

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 24 年 6 月 18 日現在

機関番号：24701
 研究種目：若手（B）
 研究期間：2010 年 ～ 2011 年
 課題番号：22791297
 研究課題名（和文） 膵癌浸潤過程における高発現遺伝子産物を応用した新規膵癌治療戦略
 研究課題名（英文） Identification of biomarkers related to invasion for pancreatic cancer by expression profile
 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）：網羅的遺伝子発現解析を行い、膵癌の浸潤過程に関与する遺伝子群の同定を行った。MUC16 および Mesothelin は膵癌の予後予測マーカーとなり得るのみならず、共に相互作用して膵癌の浸潤過程に重要な役割を担っており、膵癌新規治療の分子標的になりうることが分かった。

研究成果の概要（英文）：MUC16 and mesothelin are involved in pancreatic cancer cell invasion and migration, and MUC16 and mesothelin clinically represent new prognostic biomarkers for PDAC and might be new therapeutic targets for patients with PDAC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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

膵癌は早期に局所進展，脈管浸潤を来しやすく，手術療法，化学療法が飛躍的に向上した現在でも，依然予後不良な癌腫であり，その浸潤過程に関わる遺伝子の発見は膵癌治療のさらなる発展の為には不可欠である。

浸潤性膵管癌は，細分枝膵管細胞の異型，すなわち Pancreatic intraepithelial neoplasms

（PanIN）と称される前駆病変を経て浸潤癌と進展することが知られている。PanIN-3 は異型細胞の乳頭状増殖を呈して従来の *in situ* に相当し，この異型細胞が基底膜を破って周囲に浸潤することで浸潤癌となる。これまで膵癌の発生に関わる種々の遺伝子異常が PanIN の進展に伴って蓄積されることが報告されているが，浸潤癌と PanIN-3

の遺伝子発現プロファイルを比較した報告はなく、今回これを試みた。さらに同定された遺伝子より MUC16 と mesothelin に着目し、臨床検体および膵癌細胞株を用いて膵癌における発現、相互作用、浸潤解析を行った。

2. 研究の目的

浸潤性膵管癌は、細分枝膵管細胞の異型、すなわち Pancreatic intraepithelial neoplasms (PanIN) と称される前駆病変を経て進展することが知られており、従来の *in situ* に相当する PanIN-3 より異型細胞が基底膜を破り周囲に浸潤することで浸潤癌となる。これまで膵癌の発生に関わる種々の遺伝子異常が報告されているが、浸潤癌と PanIN-3 の遺伝子発現プロファイルを比較した報告はなく、今回これを試みた。さらに同定された遺伝子より MUC16 と mesothelin に着目し、膵癌における発現、相互作用、浸潤解析を行った。

3. 研究の方法

① 網羅的遺伝子発現解析を用いた膵癌の浸潤過程に関与する遺伝子の同定

膵浸潤癌と PanIN-3 を同一切片上に認める凍結切片 5 サンプル、コントロールとして膵癌以外の膵切除検体から採取した正常膵管 3 サンプルを対象とした。マイクロダイセクションを用いて同一切片上の浸潤癌と PanIN-3 の細胞をそれぞれ別々に回収して RNA を抽出し、GeneChip Human U133 plus 2.0 array (Affymetrix 社) を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。

② 膵癌組織における MUC16 および mesothelin 発現解析

2003 年 1 月から 2007 年 12 月までに和歌山県立医大第二外科で手術を施行した浸潤性膵管癌切除症例 103 例を対象とし、ホ

ルマリン固定パラフィン包埋保存された標本から薄切切片を作成し、ストレプトアビジンビオチン法にて免疫染色を行った。一次抗体は抗 MUC16 抗体 X325 (1:1,000, Abcam) と抗 mesothelin 抗体 5B2 (1:20, Novacastra) を用いた。染色された強度を 4 段階に分類 (0: no staining, 1+: weak, 2+: moderate, 3+: strong), 染色された細胞の割合を 0-100% でカウントし、その積をもって免疫染色スコアとした (range, 0-300)。それぞれの中央値で 2 群ずつに分け、MUC16/mesothelin とともに高発現群と、その他の群にわけて臨床病理学的因子 (分化度, 腫瘍径, 局所進展度, リンパ管浸潤, 血管浸潤, 神経浸潤, リンパ節転移), 生存率について検討した。統計学的処理として、臨床病理学因子との相関は χ^2 乗検定で、生存率との相関は Kaplan-Meier 法および Cox ハザードモデルで検討した。

