

## 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 6 月 4 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22591529

研究課題名（和文） MPF 発現からみた膵腫瘍の新規悪性度診断

研究課題名（英文） Diagnosis of malignant pancreatic tumor by the expression of MPF

研究代表者：谷 眞至 （TANI MASAJI）  
和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60236677

## 研究成果の概要（和文）：

切除した膵腫瘍組織の中から、膵管内乳頭粘液性腺腫、carcinoma in situ、微小浸潤癌、浸潤癌の組織を抗 mesothelin 抗体を用い、免疫組織化学染色を施行したところ、浸潤性膵管癌は 10 例全例が mesothelin の発現が陽性であった。IPMN 由来浸潤癌は 9 例中 7 例が mesothelin の発現が陽性となった。さらに、IPMN 由来浸潤癌は全例浸潤部で mesothelin が発現していた。しかし、MPF の発現を免疫組織化学的染色法では確認することができず、理論的には mesothelin と同様の部位に発現しているものと想像されたが、膵癌細胞の mesothelin 発現メカニズムについての再考が必要である。

## 研究成果の概要（英文）：

We performed immune-chemical staining for the pancreatic cancer tissues. All of invasive pancreatic cancer cells expressed mesothelin, and 7 of 9 IPMN-derived pancreatic cancer cells also expressed mesothelin. In addition, the front of IPMN-derived cancer was demonstrated that mesothelin expressed strongly by immune-chemical staining. However, there was no MPF-positive cells. We concluded that it is necessary to consider the mechanism of mesothelin.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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

膵癌の予後は不良である。膵癌に特的な症状はなく、診断時には遠隔転移等があり、切除に至らない症例が現在でも半数以上認められる。予後改善のためには適切な診断による適切な治療が必須であると考えられる。

近年、膵管内乳頭粘液性腫瘍の概念が確立されるとともに病理学的データも多数集積され、膵管内乳頭粘液性腫瘍の経過や問題点も明らかに見えてきた。膵管内乳頭粘液性腫瘍は膵癌の前癌状態であるが、病変の伸展に伴い、良性から悪性へと変化していくのが通常ではあるが、臨床の現場としては画像や採血結果などの臨床診断として、良悪性の鑑別に難渋することにたびたび遭遇することがあり、手術適応の決定は必ずしも容易ではない。

そこで、megakaryocyte potentiating factorの発現を解析することで、膵癌の悪性度診断ならびに臨床診断が可能か否かを検討し、さらに、megakaryocyte potentiating factorが膵癌に高発現していた場合は癌治療のための標的分子になる可能性があり、現在有効な治療法の少ない膵癌において、新たな治療の候補の開発は非常に意義のあることであることは間違いない。

## 2. 研究の目的

膵腫瘍患者の手術前検査の1つである内視鏡的逆行性膵管造影検査時に採取した膵液中の細胞から定量的RT-PCRを施行し、膵癌の診断やIPMN由来浸潤癌の診断にmegakaryocyte potentiating factorが有用か否かを検討する。また、切除した組織の免疫組織学的検査からmegakaryocyte potentiating factorとmesothelinを比較検討し、megakaryocyte potentiating factor発現程度が将来の膵癌治療の標的となる可能性を模索する。

## 3. 研究の方法

膵液並びに切除標本からmRNAを抽出し、megakaryocyte potentiating factor

の発現強度を検討する。更に、切除標本から組織免疫染色法にてmegakaryocyte potentiating factorとmesothelinの発現を検討する。

## 4. 研究成果

### 4-1) mRNA発現

Megakaryocyte potentiating factorのmRNAのプライマーを作成し、ヒト膵癌腫瘍株を用い、RT-PCRを行った。

RT-PCRで得られた検体をNorthern blottingし、megakaryocyte potentiating factorのDNAが複製されたことを確認した。標準曲線を作成するために決定した膵癌腫瘍細胞株からmRNAを抽出し、ロッシュ社製LightCyclerを用いた定量的RT-PCRの条件設定のためにCyber greenを用いた。

使用したPrimerは

5' -CGGAATTCGCCGCCACCATGGCCTTGCCAACG  
GCTCGACCCCTGTTG-3'

5' -GCTCTAGAGATGGTCCGTTTCAGGCTGCCGCCA  
GGATGG-3'であった。

しかし、megakaryocyte potentiating factor遺伝子発現の検出限界と感度を検定することはできなかった。

### 4-2) 免疫組織学的染色

われわれは切除した膵腫瘍組織の中から、膵管内乳頭粘液性腺腫、carcinoma in situ、微小浸潤癌、浸潤癌を抗mesothelin抗体を用い、免疫組織化学染色を施行したところ、浸潤性膵管癌は10例全例がmesothelinの発現が陽性であり、IPMN由来浸潤癌は9例中7例がmesothelinの発現が陽性となり、陽性となったIPMN由来浸潤癌は全例浸潤部でmesothelinが発現していた。さらに、膵液中のmesothelinのmRNAが膵癌と膵管内乳頭粘液性腫瘍で高率に認められ、その発現強度は膵管内乳頭粘液性腫瘍と比較して膵癌で強く発現していた。これらことはmesothelinが膵癌(IPMN由来浸潤癌を含む)の浸潤に強く関連することを示唆している。

