

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590447

研究課題名(和文) 膵胆管系腫瘍－難治性腫瘍－の早期診断システム確立

研究課題名(英文) Establishment of early diagnosis of pancreaticobiliary neoplasm

## 研究代表者

東 美智代(Higashi, Michiyo)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：60315405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ヒト膵胆道系腫瘍において、様々な癌の生物学的悪性度とムチン抗原の発現が密接に関連していることを報告してきた。今回、我々が開発した新規メチル化解析法(MSE法)を用いて主に膵液の解析を行ったところ、予後不良の膵管癌と予後の良い腫瘍とが鑑別できる可能性が示唆された。また生検検体でのムチン抗原発現と予後等が関連していることも見いだした。以上、膵液や生検組織等でのムチン検索が、膵胆管型腫瘍での組織型や予後予測に役立つことを示し、早期発見や治療等の臨床応用に役立つ可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We had reported that expression profiles of mucins are closely associated with biological behavior of human pancreaticobiliary neoplasms. We tried to analyse of clinical human samples, especially pancreatic juices used by a new method, MSE (methylation specific analysis) developed by us. This new tool has a potential for the application to possibility of distinguishing tumor between the pancreatic tumors with better prognosis or worse prognosis. In addition, we have found that expression profiles of mucin in EUS-FNA specimens are associated with biological behavior. Thus, analyses of mucin expression in pancreatic juice or EUS-FNA specimens are useful for pathological diagnosis and/or patients' treatment.

研究分野：医歯薬学

キーワード：病理学 膵胆道腫瘍 ムチン抗原 MUC1 MUC4 MUC16 早期診断

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌ならびに胆管癌は、予後不良な悪性腫瘍の一つである。画像診断が発達した今日においても早期発見どころか、治癒を望める段階での診断も困難であり、膵胆管系腫瘍自体が高い悪性を有し早期より浸潤・転移を来しやすいことなど、複合的要因が考えられる。一方で、膵・胆管系において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、他臓器と比較すると、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、その解剖学的位置のため、根治的治療である外科的治療は侵襲が大きく難易度も高く、多大な侵襲が伴い長期の闘病生活を余儀なくされることが多い。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。また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、他臓器に比較して依然予後は不良である。そのため、膵胆管系腫瘍の早期診断あるいはその予後因子の確定が望まれている。

### 2. 研究の目的

難治性腫瘍である膵胆管系腫瘍であるが、早期発見・早期診断ができれば有効な治療を積極的に行き予後の改善は見込まれる疾患群である。本研究では、膵胆管系腫瘍の予後因子であるムチン抗原発現の検討を基盤とし、膵液や胆汁などの術前生検材料等の解析と切除検体を対比し、ムチン抗原発現解析が腫瘍の質的診断や早期診断に応用可能であることを明らかにする。ムチン抗原の発現状況を、多数の膵胆管系腫瘍組織において免疫組織化学的に比較・検討し、その応用可能範囲を詳細に検索するとともに、組み合わせ評価も行う。加えて、膵液や胆汁中のムチン性糖蛋白、ムチン発現に関連する mRNA、mRNA 発現の制御に関わっているムチン遺伝子のプロモーター領域におけるエピジェネティクス変化等を総合的に検索したデータを蓄積する。最終的には、手術適応や術式選択等に直結したマーカーとしての確立を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1)膵液等からの各ムチンコア蛋白遺伝子の mRNA 検出ならびにムチン蛋白の検出

膵胆道系腫瘍患者の、術前あるいは摘出検体から膵液や胆汁液を採取した。また比較対象として、非腫瘍性疾患(膵胆管合流異常や胆管炎など)患者から得られた組織も採取し

た。採取後、mRNA を抽出し高感度の定量 Real-time PCR 法を用い、各種ムチンコア蛋白の mRNA に関して解析を行った。また、ELISA や Western blotting 等も行い、ムチン蛋白の検出も試みる。同時に DNA 抽出も行い、次項のメチル化状態の検討に用いる。既に培養細胞上清からの mRNA 検出を行っており、陽性対象として使用した。試験的に行った数例の解析では、全例ではないが mRNA あるいは DNA の抽出ならびに解析に成功している。なお、摘出標本本体でのムチン発現並びに予後データ等も併せて比較検討し、腫瘍の質的診断を反映しているかどうかは研究代表者・分担者で判断した。

