

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390085

研究課題名(和文)最も難治性である膵胆管系癌の早期質的診断ならびに進展度診断のシステム構築

研究課題名(英文) Establishment of early diagnosis system of pancreatobiliary carcinomas by the application of mucin expression profiles

研究代表者

米澤 傑 (YONEZAWA, Suguru)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：10175002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,500,000円、(間接経費) 4,650,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌の正確な早期診断や、亜型により予後の異なる膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)の診断はしばしば困難を極める。我々は、膵腫瘍におけるムチン発現の一連の研究において、膵腫瘍ごとに独特のMUC1・MUC2・MUC4の発現パターンがあることを報告してきた。さらに、新規なDNAメチル化解析(MSE)法を開発した。

45例の膵液をMSE法により評価し診断予測を行った結果、膵癌80%・87%、腸型IPMNは88%・100%、胃型IPMNは77%・88%の感度・特異度を示し、膵腫瘍の早期鑑別診断への応用が可能である。加えて、低酸素環境に曝された癌細胞が、MUC1を介し転移能を獲得する可能性を報告した。

研究成果の概要(英文)：It is very difficult to perform an early detection of pancreatic ductal adenocarcinomas (PDACs) or an accurate differential diagnosis for subtypes of intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMNs) with different outcome. Expression profiles of MUC1, MUC2 and MUC4 are different between PDACs and IPMNs. We developed a methylation-specific electrophoresis (MSE) method to analyze the DNA methylation status.

By using the MSE, we evaluated pancreatic juices from 45 patients. The predictive diagnosis by MSE showed sensitivity and specificity of 80% and 87% for PDAC; 88% and 100% for intestinal-type IPMN; and 77% and 88% for gastric-type IPMN; respectively. The MSE analysis of pancreatic juices may give us useful informations for diagnosis of human pancreatic neoplasms. Another study for the first time demonstrated a pivotal role of MUC1 in controlling the hypoxia-driven angiogenesis through the regulation of multiple proangiogenic factors in PDAC cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 人体がん病理学

キーワード：膵癌 IPMN mucin DNA methylation diagnosis angiogenesis

1. 研究開始当初の背景

膵胆管系の癌は、PET-CT等の最新の機器を用いても、いまだに早期発見どころか、治療を望める段階での診断は不可能であることが多く、それゆえ、手遅れになる最も難治性の癌である。また、たとえ手術適応となったとしても手術術式が複雑で根治性が低い。一方で、膵・胆管系にも癌と類似した像を呈する腫瘍様病変あるいは良性腫瘍が存在するが、他臓器と異なり腫瘍が存在することは判っても、その生検標本を得ることが難しく手術前に病理学的な質的診断を得ることが困難である。それゆえ、侵襲性の高い手術が必要であるか、縮小手術の適応であるか、あるいは、経過観察でよいか、の判断に難渋するのも膵胆管系の腫瘍の特徴である。さらに、膵胆管系の癌が高い悪性度を有し、早期より浸潤・転移を来しやすい上、その解剖学的位置のため、根治的治療である外科的治療には多大な侵襲が伴い長期の闘病生活を余儀なくされる。その間の患者本人の身体的・経済的負担は大きく、それを支える家族の心理的・経済的負担も大きい。膵胆管系の癌は、現在では手術療法単独ではなく、放射線療法や化学療法も加えた集学的療法も行われており、予後の改善が図られているが、他臓器の癌に比較して依然予後は極めて不良である。そのため、「膵胆管系腫瘍の早期診断」、あるいは、「悪性度を規定する分子標的の同定」が望まれている。

