

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07812

研究課題名(和文) 膵癌等を標的とする革新的消化器系新規腫瘍マーカー・ラミニン 2とその機能解析

研究課題名(英文) Biological activity and potential role of laminin-gamma2 as a novel biomarker for pancreatic ductal carcinoma

研究代表者

安田 宏 (Yasuda, Hiroshi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：80262129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラミニンは基底膜を構成する蛋白質のひとつであり、 α 、 β 、 γ の3つのポリペプチド鎖から構成される三量体糖蛋白である。ラミニン332の構成成分であるラミニン γ 2(以下Ln- γ 2)単鎖は、様々な消化器癌の先進部分で特異的に発現する。膵癌・胆道癌診断におけるLn- γ 2のバイオマーカーとしての有用性を検討した。術前に胆汁採取が可能であった外科治療が施行された14例の胆道癌でLn- γ 2のIHC、血清Ln- γ 2ELISA測定、胆汁中のLn- γ 2のWB解析を施行した。それぞれIHC(38%)、ELISA(43%)、WB(64%)でLn- γ 2陽性であり、膵胆道癌のバイオマーカーとして有用な可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治癌である膵胆道癌の罹患率は特に高齢者で増加しており、2018年の死亡数は5万人であり新たなスクリーニング法の確立が急務である。ラミニン332の構成成分であるラミニン γ 2(Ln- γ 2)単鎖は、様々な消化器癌の先進部分で特異的に発現することが報告されており、本研究は膵胆道癌の早期発見の一助となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Laminin (Ln)-332 consists of α 3, β 3, and γ 2 chains, which mediates epithelial cell adhesion to the basement membrane. Ln- γ 2, a component of Ln-332, is frequently expressed as a monomer in the invasion front of several types of gastrointestinal cancers without simultaneous expression of Ln- α 3 and/or Ln- β 3 chains. Monomeric Ln- γ 2 induces tumor cell proliferation and migration in vitro. We investigated the usefulness of Ln- γ 2 as a biomarker in diagnosing pancreatic cancer and biliary tract cancer. IHC of Ln- γ 2, serum Ln- γ 2 ELISA measurement, and WB analysis of Ln- γ 2 in bile were performed in 14 surgically treated biliary tract cancer cases in which endoscopically bile collection was performed before surgery. IHC (38%), ELISA (43%), and WB (64%) were positive for Ln- γ 2, respectively, and may be useful as biomarkers for pancreatobiliary tract neoplasia.

研究分野：腫瘍マーカー

キーワード：膵癌 胆道癌 バイオマーカー ラミニン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

難治癌である膵胆道癌の罹患率は特に高齢者で増加しており、2018年の死亡数は約5万人であり新たなスクリーニング法の確立が急務である。ラミニン 332 の構成成分であるラミニン 2 (Ln- 2) 単鎖は、様々な消化器癌の先進部分で特異的に発現することが報告されている。研究代表者らはこれまで血清 Ln- 2 単鎖が肝細胞癌の新しい腫瘍マーカーとして有用であることを明らかにした。その際に消化器系悪性腫瘍を対象とした予備的検討で Ln- 2 は膵癌組織に高頻度で豊富に発現しており、血清中 Ln- 2 は膵癌患者の約 70% で陽性を認めており、膵胆道悪性腫瘍の新規バイオマーカーとなる可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

(1) ラミニン 332 (Ln-332) は の三鎖の三量体より成る基底膜構成因子である。その構成分子である Ln- 2 単鎖 (モノマー) には腫瘍増殖・遊走作用があり、様々な消化器系腫瘍の先進部分で特異的に発現することが報告されている。本研究では膵胆道悪性腫瘍における Ln- 2 単鎖の発現を検討し、新規腫瘍マーカーとしての可能性を検証する。

(2) 癌関連線維芽細胞 (CAF) は癌微小環境の重要な構成要素の 1 つである。上皮細胞を物理的に保持するだけでなく、腫瘍形成を促進あるいは抑制するものなど不均一な細胞群であり、癌細胞の重要な機能調節因子である。Tuveson らは膵癌組織には腫瘍近傍には SMA 高発現を特徴とする腫瘍抑制性の筋線維芽細胞様 CAF (my-CAF)、癌細胞より離れた領域には IL-1 や IL-6、LIF などの炎症性サイトカインやケモカインの高発現を特徴とする、腫瘍増殖や転移に影響する炎症性 CAF (i-CAF) のサブタイプの存在を報告している (Cancer Discov 2019, 9, 282)。癌微小環境の重要構成因子である星細胞-CAF 系における Ln- 2 の *in vitro* での作用を検討する。

