

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：10101  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22591511  
 研究課題名（和文）プロテオミクス解析データと TMA 解析による胆道癌特異的早期発見マーカーの同定  
 研究課題名（英文）Identification of the marker for cholangiocarcinoma based on the data by proteomics and tissue microarray.  
 研究代表者  
 平野 聡 (HIRANO SATOSHI)  
 北海道大学・大学院医学研究科・教授  
 研究者番号：50322813

研究成果の概要（和文）：胆管癌症例から切除された腫瘍組織のプロテオミクス解析より、正常組織よりも癌組織で過剰発現する遺伝子産物 38 種のうち、特に発現量の変化が大きいもの 4 因子（actinin-1、actinin-4、DJ-1、cathepsin B）について、癌細胞株 19 株を用いて発現状況をウエスタンブロット法でスクリーニングし、低発現株と過剰発現株を同定した。Tissue microarray を用いて胆管癌症例 96 例の免疫染色を施行した。DJ-1 の過剰発現は発現低下症例に比して予後良好な傾向が見られた（ $p=0.0604$ ）。

研究成果の概要（英文）：We analyzed resected specimens by the proteomics approach and detected 4 unique proteins (actinin-1, actinin-4, DJ-1, cathepsin B) out of 38 higher gene expression products compared with normal bile duct tissue. Next, we evaluated the expression level of these 4 proteins by Western blotting method among 19 bile duct carcinoma cell lines and characterized them into low expression cell lines and high expression cell lines. We Finally, we performed immunohistochemical analysis utilizing tissue micro array of the consecutive 96 resected specimens of bile duct carcinoma. Among 4 proteins, high expression of DJ-1 could be a marker to suggest good prognosis ( $p=0.0604$ ).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：胆道癌、tissue micro array、プロテオミクス

### 1. 研究開始当初の背景

胆管癌に特有の進展形式である表層進展は、胆管内腔を長軸方向に、浸潤を伴わずに進展する病態であるが、その進展範囲を正確に診断することは非常に難しい。胆管癌の根治手術は難易度が高く合併症の多い術式で大量肝切除や膵切除を同時に施行することもあり、表層進展を含めた進展範囲の診断精度を向上することは非常に重要である。当科では、胆管癌手術の **high volume center** である利点を生かし、これまでに、胆管癌表層進展の存在、診断および、腫瘍生物学的特徴や意義について、臨床的に検討し報告してきた。本研究では、術前胆道生検検体や切除標本などの臨床材料を用いて、胆管癌表層進展細胞の特徴をこれまでにない分子生物学的な視点から解析し、術前診断精度の向上や、切除断端の陰性化に臨床応用することを最終的な目的とする。

### 2. 研究の目的

胆管癌に特有の進展形式である表層進展は、胆管内腔を長軸方向に、浸潤を伴わずに進展する病態であるが、その進展範囲を正確に診断することは非常に難しい。胆管癌の根治手術は難易度が高く合併症の多い術式で大量肝切除や膵切除を同時に施行することもあり、表層進展を含めた進展範囲の診断精度を向上することは非常に重要である。当科では、胆管癌手術の **high volume center** である利点を生かし、これまでに、胆管癌表層進展の存在、診断および、腫瘍生物学的特徴や意義について、臨床的に検討し報告してきた。本研究では、術前胆道生検検体や切除標本などの臨床材料を用いて、胆管癌表層進展細胞の特徴をこれまでにない分子生物学的な視点から解析し、術前診断精度の向上や、切除断端の陰性化に臨床応用することを最終的な目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) プロテオミクス解析により胆道癌特異的なマーカー候補を探索する。

(2) 胆道癌細胞株を用いて候補遺伝子のマーカー特性を確認する

(3) 当科で切除した胆道癌切片を用いて Tissue micro array を作成し、候補遺伝子のマーカー特性とを確認する

(4) さらにマーカー遺伝子の発現と臨床病理因子の相関関係を解析する。

### 4. 研究成果

胆管癌症例から切除された腫瘍組織のプロテオミクス解析より、正常組織よりも癌組織で過剰発現する遺伝子産物 38 種のうち、特に発現量の変化が大きいもの 4 因子 (actinin-1, actinin-4, DJ-1, cathepsin B)

について、癌細胞株 19 株を用いて発現状況をウェスタンブロット法でスクリーニングし、低発現株と過剰発現株を同定した。これらを SCID マウスに移植して得られた腫瘍組織を外科的に切除してパラフィン切片を作製して、それぞれの抗原に特異的なモノクローナル抗体を用いて免疫染色を施行し、ウェスタンブロットでのタンパク発現データと整合性のある染色条件を探し出した。一方で、北海道大学病院第二外科で切除された胆管癌症例 96 例のパラフィン切片から、腫瘍部分 4 箇所と正常部分 2 か所を打ち抜いて Tissue Microarray (TMA) パラフィンブロックを作製し、これを材料に TMA 切片を作製した。1 枚の TMA 切片には約 50 症例分の組織片が搭載されているため、2 枚の TMA 切片の処理で全ての症例を同時に染色することが可能となった。先に作製した SCID マウス移植腫瘍の切片のうち、過剰発現株を陽性対照、低発現株を陰性対照とし、更にアイソタイプ IgG を一次抗体として処理した陰性対照を用い、胆管癌症例の免疫染色を施行した。4 つの因子のうち、actinin-4 と DJ-1 は正常細胞ではほとんど染色が見られなかったのに対し、癌細胞の細胞質で要請となる症例が有意に多く (それぞれ  $p < 0.0001$ ,  $p = 0.0009$ )、特異度はそれぞれ 93.9% と 87.9% であったことから胆管上皮における非癌細胞と癌細胞を鑑別する有力なマーカーとなる可能性が示唆された。さらに、癌細胞における actinin-4 の過剰発現は症例の生存率には相関しなかったが、DJ-1 の過剰発現は発現低下症例に比して予後良好な傾向が見られた ( $p = 0.0604$ )。