2. 研究の目的

近年、膵胆管腫瘍を含む種々の癌においてムチン分子ファミリーの異常発現が確認され、分子レベルでも増殖・浸潤転移・抗癌剤耐性・免疫機構回避など癌進展の各プロセスにおいて、癌の悪性化に関与することが数多く報告されはじめている (Nat Rev Cancer 9:874, 2009)。当研究室では、早くからムチンに注目して研究を進め、ムチン発現と予後との関係やその発現機構を世界に先駆けて明らかにしてきた。本研究では、これまで我々が世界に先駆けて明らかにしてきた、(1)一連のムチンファミリー抗原の発現様式と癌の生物学的悪性度との関連性を、(2)新規メチル化パターン解析法(特許出願中)を用いて当該遺伝子プロモーター領域におけるDNAメチル化の変化として高感度に検出し、さらに、(3)悪性度を規定するムチンの糖鎖修飾プロファイルとあわせることで、多角的に異常ムチン発現及び修飾状況の解析を行い、難治性の膵胆管系癌を早期に、かつ、その浸潤性や転移能などの悪性度の診断もあわせて的確に行う方法を確立する。

3. 研究の方法

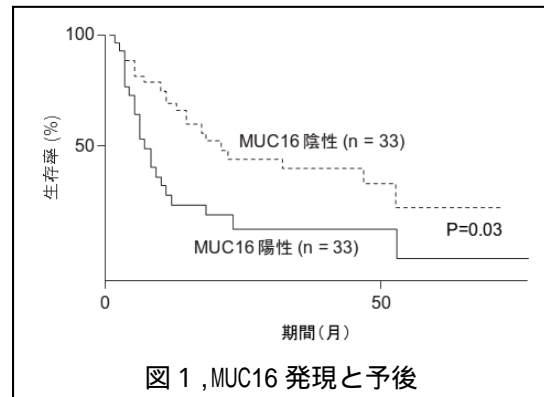
膵胆管腫瘍の悪性度及び早期診断法の基盤を確立するため、初年度は膵胆管腫瘍患者由来の組織標本を中心に解析を進め、(1)免疫組織化学による生物学悪性度と各ムチ

ンの発現レベルのプロファイル、(2)新規メチル化パターン解析法を用いた、臨床病理学的悪性度の異なる病変毎のメチル化パターンプロファイル、(3)糖鎖修飾に関しては、Supported molecular matrix electrophoresis (SMME)法を用いた病理学的悪性度と糖鎖異常のプロファイル、を作成する。次に、より侵襲性の低い針生検標本や体液(膵液や胆汁)においてもプロファイル化を行い、組織での結果や臨床病理学的所見との比較検討を行うことで、臨床応用への有用性を明らかにする。

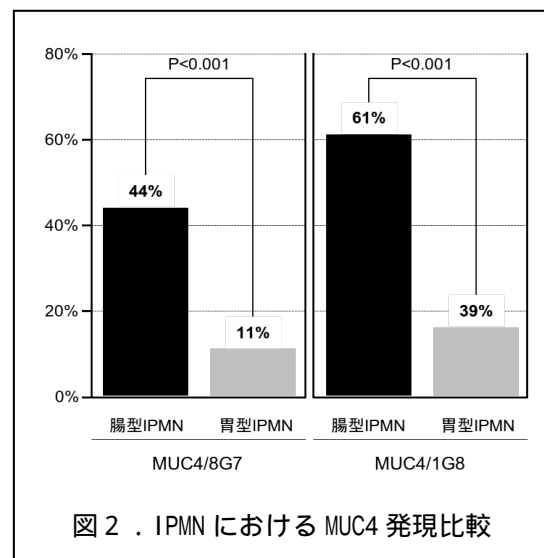
4. 研究成果

(1) 胆管組織標本における各ムチン分子の発現プロファイルの作成

肝内胆管癌において、免疫染色を行いMUC16の発現を比較検討するために、外科切除を受けた腫瘍形成性肝内胆管癌63例を解析した。48%(30/63例)で陽性であり、MUC16陽性例では陰性例に比べて有意に予後不良であった(P=0.03)(図1)。また、外科切除を受けた浸潤性膵管癌66例において、免疫染色を行いMUC17の発現を比較検討した。52%(34/66例)で陽性であり、組織型別では、乳頭腺癌が管状腺癌より陽性率が高く、低分化腺癌では陽性例は認められなかった。