#### (2)ムチンコア蛋白遺伝子 DNA プロモーター領域のメチル化状態の検討

我々は培養膵癌細胞を用い、MUC1、MUC2、MUC4、MUC5AC 等のムチン発現が、プロモーター領域のメチル化によって規定されていることを明らかにしてきた。今後は実際の臨床材料を対象として、人体内での DNA メチル化状態を検討した。共同研究者である横山は、従来までの検出限界 5% を超える 0.1% の感度を有する新規 DNA メチル化解析法: MSE 解析法(特許出願中)を開発した。この解析法により、少量の膵液あるいは胆汁液でも解析が行えるようになり、MUC1、MUC2、MUC4、MUC5AC に重点を置き DNA メチル化解析を行った。

#### (3)病理組織標本の解析

本研究期間内には、主として超音波エコーガイド下膵生検組織を用いてムチン抗原発現の検索を行った。

### 4. 研究成果

#### (1)膵液でのムチンコア蛋白遺伝子の mRNA、DNA プロモーター領域のメチル化状態発現の検討結果

浸潤性膵管癌、膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)、非腫瘍性組織を用いて検討を行った。

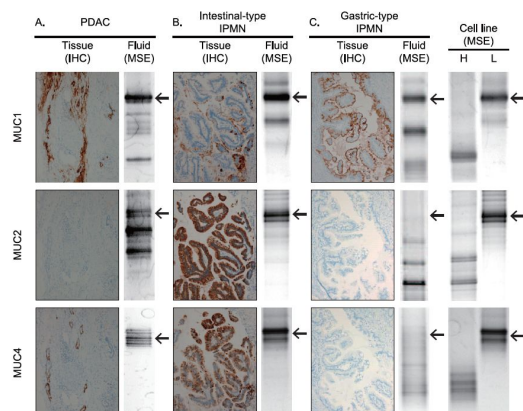


図 1 膵液の解析と切除組織での比較検討

各種ムチンコア蛋白の膵液での発現と膵組織での発現には相関が認められた。また MSE 法によるバンドは、各組織型で異なった発現パターンを示していた。

図 1 に示した通り、膵液での解析と切除膵での検討は相関があり、膵液の解析を行うことで病理組織学的診断を推測しうる可能性があることを示した。

(2) EUS-FNA 検体での検討結果

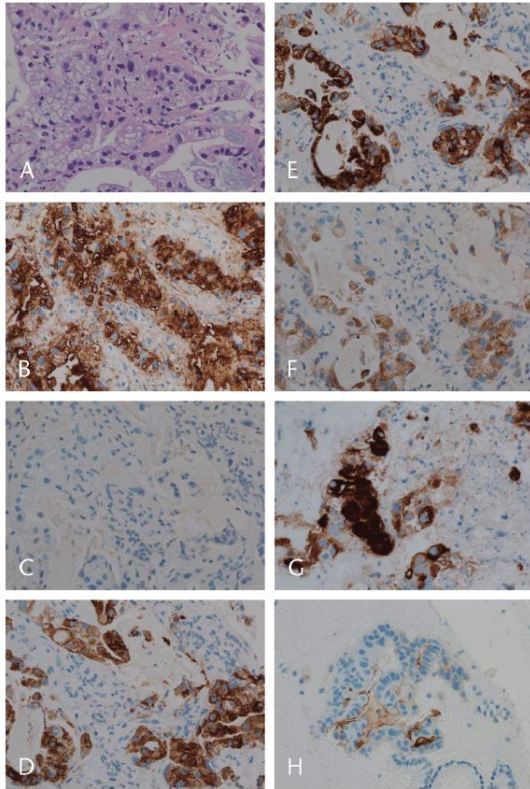


図 2 EUS-FNA 検体での免疫組織像

A. HE, B. MUC1, C. MUC2, D. MUC4, E. MUC5AC, F. MUC6, G. MUC16, 細胞質陽性例, H. MUC16, 細胞膜のみ陽性例

EUS-FNA 検体を用いて各ムチンコア蛋白に対する免疫染色を行った。図 2 に示すように、切除検体と同様の染色態度を示した。

また、免疫染色でのムチン発現と臨床病理学的事項との関連について検討した。図 3 に示すとおり、MUC1, MUC4, MUC5AC は早期の状態から高率に発現していた。MUC2 は殆ど発現が認められなかった。MUC6 は病期の進行と共に発現が減少し、MUC16/CA125 の特に細胞質陽性例は病期の進行とともに発現が増加していた。