③ MUC16 と mesothelin の相互作用解析

Zenon Kit (Molecular Probes 社) を用いてパラフィン包埋薄切切片上で、Alexa Fluor 594 および 488 蛍光抗体でラベルした抗 MUC16 抗体 (X325) と抗 mesothelin 抗体 (5B2) を用いて二重免疫蛍光染色を行った。また、浸潤性膵管癌手術検体と膵癌細胞株 PK9 よりタンパク抽出した組織、細胞ライセートを対象として Universal Magnetic coimmunoprecipitation kit (Active Motif 社) を用いて共免疫沈降法を行った。一次抗体として抗 MUC16 抗体 OC125 (DAKO) と抗 mesothelin 抗体 MN-1 (Rockland) を用いた。

④ MUC16 抑制膵癌細胞株, MUC16 と mesothelin の blocking 抗体を用いた膵癌の浸潤能, 遊走能解析

MUC16, mesothelin を共に発現する膵癌細胞株 PK-9 に shRNA を用いて MUC16

抑制株を作成し，Matrigel invasion chamber (BD Bioscience) を用いて浸潤能，遊走能を検討した．また，MUC16 と mesothelin 結合に対する blocking 抗体として報告されている抗 MUC16 抗体 OC125, M11 (DAKO) を用いて浸潤能，遊走能を検討した．

4. 研究成果

同一個体の浸潤癌と PanIN-3 のマイクロアレイデータを比較し，5pair すべてにおいて，浸潤癌で up-regulate した遺伝子 87 個，down-regulate した遺伝子 22 個を同定した (fold change 1.5 以上，平均強度差 100 以上， $P < 0.05$)．さらに，浸潤癌，PanIN-3 とともに正常膵管よりも高発現を認めた遺伝子を抽出すると，18 遺伝子を確認，中でも浸潤癌特異的に最も高発現した MUC16 と，卵巣癌において MUC16 と相互作用が知られている mesothelin の 2 遺伝子に着目し，免疫組織染色解析を行った．MUC16 および mesothelin とともに正常膵管，PanIN-3 では発現を認めず，浸潤癌でのみ発現を認め，網羅的遺伝子発現解析の結果と矛盾しなかった．臨床病理学的因子との相関では，MUC16 および Mesothelin 高発現群は，低発現群より腫瘍径が大きく ($p=0.004$)，膵前方組織浸潤 ($p=0.01$)，多臓器浸潤 ($p=0.04$)，リンパ管侵襲 ($p=0.03$) が多く，Overall Survival (OS) は不良であった． ($p=0.0006$)．Cox ハザードモデルを用いて生存因子解析を行うと，MUC16/mesothelin 高発現は独立した生存期間短縮因子であった ($p=0.02$, HR 1.94, 95%CI 1.13-3.31)．また，免疫組織染色において MUC16, mesothelin とともに浸潤先進部で強発現する例を 48 例/103 例 (47%) に認め，浸潤過程において重要な役割を担っていることが推測された．二重蛍光染色

にて MUC16, mesothelin は同一膵癌細胞の細胞膜に発現を認め，互いに相互作用を生じていることが示唆され，共免疫沈降法を行うと，切除標本，膵癌細胞株 PK9 両方において，抗 MUC16 抗体を用いた免疫沈降物に mesothelin が検出され，抗 mesothelin 抗体を用いた免疫沈降物に MUC16 が検出され，膵癌において両者は結合し相互作用を生じていることが分かった．さらに膵癌細胞株 PK9 を用いて invasion assay, migration assay を行うと，MUC16 抑制株で有意に invasion, migration とともに抑制された．MUC16, mesothelin の blocking 抗体 OC125, M11 を用いて MUC16 と mesothelin の結合を block すると，同様に invasion, migration とともに抑制され，MUC16, mesothelin は膵癌において相互に作用し，浸潤に関与していることが分かった．

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. Shimizu A, Hirono S, Tani M, Kawai M, Okada K, Miyazawa M, Kitahata Y, Nakamura Y, Noda T, Yokoyama S, Yamaue H. Coexpression of MUC16 and mesothelin is related to the invasion process in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci* 103; 739-746, 2012 (査読有り)

[学会発表] (計 2 件)

1. 廣野誠子, 清水敦史, 横山省三, 谷 眞至, 川井 学, 岡田健一, 宮澤基樹, 北畑祐司, 中村靖司, 山上裕機: 網羅的遺伝子発現解析を用いた膵癌の "invasion

process”に関する遺伝子の同定・MUC16
と mesothelin の役割. 第 31 回日本分子腫
瘍マーカー研究会 2012.10 名古屋

2. 廣野誠子、清水敦史、谷 眞至、川井 学、
岡田健一、宮澤基樹、北畑祐司、横山省三、
山上裕機：網羅的遺伝子発現解析を用いた膵
癌における浸潤過程関連遺伝子群の同定に
よる新規治療法の開発. 第 112 回 日本外科
学会 2012.4 千葉

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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：