(2) 膵臓組織標本における MUC4 発現の意義



膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) 142 例において、MUC4 の免疫染色を行った。癌に進行しやすい腸型 IPMN は、比較的安全な胃型 IPMN より有意に MUC4 発現が亢進していることを明らかにした (図 2)。加えて、胃型 IPMN においても、形態異常が進むにつれて MUC4 発現が増加することを報告した。

(3) 小腸癌組織標本における各ムチン分子のコアタンパク質発現状況の解析

膵胆管系癌のムチン発現様式との比較を行うために、小腸癌におけるムチンの臨床病理学的意義の解明を行った。小腸癌 60 症例を解析し、MUC1 (図 3)、MUC5AC および MUC16 の発現が小腸癌において予後不良因子であることを報告した。

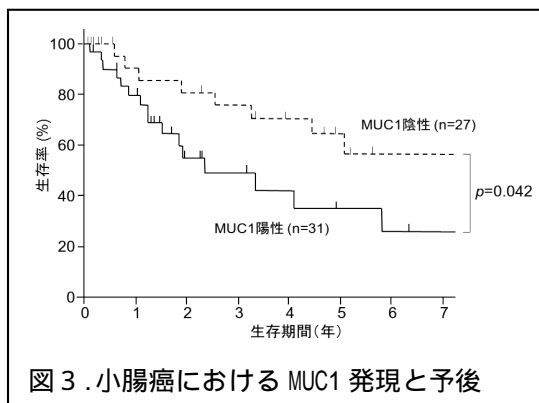


図 3 . 小腸癌における MUC1 発現と予後

(4) 組織標本における各ムチン遺伝子のメチル化プロファイルの作成

我々が開発した新規な高感度 DNA メチル化解析方法である「Methylation specific electrophoresis (MSE) 法」を論文として発表した。また、胆管癌患者における腫瘍部と非腫瘍部との各ムチン遺伝子プロモーター部のメチル化解析を行ったところ、そのタンパク質や mRNA の発現と DNA のメチル化に相関関係を認めることができた。また、MUC1 プロモーター部において、腫瘍部は非腫瘍部に対して、有意に非メチル化されていることを見出した (図 4)

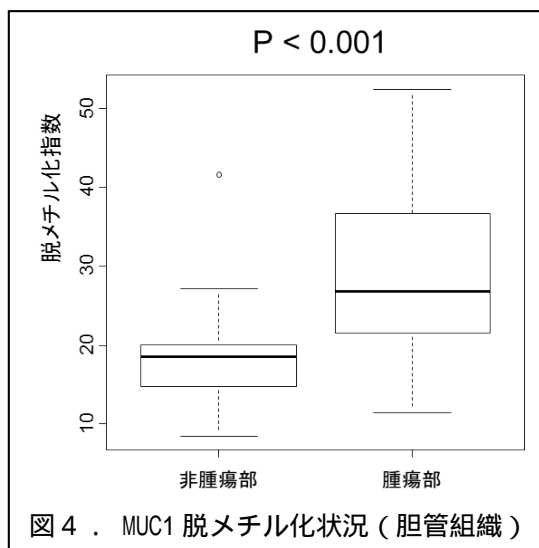


図 4 . MUC1 脱メチル化状況 (胆管組織)

(5) 膵胆管腫瘍組織における各ムチン分子の異常糖鎖修飾プロファイルの作成

糖鎖変化を指標とする疾患関連バイオマーカーの開発は、現在の糖鎖科学における重要な課題のひとつである。本報告では、種々の細胞株を用いた実験により、コアとなるムチンタンパク質は同一でも、癌腫によってその糖鎖構造が全く異なることなど興味深い知見を得た。

