腫瘍性病変、膵管内乳頭粘液性腫瘍などの同定・確認を行った。組織異型度ごとのIPMNの内訳は、腺腫(n=9)、非浸潤癌(n=17)、微小浸潤癌(n=5)、浸潤癌(n=4)。患者の臨床情報や病理学的所見をリスト化し、関連の有無などを検討した。免疫組織化学は、自動免疫染色装置(ベンタナメディカル)を用いて、各標本間の染色のムラなどが最小限となるようにした。使用抗体は、抗ペリオスチン(1:1000; Biovendor, Heidelberg, Germany)、抗 α -SMA (1A4, 1:50, DakoCytomation, Glostrup, Denmark)、抗laminin-5 2 chain (D4B5, 1:200, Chemicon, MA, USA)、抗MUC1 (Ma695, 1:100, Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK)、抗MUC2 (Ccp58, 1:200, Novocastra)、抗MUC5AC (CLH2, 1:100, Novocastra) and 抗MUC6 (CLH5, 1:100, Novocastra)。ペリオスチンにおいては、免疫組織化学的検討を補完する目的で *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いた遺伝子発現局在の検討も行った。アンチセンス

およびセンスcRNAプローブは、DIG Labeling MIX (Roche, Indianapolis, IN)を用いて、ヒトペリオスチンcDNAのEcoR I - Xba I 断片の *in vitro* トランスクリプションによって製作した。

(2) 肝外胆管にも PanIN や膵 IPMN と類似した病変が見られる。胆管と膵管とは発生上近似性が高く、PanIN や IPMN との比較検討が膵癌早期病変の解明に繋がる可能性があると考え解析を行った。まず胆管内に乳頭状病変を確認し得た 34 例の胆管腫瘍を対象とし、臨床病理学的に検討した。次に、通常の肝外胆管癌も含め、肝門または肝外胆管腫瘍の診断で手術切除された 105 例について検討した。

4. 研究成果

(1) IPMN と膵管癌において、その周囲間質におけるペリオスチンの発現と分布を見た。ペリオスチンは、膵星細胞での高発現が確認された分泌タンパクで、膵の線維化および腫瘍の発育進展に関与していると考えられている。

まず、免疫組織化学染色において、全ての膵管癌 (n=35)の腫瘍間質に陽性像が見られることを確認した(図 1A,B)。さらに、*in situ* ハイブリダイゼーション法でも膵管癌の腫瘍間質の紡錘状細胞(myofibroblasts と考えられる)にペリオスチンの発現を確認することができた(図 1C,D)。この発現は、比較的腫瘍周辺に局在性があり、腫瘍巣から離れた間質では認められないか、非常に弱いことから、膵癌細胞との強い関連(膵癌細胞によって、それを取り巻く間質細胞のペリオスチン発現が誘導される)が示唆された。

そこで、次に、膵癌の前駆病変の一つである膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)について、その組織異型度(腺腫、非浸潤癌、浸潤癌を伴う IPMN)ごとに、膵管周囲間質のペリオス

チン陽性所見の有無を観察した。その結果、良性病変(腺腫)の段階では陽性像はほとんど見られないが、腫瘍異型度が上昇するに従い腫瘍部膵管周囲に高頻度にペリオスチン陽性象が出現することが分かった(p=0.014)(図2)。そして、このペリオスチン陽性頻度は、腫瘍上皮が腸型亜型で有意に高く(p=0.036)、また腫瘍細胞における laminin 5 2 鎖発現の頻度と高い相関を示す(p<0.001)ことを見出した。Laminin 5 2 鎖は基底膜の成分であり、また癌細胞の浸潤や上皮間葉移行などとも密接に関与していることが知られている。ペリオスチンと laminin 5 2 鎖の直接的な相互作用については不明であるが、laminin 5 2 鎖はインテグリン 3 1, 6 1, 6 4 との相互作用を通して上記機能を示し、一方 4 インテグリン複合体は膵癌細胞においてペリオスチンの細胞表面レセプターとして働いていることが分かっている。