3. 研究の方法

(1) 診断および治療目的に内視鏡的経鼻胆道ドレナージチューブが留置された胆道癌 14 例、胆嚢癌 2 例および良性胆道疾患 (急性胆嚢炎) 2 例より各々胆汁を回収し、ヒト Ln- 2 に対するモノクローナル抗体 (D4B5) を検出抗体として用いて非還元条件下のウエスタンブロットによる解析を行った。また、定量 ELISA 法により胆道癌 14 症例における血清中の Ln- 2 の定量を行った。さらに、外科的切除を行った 8 例の切除標本を用いて Ln- 2 単鎖の免疫組織化学染色を行った。

(2) ラット初代培養膵星細胞 (PSC) を用いて反応系を構築した。Ln- 2 発現 LAMC2 アデノウイルスを作成してその作用を検討した。

4. 研究成果

(1) 正常肝には Ln- 2 の発現は認められない。切除胆管癌組織において免疫組織化学的に Ln- 2 の発現を検討した。陽性コントロールを膵癌切除組織とした (図 1 左)。8 例中 3 例に腫瘍細胞の細胞質に発現を認めた。Ln- 3 の発現は認めず、Ln-332 ではなく Ln- 2 単鎖の発現と考えられた (図 1 右)。

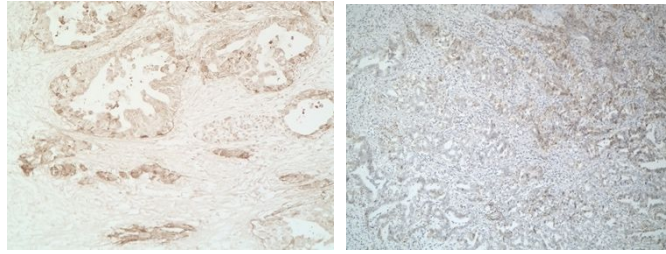


図1. 膵癌（左）、胆管癌（右）切除組織でのLn- 2免疫組織化学

胆道癌14症例における血清Ln- 2mの中央値は969.9pg/mLであり，胆道癌症例と非癌症例とを区別するLn- 2mのカットオフ値を1095pg/mLとすると胆道癌6症例（42.9%）で陽性であった。採取胆汁のウエスタンブロットによる解析では，胆道癌9症例（64.3%）でLn- 2mが検出された。良性疾患症例では2例ともにLn- 2mは検出されなかった。以上の結果から、Ln- 2単鎖は胆道癌診断の新規バイオマーカーとなる可能性が示唆された。

(2)ラット初代培養膵星細胞をディッシュ上で培養すると α -平滑筋アクチン（SMA）を発現する筋線維芽細胞（my-CAF）様に活性化する（図2左）。単離後ディッシュ上で7日間培養したラット初代培養膵星細胞をマトリゲル内で三次元培養すると、 α -SMA発現は著明に低下し、脂肪滴を細胞質に有する静止期細胞に変換した。

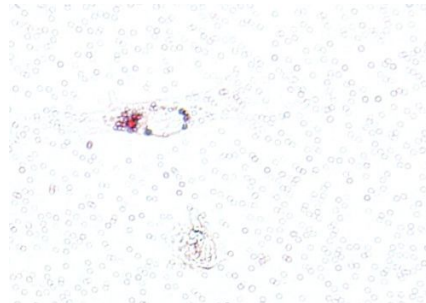
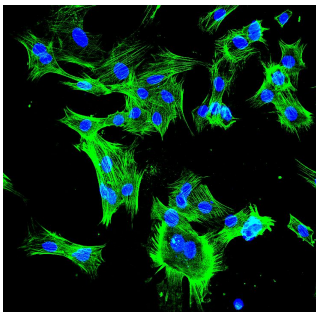