(6) より侵襲性の低い針生検標本や体液 (膵液や胆汁) への応用

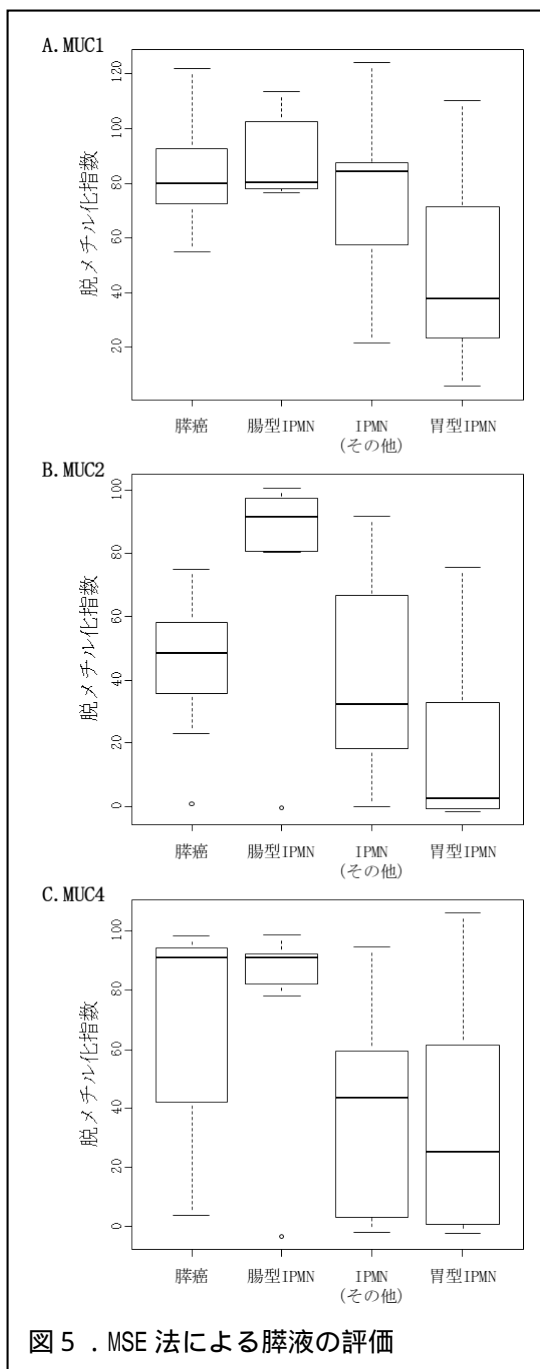


図 5 . MSE 法による膵液の評価

我々の開発した、高い解像度 (0.1%) と高い検出力 (20pg) を持って DNA メチル化パターンを解析できる MSE 法を、膵液中の DNA に応用し、3 種のムチン遺伝子 (MUC1, MUC2, MUC4) を解析した (図 5)。45 例の解析

の結果、膵腫瘍診断予測の感度・特異度は、膵癌 80%・87%、腸型 IPMN（癌に移行しやすいタイプ）は 88%・100%、胃型 IPMN（安全なタイプ）は 77%・88%であり、膵腫瘍の早期鑑別診断に応用できる可能性を示すことができた。

(7) MUC1 発現の意義解明

低酸素環境における MUC1 発現の機能的意義の解明を行った結果、以下の結果を得た。

低酸素下（酸素濃度 1%）で培養した膵癌の培養上清には血管内皮細胞の管腔形成誘導能がある。転移巣からの膵癌細胞株では MUC1 の低酸素応答性の発現上昇が顕著で、MUC1-cytoplasmic tail (MUC1-CT) が膜面から核へ移行する。核へ移行した MUC1-CT は p53 や カテニンを伴い血管新生因子である CTGF の転写及び分泌を強く促進する。低酸素性 MUC1 発現は他の血管新生因子 VEGFA や PDGFB の分泌促進にも寄与する。これら血管新生因子の制御を介して MUC1 が血管内皮細胞の血管新生能を亢進させる「Key regulator」の一つであることが明らかになった。これらの知見は、低酸素環境に曝された癌細胞が MUC1 を介して転移能を獲得する可能性を示唆している（図 6）

