

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ~ 2009

課題番号：20790966

研究課題名 (和文) 遺伝子発現プロファイリング解析を応用した新規膵癌治療戦略

研究課題名 (英文) Identification of molecular markers associated with lymph node metastasis in pancreatic cancer

研究代表者

廣野 誠子 (HIRONO SEIKO)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号：60468288

研究成果の概要 (和文)：膵癌は予後不良な癌腫の1つであり、唯一の根治治療は外科的切除のみである。外科的切除をした膵癌患者の予後を最も規定する因子がリンパ節転移であることから、本研究では凍結膵癌切除標本を用いて、膵癌細胞のみをマイクロダイセクションし、そのRNAを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。そのマイクロアレイデータをリンパ節転移あり群となし群で比較し、リンパ節転移特異的な遺伝子群の同定を行った。その結果、膵癌においてリンパ節転移サンプルで高発現を認めたのが29遺伝子、低発現を認めたのが17遺伝子であった。これらの遺伝子群を免疫染色解析によるタンパク発現解析を行った結果、リンパ節転移あり群で高発現を認めたのはMUC17、LI-cadherin、XKであった。また低発現を認めたのはAP2 α であった。さらに多変量解析においても、膵癌リンパ節転移に関与していたのは、MUC17高発現とAP2 α 低発現であった。

研究成果の概要 (英文)：Lymph node metastasis (LNM) is the most important prognostic factor in patients undergoing surgical resection of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). In this study, we aimed to identify molecular markers associated with LNM in PDAC using genome-wide expression profiling. In this study, laser microdissection and genome-wide transcriptional profiling were used to identify genes that were differentially expressed between PDAC cells with and without LNM obtained from 20 patients with PDAC. Immunohistochemical staining was used to confirm the clinical significance of these markers in an additional validation set of 43 patients. In the results, microarray profiling identified 46 genes that were differently expressed between PDAC with and without LNM with certain significance. Four of these biomarkers were validated by immunohistochemical staining for association with LNM in PDAC in an additional validation set of patients. In 63 patients with PDAC, significant LNM predictors in PDAC elucidated from multivariate analysis were low expression of AP2 α ($P = 0.012$) and high expression of MUC17 ($P = 0.0192$). We demonstrate that AP2 α and MUC17 may serve as potential prognostic molecular markers for LNM in patients with PDAC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

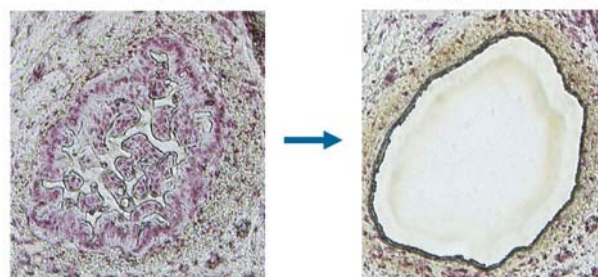
・消化器外科学

キーワード：リンパ節転移 遺伝子

膵癌のマイクロダイセクション

マイクロダイセクション前

マイクロダイセクション後



1. 研究開始当初の背景

膵癌は最も予後不良な癌腫である。膵癌の唯一の根治治療は外科的切除のみであるが、外科的切除を受けた膵癌患者の5年生存率は20%にもおよばない。外科的切除術を受けた膵癌患者の予後を最も規定する因子が、リンパ節転移の有無であることは多く報告されている。したがって、リンパ節転移に関する遺伝子は予後予測マーカーになるのみならず、膵癌治療における分子標的になりうることを示唆する。

本研究では、より正確な膵癌細胞のキャラクターを反映させるべく、マイクロダイセクションにより選択的に膵癌細胞のみを回収し、膵癌リンパ節転移陽性群と陰性群の網羅的遺伝子発現プロファイルと比較することで、膵癌のリンパ節転移特異的な遺伝子群を同定することを目的とした。

2. 研究の目的

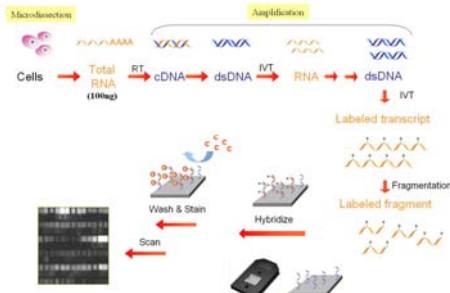
外科的切除を受けた膵癌患者の最も予後を規定する因子であるリンパ節転移の関連する遺伝子群を同定し、膵癌切除患者の予後予測因子の同定のみならず、膵癌患者の新規治療の開発を本研究の目的とする。

3. 研究の方法

和歌山県立医科大学第2外科で切除した膵癌切除標本の一部を Tissue-Tek O.C.T. compound で包埋した後、液体窒素にて凍結し、-145°C 冷凍庫に保存しておく。凍結包埋した組織を 9 μm に薄切し、ヘマトキシリン