### 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 3 件)

1. Hirano S, Tanaka E, Tsuchikawa T, Matsumoto J, Shichinohe T, Kato K: Techniques of biliary reconstruction following bile duct resection (with video). J Hepatobiliary Pancreat Sci 19 203-209 2012 査読有
2. Hirano S, Kondo S, Tanaka E, Shichinohe T, Tsuchikawa T, Kato K, Matsumoto J, Kawasaki R: Outcome of surgical treatment of hilar

cholangiocarcinoma: a special reference to postoperative morbidity and mortality. J Hepatobiliary Pancreat Surg 17, 455-462, 2010 査読有

3. Hirano S, Kondo S, Tanaka E, Shichinohe T, Tsuchikawa T, Kato K, Matsumoto Joe: Postoperative Bowel Function and Nutritional Status following Distal Pancreatectomy with En-Bloc Celiac Axis Resection. Digest Surg 27, 212-216, 2010 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1. International Symposium on Cholangiocarcinoma  
開催日程13.02.08~13.02.09(東京)Institute of Medical science The University of Tokyo.

Hirano S

演題名

Validation of feasibility of pre-operative endoscopic naso-biliary drainage as a primary procedure for patients with hilar cholangiocarcinoma.

2. Gastrointestinal Cancers Symposium (ASCO)

開催日程13.01.24~13.01.26 (San Francisco) USA, The Moscone west Building.

Hirano S, Satoi S, Yamaue H, Kato K, Takahashi S, Takeda S, Eguchi H, Sho M, Wada K, Shinichi H, Kwon H, Kinoshita T, Nakao A, Nagano H, Nakajima Y, Sano K, Miyazaki M, Takada T

演題名

Clinical efficacy of adjuvant surgery following systemic treatments in patients with initially unresectable pancreatic cancer: Results of a project study for

pancreatic surgery by the Japanese society of hepato-biliary-pancreatic surgery.

3. 第10回World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association (IHPBA)

開催日程12.07.01~12.07.05(Paris)

France, Palais des congres

Hirano S, Tanaka E, Tsuchikawa T, Kato K, Matsumoto J

演題名

Oblique transection of the pancreas head in extended distal pancreatectomy with en bloc celiac axis resection (DP-CAR).

4. 第24回日本肝胆膵外科学会

開催日程12.05.30~12.06.01 (大阪市)

大阪国際会議場

Hirano S, Tanaka E, Tsuchikawa T, Matsumoto J, Kato K, Ebihara Y, Shichinohe T

演題名

Distal Pancreatectomy with en bloc celiac axis resection (DP-CAR) for locally advanced pancreatic body cancer: Tips for achieving negative surgical margins.

5. 第4回AOPA&KPBA

開催日程11.09.02~11.09.03 (Jeju) 韓国

ロッテホテル済州

Satoshi Hirano, Takumi Miura, Kentaro Kato, Joe Matsumoto, Takahiro Tsuchikawa, Toshiaki Shichinohe, Eiichi Tanaka

演題名

Distal pancreatectomy with en bloc celiac axis resection (DP-CAR) for locally advanced pancreatic body cancer.

6. 第111日本外科学会

開催日程11.05.26~11.05.28(東京都)

東京国際フォーラム予定 (紙上開催 東北大地震の為)

Hirano S, Kondo S, Miura T, Takada M, Tamoto E, Teramoto K, Murakami S, Kato K, Matsumoto J, Tsuchikawa T, Shichinohe T, Tanaka E

演題名

Distal pancreatectomy with en bloc celiac axis resection (DP-CAR) followed by adjuvant therapy as a novel strategy for advanced pancreatic body cancer.

7. 第1回IAP&JPS 2010 (第41回日本膵臓学会・第14回国際膵臓学会) Joint Meeting

開催日程10.07.11 ~10.07.13(福岡)

国際会議場

Hirano S, Kondo S, Tanaka E, Shichinohe T, Kato K, Matsumoto J, Kawasaki R

演題名

Oblique transection of the pancreas head in extended distal pancreatectomy with en bloc celiac axis resection (DP-CAR) for advanced pancreas body cancer.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 聡 (HIRANO SATOSHI)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：50322813

(2) 研究分担者

土川 貴裕 (TSUCHIKAWA TAKAHIRO)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：50507572

中村 透 (NAKAMURA TORU)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70645796

(3) 連携研究者

なし