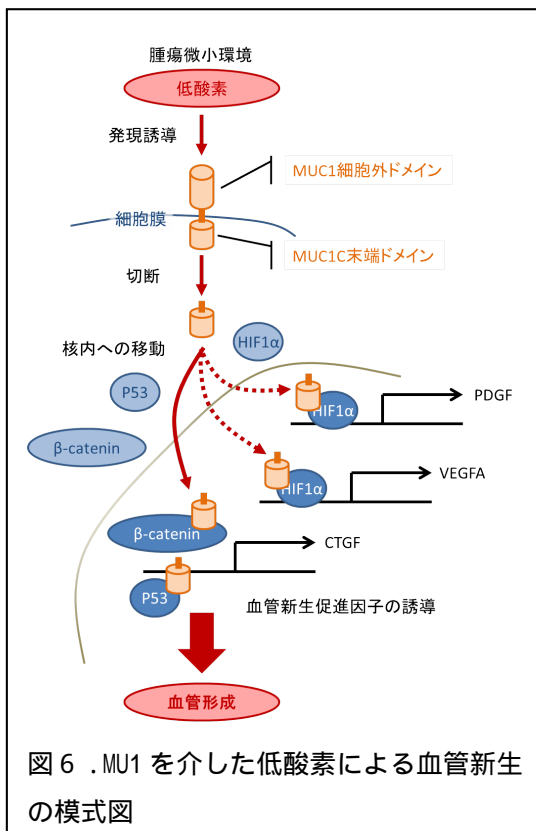


図 6 . MUC1 を介した低酸素による血管新生の模式図

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 2 1 件)

1. Yokoyama S, Kitamoto S, Higashi M, Goto

Y, Hara T, Ikebe D, Yamaguchi T, Arisaka Y, Niihara, Nishimata H, Tanaka S, Takaori K, Batra S K, Yonezawa S: Diagnosis of pancreatic neoplasms using a novel method of DNA methylation analysis of mucin expression in pancreatic juice. PLoS ONE, 9(4):e93760, 2014, 査読有, doi:10.1371/journal.pone.0093760.

2. Shibahara H, Higashi M, Koriyama C, Yokoyama S, Kitazono I, Yasuhiro K, Narita M, Kuze S, Takanori K, Mita S, Arai T, Kato T, Yuasa N, Yamaguchi R, Kubota H, Suzuki H, Baba S, Rousseau K, Batra S K, Yonezawa S: Pathobiological implications of mucin (MUC) expression in the outcome of small bowel cancer. PLoS ONE, 9(4):e86111, 2014, 査読有, doi:10.1371/journal.pone.0086111.

3. Kitazono I, Higashi M, Kitamoto S, Yokoyama S, Horinouchi M, Osako M, Shimizu T, Tabata M, Batra S K, Goto M, Yonezawa S: Expression of MUC4 mucin is observed mainly in the intestinal-type of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. Pancreas, 42(7):1120-1128, 2013, 査読有, doi:10.1097/MPA.0b013e3182965915.

4. Kitamoto S, Yokoyama S, Higashi M, Yamada N, Takao S, Yonezawa S: MUC1 enhances hypoxia-driven angiogenesis through the regulation of multiple proangiogenic factors. Oncogene, 32(39):4614-4621, 2013, 査読有, doi:10.1038/onc.2012.478.

5. Matsuno YK, Dong W, Yokoyama S, Yonezawa S, Narimatsu H, Kameyama A: Identification of mucins by using a method involving a combination of on-membrane chemical deglycosylation and immunostaining. Journal of Immunological Methods, 394(1-2):125-30, 2013, 査読有, doi:10.1016/j.jim.2013.06.002.