そこで、当科で切除した膵癌切除組織を薄切標本をスライドガラス上に作製し

た。免疫組織染色施行前に Xylen および Ethanol にて脱パラフィンを施行後、121℃で 10 分間熱処理した。さらに Methanol で15分間処理し、PBSで洗浄し、10% Goat 血清を用いて 10 分間タンパクブロッキングを施行した。一次抗体として、抗 mesothelin モノクローナル抗体 (clone5B2, Novocastra Laboratories, 1:10)、抗 MPF モノクローナル (clone618923, R&D systems, 1:500) 抗体を用いた。作成した薄切標本を一次抗体と 4℃で over night 処理し、洗浄した後、二次抗体で処理した後に、薄切標本を PBS で洗浄の後、室温で 15 分間 DAB 発色を行った後、Hematoxylin で染色を追加した。薄切標本を観察すると、mesothelin は膵癌細胞で染色されたが MPA は膵癌細胞では染色されなかった。理論的には MPA が mesothelin と同じ部位に発現しているものと考えられたが、MPA は染色されず、今回の知見が正しいかあるいは他に原因があるのかを今後検討する必要がある。

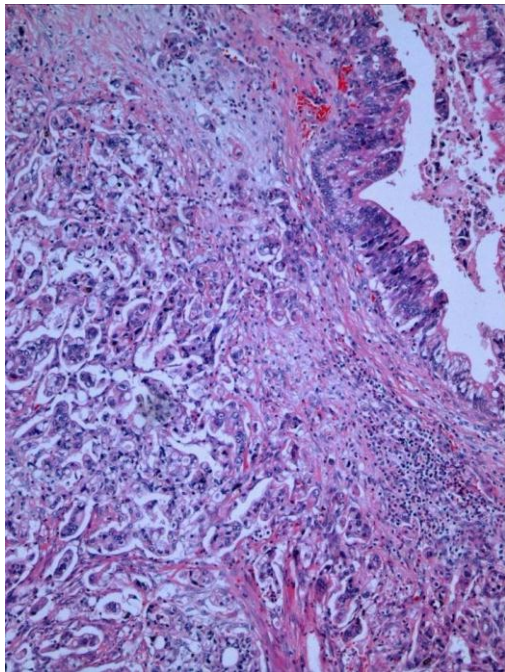


図 1. IPMN 由来浸潤癌に対する Hematoxylin & Eosin 像 (x100)

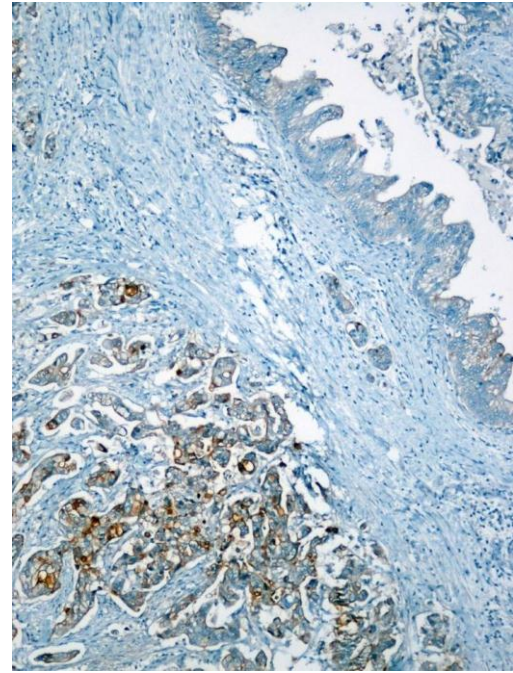


図 2. Mesothelin 免疫組織化学的染色像 (x 100)

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

肝胆膵外科領域のトランスレーショナルリサーチ 網羅的遺伝子発現解析を用いた膵癌の浸潤に関与する遺伝子群の同定. : 清水 敦史, 廣野 誠子, 谷 眞至, 川井 学, 宮澤 基樹, 内山 和久, 中村 靖司, 山上 裕機  
日本肝胆膵外科学会 2010年5月27日 仙台

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

谷 眞至 (TANI MASAJI)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60236677

### (2) 研究分担者

山上 裕機 (YAMAUE HIROKI)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20191190

川井 学 (KAWAI MANABU)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：403984597

廣野 誠子 (HIRONO SEIKO)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60468288

宮澤 基樹 (MIYAZAWA MOTOKI)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号：90549734

### (3) 連携研究者