以上、ペリオスチンは浸潤癌の間質のみならず非浸潤癌の IPMN でもその周囲に陽性所見が観察されたことから、前癌病変の段階でも腫瘍周囲の環境変化が始まっている可能性が示唆された。このことから、浸潤癌へ発育進展していく可能性のある病変を、まだ浸潤がない時期に捉えられる可能性が出てきたといえる。この環境変化は膵管系腫瘍の発育進展に関与している可能性があり、現在は、膵癌の他の前駆病変(acinar-to-ductal metaplasia)やその周囲環境の変化に関わるその他の因子についてもさらに解析を進めている。

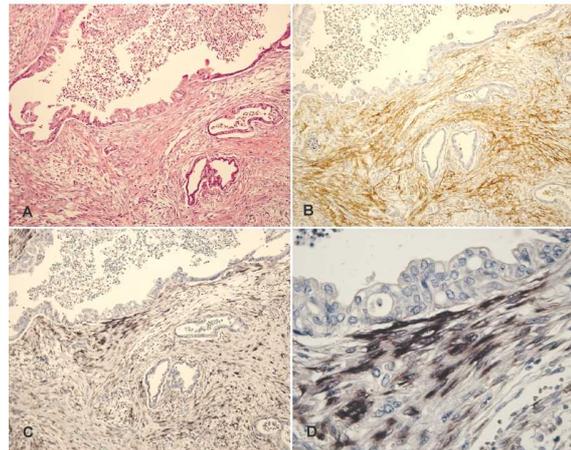


図1 A.ヘマトキシリン - エオジン染色, B:ペリオスチン(免疫組織化学), C・D:ペリオスチン(in situ ハイブリダイゼーション)

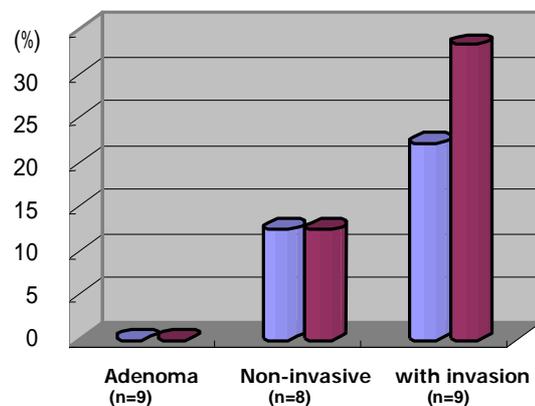


図2 IPMN 異型度ごとのラミニン 5 2 鎖(水色)とペリオスチン(エジン色)の陽性率

(2) 胆管にも、上記の膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)と類似した病変が見られることが知られるようになってきたため、それらについて検討を行った。まず、乳頭状病変を確認し得た 34 例について臨床病理学的に解析した。その結果、組織異型度は、全例悪性症例であった。肝内胆管に主座をおく症例は、肝外胆管の症例に比べ粘液産生を示すものが多く、浸潤性性格は弱く、また腸型形質を示すものが少ない傾向にあることを明らかにした。これらの詳細な検討を通して、oncocytic feature を示す腫瘍を一つの組織亜型として提唱した。次に通常の胆管癌も含め、肝門または肝外胆管腫瘍の診断で手術切除された 105 例について検討してみると、「乳頭型」

(n=20)の肉眼型を示すものは非乳頭型に比べて、高分化型腺癌(82.4%)、早期癌(35.3%)、n(-)(88.2%)の頻度が有意に高く、リンパ管侵襲、静脈侵襲、傍神経浸潤などの陽性率も低い傾向にあった。また免疫組織化学ではMUC2陽性率(35.3%)が有意に高かった。しかし一方で、腺腫例はなく、MUC1(+)症例も多く、胆膵上皮型が多いなど、類縁と考えられている膵管内腫瘍の特徴とは異なる点も明らかとなった。

以上のように、胆膵の腫瘍は類似した点がある一方でそれぞれ独特の特徴がある。これらを比較しつつ検討することで膵癌の発育進展の特徴をより明らかになっていくと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計23件)