6. Tamura Y, Higashi M, Kitamoto S, Yokoyama S, Osako M, Horinouchi M, Shimizu T, Tabata M, Batra SK, Goto M, Yonezawa S: MUC4 and MUC1 expression in adenocarcinoma of the stomach correlates with vessel invasion and lymph node metastasis: an immunohistochemical study of early gastric cancer. PLoS ONE, 7(11):e49251, 2012, 査読有, doi:10.1371/journal.pone.0049251.

7. Kitamoto S, Yokoyama S, Higashi M, Yamada N, Matsubara S, Takao S, Batra S K,

Yonezawa S :Expression of MUC17 is regulated by HIF1 $\alpha$ -mediated hypoxic responses and requires a methylation-free hypoxia responsible element in pancreatic cancer. PLoS ONE, 7(9):e44108, 2012, 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0044108.

8. Yonezawa S, Kitajima S, Higashi M, Osako M, Horinouchi M, Yokoyama S, Kitamoto S, Yamada N, Tamura Y, Shimizu T, Tabata M, Goto M: A novel anti-MUC1 antibody against the MUC1 cytoplasmic tail domain: use in sensitive identification of poorly differentiated cells in adenocarcinoma of the stomach. Gastric Cancer, 15(4), 370-381, 2012, 査読有, doi: 10.1007/s10120-011-0125-2.

9. Yokoyama S, Kitamoto S, Yamada N, Houjyo I, Sugai T, Nakamura S, Arisaka Y, Takaori K, Higashi M, Yonezawa S: The application of methylation specific electrophoresis (MSE) to DNA methylation analysis of the 5' CpG island of mucin in cancer cells. BMC Cancer, 12:67, 2012, 査読有, published online, doi: 10.1186/1471-2407-12-67.

10. Higashi M, Yamada N, Yokoyama S, Kitamoto S, Tabata K, Koriyama C, Batra SK, Yonezawa S: Pathobiological implications of expression of MUC16/CA125 in intrahepatic cholangiocarcinoma-mass forming type. Pathobiology, 79(2): 101-106, 2012, 査読有, doi: 10.1159/000335164.

11. Matsuno Y, Dong W, Yokoyama S, Yonezawa S, Saito T, Gotoh M, Narimatsu H, Kameyama A: Improved method for immunostaining of mucin separated by supported molecular matrix electrophoresis by optimizing the matrix composition and fixation procedure. Electrophoresis, Jul;32(14): 1829-1836, 2011, 査読有, doi: 10.1002/elps.201000608.

12. Furukawa T, Hatori T, Fujita I, Yamamoto M, Kobayashi M, Ohike N, Morohoshi T, Egawa S, Unno M, Takao S, Osako M, Yonezawa S, Mino-Kenudson M, Lauwers GY, Yamaguchi H, Ban S, Shimizu M: Prognostic relevance of morphological types of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. Gut, 60(4):509-516, 2011, 査読有, doi: 10.1136/gut.2010.210567.

13. Yonezawa S, Higashi M, Yamada N, Yokoyama S, Kitamoto S, Kitajima S, Goto M: Mucins in human neoplasms: Clinical

pathology, gene expression and diagnostic application. Pathology International 61(12):697-716, 2011, 査読有, doi: 10.1111/j.1440-1827.2011.02734.x.

14. Yamada N, Kitamoto S, Yokoyama S, Hamada T, Goto M, Tsutsumida H, Higashi M, Yonezawa S: Epigenetic regulation of mucin genes in human cancers. Clinical Epigenetics, 2(2):85-96, 2011, 査読有, doi: 10.1007/s13148-011-0037-3.