図2 左 α -SMA高発現PSC 右 マトリゲル内再培養PSC 脂肪染色

培養ディッシュ上の二次元培養では α -SMA が高発現のラット初代培養星細胞（my-CAF）をマトリゲル内で張力が無い状態で培養すると、 α -SMA は低発現で oil-red 陽性脂肪滴を含む静止期星細胞（q-PSC）に変換し、更に IL-1 を添加すると IL-1 や IL-6 を高発現する IL-1^{high}/ α -SMA^{low} の i-CAF に変換する系を確立した。LAMC2 発現アデノウイルスを星細胞に感染されると、細胞質および培養上清に Ln- 2 単鎖の発現が認められた。本系で q-PSC の i-CAF への変換因子の解析が *in vitro* で可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Fujimoto Ai, Saito Yutaka, Abe Seiichiro, Hoteya Syu, Nomura Kosuke, Yasuda Hiroshi, Matsuo Yasumasa, Uraoka Toshio, Kuribayashi Shiko, Tsuji Yosuke, Ohki Daisuke, Maehata Tadateru, Kato Motohiko, Yahagi Naohisa	4. 巻 34
2. 論文標題 Clinical usefulness of red dichromatic imaging in hemostatic treatment during endoscopic submucosal dissection: First report from a multicenter, open label, randomized controlled trial	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Digestive Endoscopy	6. 最初と最後の頁 379 ~ 390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/den.14191	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Satta Yosuke, Shigefuku Ryuta, Watanabe Tsunamasa, Mizukami Takuro, Tsuda Takashi, Suzuki Tatsuya, Ehira Takuya, Hattori Nobuhiro, Kiyokawa Hirofumi, Nakahara Kazunari, Ikeda Hiroki, Matsunaga Kotaro, Takahashi Hideaki, Matsumoto Nobuyuki, Okuse Chiaki, Suzuki Michihiro, Sunakawa Yu, Yasuda Hiroshi, Itoh Fumio	4. 巻 5
2. 論文標題 Prediction of esophagogastric varices associated with oxaliplatin administration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JGH Open	6. 最初と最後の頁 1289 ~ 1297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jgh3.12668	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sato Yoshinori, Yasuda Hiroshi, Nakamoto Yusuke, Kiyokawa Hirofumi, Yamashita Masaki, Matsuo Yasumasa, Maehata Tadateru, Yamamoto Hiroyuki, Mimura Hideo, Itoh Fumio	4. 巻 5
2. 論文標題 Risk factors of interventional radiology/surgery for colonic diverticular bleeding	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JGH Open	6. 最初と最後の頁 343 ~ 349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jgh3.12499	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Satta Yusuke, Yamashita Masaki, Matsuo Yasumasa, Kiyokawa Hirofumi, Sato Yoshinori, Takemura Hiromu, Kunishima Hiroyuki, Yasuda Hiroshi, Itoh Fumio	4. 巻 59
2. 論文標題 Non-tuberculous Mycobacterial Pseudo-outbreak of an Intestinal Culture Specimen Caused by a Water Tap in an Endoscopy Unit	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 2811 ~ 2815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.5188-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato Yoshinori, Yasuda Hiroshi, Nakamoto Yusuke, Kiyokawa Hirofumi, Yamashita Masaki, Matsuo Yasumasa, Maehata Tadateru, Yamamoto Hiroyuki, Mimura Hidefumi, Itoh Fumio	4. 巻 5
2. 論文標題 Risk factors of interventional radiology/surgery for colonic diverticular bleeding	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JGH Open	6. 最初と最後の頁 343 ~ 349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jgh3.12499	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato Yoshinori, Satta Yusuke, Yasuda Hiroshi, Kiyokawa Hirofumi, Yamashita Masaki, Matsuo Yasumasa, Itoh Fumio	4. 巻 13
2. 論文標題 Intra-abdominal bleeding as a rare complication after colonic endoscopic mucosal resection in a patient taking direct oral anticoagulants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 794 ~ 798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-020-01181-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato Yoshinori, Ozawa Shun-ichiro, Yasuda Hiroshi, Kato Masaki, Kiyokawa Hirofumi, Yamashita Masaki, Matsuo Yasumasa, Yamamoto Hiroyuki, Itoh Fumio	4. 巻 35
2. 論文標題 Tip-in endoscopic mucosal resection for large colorectal sessile polyps	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgical Endoscopy	6. 最初と最後の頁 1820 ~ 1826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00464-020-07581-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 清川博史, 安田 宏, 佐藤義典, 前畑忠輝, 伊東文生.
2. 発表標題 当院における食道PDT後の狭窄予防対策の工夫
3. 学会等名 第112回日本消化器内視鏡学会関東支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安田 宏、清川博史、近江亮介、伊東文生
2. 発表標題 治療効果予測マーカーの可能性を持つ肝細胞癌新規腫瘍マーカー・ラミニン関連分子
3. 学会等名 第71回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 安田宏（分担）、坂井建雄・河原克雅、総編集	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 904
3. 書名 カラー図解 人体の正常構造と機能 全10巻縮刷版	

1. 著者名 泉井 亮、妹尾 春樹、金田 研司、池田 一雄、安田 宏、眞嶋 浩聡、大野 秀樹	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 84
3. 書名 カラー図解 人体の正常構造と機能 第4巻 肝・胆・膵	

1. 著者名 安田宏（分担）、日本分子腫瘍マーカー研究会編	4. 発行年 2021年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 252
3. 書名 分子腫瘍マーカー診療ガイドライン 第2版	

1. 著者名 安田宏、坂井健雄、河原克雄、他	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 904
3. 書名 人体の正常構造と機能	

〔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	山本 博幸 (Yamamoto Hiroyuki) (40332910)	聖マリアンナ医科大学・医学研究科・教授 (32713)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------