そのRNAをRNeasyMicro Kit (QIAGEN) で抽出する。尚発現プロファイリングは精密で高度な技術が必要なため、質のよいRNAのみを用いる必要があるため、抽出したRNAは全て、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) にてRNAの質をチェックし、RNAの質の指標であるRINが5.0以上のRNAのみを使用した。抽出したRNAのうち100ngを用い、RNAマイクロアッセイ (Affymetrix) を行った。逆転写酵素とpoly-Tプライマーを用いてcDNA合成を行い、T7RNAプライマーを用いてcDNA合成を行い、T7RNAポリメラーゼを用いて、2サイクル増幅させ、In vitro transcription を行った後、biotin にてラベル化した。15 μg 分のcRNAを35~200ntになるように断片化し、GeneChip Human U133 plus 2.0 array (Affymetrix) に注入し、17時間 hybridization を行った。Fluidics Station (Affymetrix) にて wash and stain を行い、Fluorometric scanner にてスキャンした (図)。

GeneChip Human Genome U133 plus 2.0 array実験方法

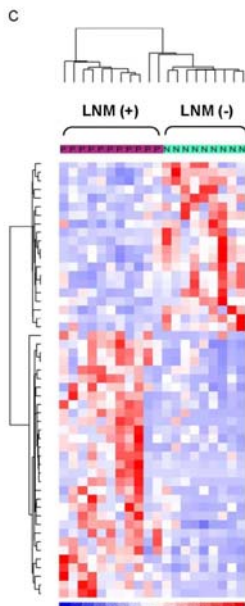


スキャンされたシグナル強度は GeneChip Operating Software (GCOS)により解析し、さらに高度な解析を行うため、GCOS によるシグナル強度を DNA Chip software を用いて Normalization し、その絶対値をリンパ節転移陽性群 11 例と陰性群 9 例で比較した。

網羅的遺伝子発現解析により同定した遺伝子群の validation を行うべく、免疫染色解析を行った。

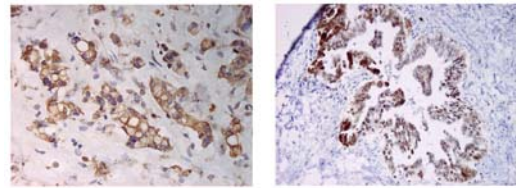
4. 研究成果

膵癌凍結サンプル 20 例（リンパ節転移陽性群 11 例と陰性群 9 例）を用いて、網羅的遺伝子発現解析を行った。リンパ節転移陽性群と陰性群のマイクロアレイデータを比較した結果 (fold change 1.5 倍以上、平均強度差 100 以上、 $P < 0.05$)、リンパ節転移陽性群で高発現を認めた遺伝子群は 29 個、低発現を認めた遺伝子群は 17 個であった。これら 46 遺伝子群を用いて hierarchical clustering を行った結果、リンパ節転移陽性群と陰性群に分かれた (図)。



これらの遺伝子群の validation を行うべく、免疫染色解析を行った。免疫染色を行った遺伝子群は、利用可能な抗体をもつ 9 遺伝子で、*DOK7*, *AP2α*, *FOXL1*, *LI-cadherin*, *Granzyme A*, *MUC17*, *C4BPB*, *XK*, *LSD* であった。まず網羅的遺伝子群に用いた 20 サンプルに対して、これらの遺伝子群の免疫染色解析を行った。その結果全て遺伝子群で、網羅的遺伝子解析と同様、リンパ節転移陽性群と陰性群で差をみとめた。さらに網羅的遺伝子解析に用いなかった 40 例を用いてこれらの遺伝子群の免疫染色を行った。その結果、

免疫染色を用いた蛋白発現解析例



膜蛋白 核蛋白

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 1 件)

① Hirono S, Yamaue H, Hoshikawa Y, Ina S, Tani M, Kawai M, Ushijima M, Matsuura M, Saiki Y, Saiura A, Yamamoto J, Miki Y, Noda T. Molecular markers associated with lymph node metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma by genome-wide expression profiling. *Cancer Sci* 101:259-66, 2010. 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

① 廣野誠子: 網羅的遺伝子発現解析を用いた膵癌リンパ節転移予測マーカーの同定; *AP2α*・*MUC17*.

第 40 回日本膵臓学会, 東京, 2009.7.30.

② 廣野誠子: *AP2α*・*MUC17* は膵癌リンパ節転移予測マーカーである.

第 21 回日本バイオセラピー学会, 東京, 2008. 11. 18

③廣野誠子：網羅的遺伝子発現プロファイリングによる膵癌リンパ節転移予測因子の同定.

第 46 回日本癌治療学会，名古屋，
2008.11.1.

④廣野誠子：網羅的遺伝子発現解析と免疫染色によるタンパク発現解析から同定した膵癌リンパ節転移予測マーカー. 第 17 回日本がん転移学会，鹿児島，2008. 7. 24.

⑤廣野誠子：網羅的遺伝子発現解析を用いた膵癌リンパ節転移予測マーカーの同定. 第 20 回肝胆膵外科学会，山形，2008.5.30.

⑥廣野誠子：包括的遺伝子発現解析による膵癌リンパ節転移予測マーカーの同定. 第 108 回日本外科学会，長崎，2008.5.15.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣野 誠子 (HIRONO SEIKO)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号：60468288

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：