〔学会発表〕(計25件)

1. Yonezawa S, Yokoyama S, Kitamoto S, Higashi M: Application of a novel DNA methylation analysis method (MSE) for mucin expression in pancreatic, biliary and pulmonary neoplasms, MUCINS IN HEALTH AND DISEASE (12th International Workshop on Carcinoma-associated Mucins), 27<sup>th</sup>-31<sup>th</sup> July 2013, Robinson College (Cambridge, UK)

2. Yonezawa S: Examination of mucin expression including a novel DNA methylation analysis method (MSE): Its application for diagnosis of human pancreatic neoplasms, International Symposium on Pancreas Cancer 2012 (招待講演), 2012年10月4日~6日, 京都国際コンベンションセンター(京都)

3. Yonezawa S: Epigenetic status analysis of mucin expression including a novel DNA Methylation analysis method (MSE): Its application for early diagnosis of human pancreatic neoplasms, MUCINS IN HEALTH AND DISEASE (11th International Workshop on Carcinoma-associated Mucins), 9<sup>th</sup>-13<sup>th</sup> July 2011, (招待講演), Robinson College (Cambridge, UK)

〔図書〕(計3件)

1. 米澤 傑, 東美智代: 膵腫瘍におけるムチンコア蛋白(MUC)の分子病理 (分担執筆), 専門医のための消化器病学第2版. (小俣政男、千葉勉;監修, 下瀬川徹、渡辺守、木下芳一、金子周一、櫻田博史;編集) pp686(642-645), 医学書院, 東京, 2013

2. 米澤 傑, 山田宗茂, 横山勢也, 北本 祥, 田畑和宏, 東美智代: 病理診断に役立つ分子生物学(病理と臨床臨時増刊号 Vol.29)(分担執筆), 第2部 病理診断医になじみのある疾患関連分子, MUC 解説編. (金井弥栄、石川俊平、池田栄二;編集) pp545(328-333), 株式会社文光堂, 東京, 2011

3. 米澤 傑、山田宗茂、横山勢也、北本 祥、田畑和宏、東美智代：病理診断に役立つ分子生物学(病理と臨床臨時増刊号 Vol.29)分担執筆)，第2部 病理診断医になじみのある疾患関連分子，MUC 診断編。(金井弥栄、石川俊平、池田栄二；編集) 545pp(334-340)，株式会社文光堂，東京，2011

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

1. 名称：ムチン(MUC1)タンパク質に対する抗体及びその用途  
発明者：米澤 傑  
権利者：鹿児島大学  
種類：特許  
番号：米国出願番号 13/577, 841  
出願年月日：2013年4月23日  
国内外の別：外国

2. 名称：METHOD FOR DIAGNOSING TYPE OF PANCREATIC TUMOR  
発明者：横山勢也、米澤 傑、北本 祥  
権利者：鹿児島大学  
種類：特許  
番号：国際出願番号 2012JP067262  
出願年月日：2012年6月29日  
国内外の別：外国

3. 名称：NOVEL DNA METHYLATION ANALYSIS METHOD  
発明者：横山勢也、米澤 傑  
権利者：鹿児島大学  
種類：特許  
番号：国際出願番号 2011JP060339  
出願年月日：2011年4月21日  
国内外の別：外国

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

鹿児島大学医歯学総合研究科先進治療科学専攻腫瘍学講座人体がん病理学  
<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~byouri2/>

難治性の膵がんを糖タンパク質「ムチン」の高感度分析法で早期診断する(日本病理学会ホームページ)  
<http://pathology.or.jp/ippan/pdf/yonezawa.pdf>

6. 研究組織

(1)研究代表者

米澤 傑(YONEZAWA SUGURU)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：10175002

(2)研究分担者

東 美智代(HIGASHI MICHIOYO)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授  
研究者番号：20569941

横山 勢也(YOKOYAMA SEIYA)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教  
研究者番号：20569941

新地 洋之(SHINCHI HIROYUKI)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：60284874

成松 久(NARIMATSU HISASHI)  
独立行政法人産業技術総合研究所・糖鎖医学研究センター・センター長  
研究者番号：40129581

亀山 昭彦(KAMEYAMA AKIHIKO)  
独立行政法人産業技術総合研究所・糖鎖医学研究センター・チーム長  
研究者番号：80415661