- 1) Tanaka M, Fukushima N (他4名): Intraductal oncocytic papillary neoplasm of the bile duct: clinicopathologic and immunohistochemical characteristics of 6 cases. *Human Pathol (in press)* 査読(有)
- 2) Hirano K, Fukushima N (他14名): Diagnostic utility of biopsy specimens for autoimmune pancreatitis. *J Gastroenterol (in press)* 査読(有)
- 3) Ishizawa T, Fukushima N (他9名): Fluorescent imaging technique using indocyanine green for identification of primary and secondary liver cancers. *Cancer (in press)* 査読(有)
- 4) 福嶋敬宜, 田中麻理子, 野田直宏: 胆管内乳頭状腫瘍の病理学的特徴. *肝胆膵* 58, 2009 (*in press*) 査読(無)
- 5) Fukushima N (他4名): Periostin deposition in the stroma of invasive and intraductal neoplasms of the pancreas. *Modern Pathol*, 21(8):1044 - 1053, 2008 査読(有)
- 6) 福嶋敬宜: 膵・胆道粘液産生性腫瘍の疾患概念と変遷. *病理と臨床* 27,6,2009 (*in press*) 査読(無)
- 7) 福嶋敬宜, 能登原憲司: Lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis (LPSP) と idiopathic duct-centric chronic pancreatitis (IDCP) からみた自己免疫性膵炎. *肝胆膵* 56: 247-252, 2008 査読(無)
- 8) 福嶋敬宜: 膵癌の病理学(最近の知見). *Pharma Medica* 26(1): 13-16, 2008 査読(無)
- 9) 福嶋敬宜: 膵臓 in 外科病理学マニュアル(病理と臨床 臨時増刊号) 第26巻, 179-184, 2008 査読(無)
- 10) 福嶋敬宜: 膵臓の生検標本の読み方. *G. I. Research* 16: 170-176, 2008 査読(無)
- 11) 福嶋敬宜: 膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMNs), 膵上皮内腫瘍性病変(PanINs)および浸潤性膵管癌(IDC)の組織発生. *外科* 70(5): 476-482, 2008 査読(無)
- 12) Hruban RH, Fukushima N: Cystic lesions of the pancreas. *Diagnostic Histo-pathology* 14(6), 260-265, 2008 査読(有)
- 13) Abe T, Fukushima N, (他8名): Genome-wide allelotypes of familial pancreatic adenocarcinomas and familial and sporadic intraductal papillary mucinous neoplasms. *Clin Cancer Res* 13(20): 6019-6025, 2007 査読(有)
- 14) Hibi Y, Fukushima N, (他6名): Pancreatic juice cytology and subclassification of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Pancreas* 34(2): 197-204, 2007 査読(有)

- 15) Itoi T, Sofuni A, Fukushima N, (他6名): Ribonucleotide reductase subunit M2 mRNA expression in pretreatment biopsies obtained from unresectable pancreatic carcinomas. *J Gastroenterol*. 42(5):389-394, 2007 査読(有)
- 16) Shi C, Fukushima N, (他8名): Sensitive and quantitative detection of KRAS2 gene mutations in pancreatic duct juice differentiates patients with pancreatic cancer from chronic pancreatitis, potential for early detection. *Cancer Biol Ther*. 2;7(3), 2007 査読(有)
- 17) Hashimoto T, (他7名, 6番目): Ume (Japanese Apricot) -Induced Small Bowel Obstruction with Chronic Radiation Enteritis. *Case Rep Gastroenterol* 1:184-189, 2007 査読(有)
- 18) Hruban RH, Fukushima N.: Pancreatic adenocarcinoma update on the surgical pathology of ductal origin and PanINs. *Mod Pathol* 20,S61-70, 2007 査読(有)
- 19) Fukushima N, Fukayama M: Mucinous cystic neoplasms of the pancreas: pathology and molecular genetics. *JHBPS* 14(3):238-42, 2007 査読(有)
- 20) 福嶋敬宜: 病理学の立場からみた IPMN の発生した膵の変化 通常型膵管癌の発生母地といえるか. *消化器画像* 9:329-334, 2007 査読(無)
- 21) 福嶋敬宜: 胆、膵(内分泌含む) 病理と臨床 第25巻, 81-88, 2007 査読(無)
- 22) 福嶋敬宜: 病理診断迅速化の必要性. 病理技術 第70巻1号 28-32 2007 査読(有)
- 23) 福嶋敬宜, 柴原純二: 粘液産生胆管腫瘍の疾患群としての考え方と方向性. *胆と膵* 27: 437-442, 2006 査読(無)
- [学会発表](計14件)
- 1) Fukushima N: Update on pathology of pancreatobiliary carcinoma-tumor-stromal interaction. *The 14th Aichi International Cancer Symposium*, 名古屋, 2009年1月31日
- 2) Hirano K, et al.: Diagnostic utility of biopsy specimens for autoimmune pancreatitis. *American Gastroenterology Annual Meeting, Digestive Disease Week, USA*, 2008年5月18日
- 3) Tanaka M, et al.: Adenoendocrine cell carcinoma of the common bile duct. *Showa Pathology Seminar for Pancreatobiliary Disease 2008*, Tokyo, 2008年12月6日
- 4) 福嶋敬宜: 膵腫瘍における間質浸潤・腫瘍間質の特徴: 臨床病理学および網羅的遺伝子発現解析からのアプローチ. 第54回日本病理学会秋期特別総会, 松山, 2008年11月22日
- 5) 福嶋敬宜: 膵上皮内腫瘍性病変(PanIN) 分類と膵管癌の発生. 第97回日本病理学会総会, 金沢, 2008年5月16日
- 6) 福嶋敬宜: 膵癌とその前駆病変 - 病理学的視点から -. 第14回北九州がんセミナー, 小倉, 2008年11月23日
- 7) 福嶋敬宜, 他: 浸潤性膵管癌および膵管内腫瘍の間質組織におけるペリオスチンの発現. 第97回日本病理学会総会, 金沢, 2008年5月16日
- 8) 松田つばさ, 他: 膵液細胞診の精度向上に関する研究: 有用な所見の抽出と疑陽性例の再評価. 第47回日本臨床細胞学会秋期大会, 東京, 2008年11月14日
- 9) 野田直宏, 他: 肝門部・肝外胆管腫瘍78例の臨床病理学的検討 乳頭型腫瘍の特徴と位置付け. 第97回日本病理学会総会, 金沢, 2008年5月16日