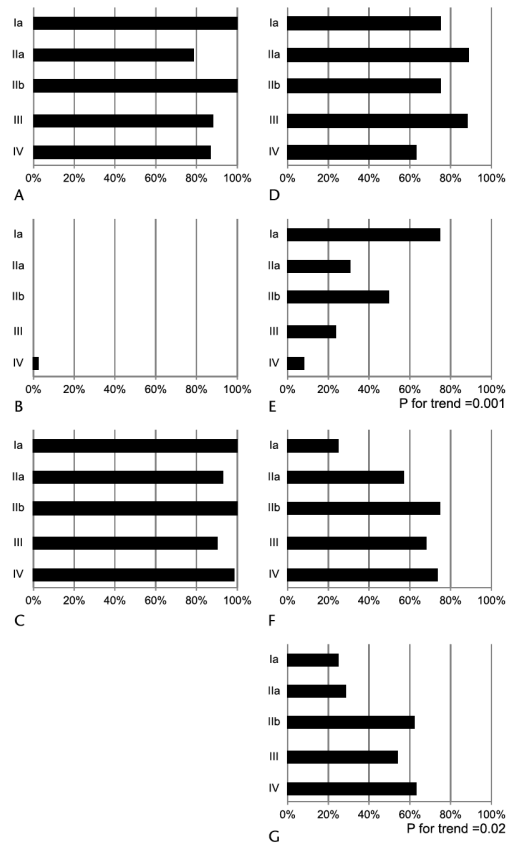


図 3 各病期におけるムチンコア蛋白の発現率

A. MUC1, B. MUC2, C. MUC4, D. MUC5AC, E. MUC6, F. MUC16 発現例 (細胞質と細胞膜双方), G. MUC16 細胞質発現例

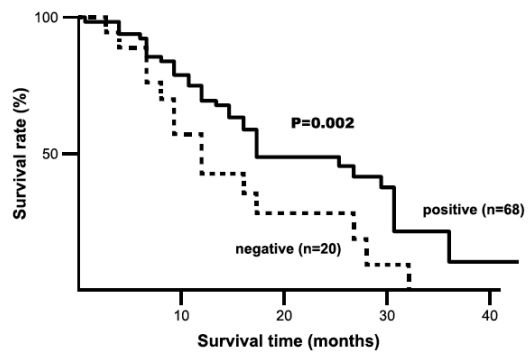


図 4 進行癌 (stage III と IV) における MUC5AC 発現の生存曲線

図 4 に示すとおり、浸潤性膵管癌から採取された EUS-FNA 検体の MUC5AC 発現群では予後が良好であった。



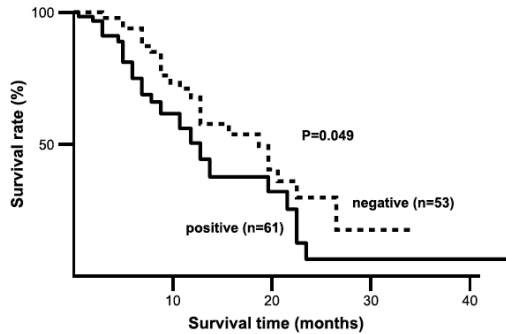


図5 全症例における MUC16 発現の生存曲線

浸潤性膵管癌から採取された EUS-FNA 検体で MUC16 が発現している症例では予後が不良であった。

以上、膵液あるいは EUS-FNA 検体といった術前検体によって、膵腫瘍の組織型や予後予測ができる可能性を示した。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 20 件)

Yokoyama S, Kitamoto S, Higashi M, Goto Y, Hara T, Ikebe D, et al. Diagnosis of pancreatic neoplasms using a novel method of DNA methylation analysis of mucin expression in pancreatic juice. *PLoS one*. 査読有、2014;9(4):e93760. DOI: 10.1371/journal.pone.0093760

Fukukura Y, Takumi K, Higashi M, Shinchi H, Kamimura K, Yoneyama T, et al. Contrast-enhanced CT and diffusion-weighted MR imaging: Performance as a prognostic factor in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Eur J Radiol*. 査読有、2014;83(4):612-9. DOI: 10.1016/j.ejrad.2013.12.016

米澤 傑, 東 美智代, 横山 勢也, 後藤 優, 北島 信一. 【胆膵共通疾患とトピックス】膵胆道腫瘍における MUC 発現. *病理と臨床*. 査読無, 2013;31 <http://search.jamas.or.jp/link/ui/2012322834>:399-408.

Kitazono I, Higashi M, Kitamoto S, Yokoyama S, Horinouchi M, Osako M, et al. Expression of MUC4 Mucin Is Observed Mainly in the Intestinal Type of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas. *Pancreas*. 査読有、2013;42(7):1120-8. DOI: 10.1097/MPA.0b013e3182965915

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*. 査読有、2013 26;32(39):4614-21.

DOI: 10.1038/onc.2012.478

Yokoyama S, Kitamoto S, Yamada N, Houjou I, Sugai T, Nakamura S, et al. The application of methylation specific electrophoresis (MSE) to DNA methylation analysis of the 5' CpG island of mucin in cancer cells. *BMC Cancer*. 査読有、2012;12:67

DOI: 1471-2407-12-67 [pii]

10.1186/1471-2407-12-67

Kitamoto S, Yokoyama S, Higashi M, Yamada N, Matsubara S, Takao S, et al. Expression of MUC17 is regulated by HIF1alpha-mediated hypoxic responses and requires a methylation-free hypoxia responsible element in pancreatic cancer. *PLoS one*. 査読有、2012;7(9):e44108.

DOI: 10.1371/journal.pone.0044108

Higashi M, Yamada N, Yokoyama S, Kitamoto S, Tabata K, Koriyama C, et al. Pathobiological Implications of MUC16/CA125 Expression in Intrahepatic Cholangiocarcinoma-Mass Forming Type. *Pathobiology*. 査読有、2012;79(2):101-6.

DOI: 000335164 [pii]

10.1159/000335164

〔学会発表〕(計 10 件)

東 美智代、他、EUS-FNA 検体を用いたムチン免疫染色有用性の検討、臨床細胞学会総会、2014 年 6 月 5 日-7 日、パシフィコ横浜(神奈川県)

米澤 傑、IPMN におけるムチン発現: 組織型との関連性について、千葉胆膵疾患講演会、2013 年 9 月 13 日、京成ホテルミラマール(千葉)

Michiyo Higashi, et al. Mucin expression in pancreatic ductal adenocarcinoma: Immunohistochemical examination in EUS-FNAB specimens. 25<sup>th</sup> European Congress of Pathology, 2013 年 8 月 31 日-9 月 3 日、Centro de Congressos de Lisboa (Portugal)

東 美智代、他、浸潤性膵管癌における EUS-FNAB でのムチン発現、日本病理学会総会、2013 年 6 月 6 日-8 日、ロイトン札幌(北海道)

東 美智代、他、胆道の前癌病変について 粘液形質の観点から、胆道学会、2012 年 9 月 20 日-21 日、京王プラザホテル(東京)

東 美智代、他、膵内分泌腫瘍における MUC17 発現の検討、日本病理学会総会、2012 年 4 月 26 日-28 日、京王プラザホテル(東京)

〔図書〕(計 1 件)

米澤傑、東美智代、医学書院、専門医のための  
の消化器病学第2版(小俣政男、千葉勉監修)、  
水腫瘍におけるムチンコア蛋白の分子病理  
(分担)、2013、642-645

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~byouri2/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

東 美智代 (HIGASHI MICHIO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准  
教授

研究者番号：60315405

### (2) 研究分担者

米澤 傑 (YONEZAWA SUGURU)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教  
授

研究者番号：1017502

横山 勢也 (YOKOYAMA SEIYA)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助  
教

研究者番号：20569941