- 10) 高橋道郎, 他: 肝内結石症術後に発症した, 粘液産生胆管内乳頭状腫瘍の1切除例. 第94回日本消化器病学会総会, 福岡, 2008年5月9日
- 11) 田中麻理子, 他: Oncocytic な形態を示した胆管内乳頭状腫瘍の3例. 第97回日本病理学会総会, 金沢, 2008年5月16日
- 12) Tanaka M, et al: A serous neoplasm of the pancreas showing unusual radiological and pathological features. *Showa Pathology Seminar for Pancreatobiliary Disease 2007*, Tokyo, 2007年10月13日
- 13) 福嶋敬宜: 膵管内腫瘍の病理 update. 第21回腹部放射線研究会, 宮崎, 2007年6月2日
- 14) 野田直宏, 他: “胆管内乳頭(粘液性)腫瘍”の臨床病理学的検討. 第96回日本病理学会総会. 大阪, 2007年3月14日

〔図書〕(計7件)

- 1) Hruban RH, Fukushima N, Wilentz RE: Pancreas. In *Modern Surgical Pathology*, W B Saunders, 2009 (*in press*)
- 2) 福嶋敬宜: 画像診断のための病理学. In 大友邦, 木村理(編): 見て診て学ぶ膵腫瘍の画像診断, 2009, 総391(pp165-176)
- 3) Hruban RH, Brune K, Fukushima N, Maitra A: Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. In Lowy AM et al.(Ed.): *Pancreatic Cancer*. Springer Science + Business Media, 2008
- 4) Hruban RH, Maitra A, Fukushima N: Pathology of pancreatic cancer. In Beger HG, Matsuno S, Cameron JL(Ed.): *Disease of the Pancreas: Current Surgical Therapy*, Springer, 2008, 総950(pp497-512)
- 5) 福嶋敬宜: 肝胆膵腫瘍病理学 In 深山正

久(編): *がんプロフェッショナル養成講座「腫瘍病理学」*, 東京, 文光堂, 2008, 総406(pp132-156)

- 6) Hruban RH, Wilentz RE, Fukushima N, Goggins M.: Pancreas. In *Cancer Handbook (Ed.2)*, John Wiley & Sons. 2007
- 7) 福嶋敬宜: PanIN 分類と膵癌の発生. In *消化器病 Annual Report 2006 中外医学社*, 2006, 353(pp47-53)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福嶋 敬宜 (FUKUSHIMA NORIYOSHI)
 東京大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号: 40384937

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし