

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591027

研究課題名(和文) EUS-FNAで採取した分枝膵管型IPMNの嚢胞内溶液のプロテオーム解析

研究課題名(英文) Proteomic analysis using fluid from IPMN

研究代表者

林 毅 (Hayashi, Tsuyoshi)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：60381258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：分枝膵管型IPMNの大多数は良性であり、発見時に切除されることは少ない。しかし、進行して膵癌になる症例が認められることが報告されている。しかし、現時点で癌化の危険因子が不明であることから、切除適応のない分枝型IPMNでは漫然と画像診断による経過観察が行われているのが現状である。そこで、病変の増大、進行および癌発生の指標となるようなバイオマーカーが同定できれば大変意義深い。本研究においてはEUS-FNAで得られたIPMN内溶液のプロテオーム解析を行い、癌発生予測が可能となるバイオマーカーを抽出する。その結果、糖鎖分子A、Bがバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) has been shown to develop pancreatic cancer. However, there is no available biomarker to predict incidence of malignant transformation in IPMN. We carried out proteome analysis using cystic fluid obtained by EUS-FNA to identify predictive biomarker. We found two candidates which significantly highly expressed in IPMN as well as advanced pancreatic cancer. We are planning to conduct clinical study to verify usefulness of predicating malignant transformation in IPMN as a biomarker.

研究分野：消化器

キーワード：IPMN 膵癌 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

分枝膵管型 IPMN の大多数は良性であり、発見時に切除されることは少ない。しかし、進行して膵癌になる症例が認められること(年率 0.45%)、また一見病変のない膵実質に膵癌が高頻度に発生すること(年率 1.1%)が報告されている。しかし、現時点で癌化の危険因子が不明であることから、切除適応のない分枝型 IPMN では漫然と画像診断による経過観察が行われているのが現状である。そこで、病変の増大、進行および癌発生の指標となるようなバイオマーカーが同定できれば大変意義深い。

2. 研究の目的

EUS-FNA は経消化管的に拡張した分枝膵管を容易に穿刺し膵管内の液体を採取することが可能である。本研究においては内溶液のプロテオーム解析を行い、診断時の良悪性鑑別診断並びに増大、進行および癌発生予測が可能となるバイオマーカーを抽出する。

3. 研究の方法

i). EUS-FNA: 初回発見時に分枝膵管型 IPMN を疑われ、インフォームドコンセントを行い同意が得られた症例で EUS-FNA を行う。基本的な手技は、膵腫瘍性病変で行う方法と変わらないが、手技の工夫として拡張分枝膵管内の嚢胞液を確実に採取するため(出血による血液の混入を防止するため)、初回は対側嚢胞壁に当たらないように穿刺し、拡張膵管の中心部で吸引を行う。一般的には 10ml で行う吸引を 50ml シリンジで行い、採取した内容を粘液と漿液状のものに分離し -80°C に保存する。引き続き、臨床情報として必須である病理学的検査のため、(1)膵浸潤が疑われる部位、(2)丈を有する腫瘍、(3)隔壁、(4)嚢胞壁の優先順位で穿刺針のストロークを行いながら吸引を行う。肉眼的に組織片と思われる検体の一部で擦り合わせスライドを作成し、on site での評価を行う。また同時に残りを細胞診、病理診断に用いる。

ii). 分枝膵管型 IPMN の初回検査後の臨床情報による分類: 臨床情報 (IPMN に由来する症状の確認)、画像診断、病理学的検査結果から下記の 5 つのグループに分類する。

A: 転移病巣を有する切除不能病変

B-1: 診療ガイドライン上の切除適応病変(有症状あるいは画像診断で癌の疑いあるいは病理学的検査で癌疑い) → 切除に同意

B-2: 診療ガイドライン上の切除適応病変 → 切除に不同意あるいは患者背景因子で切除不能

C: 診療ガイドライン上の経過観察病変

D: IPMN 以外の病変(粘液が証明されない、病理学的に他の腫瘍と診断)

iii). 嚢胞内容液のプロテオーム解析: 発見時の EUS-FNA、経過観察例では 1 年後の EUS-FNA で得られたサンプルを用いて既報

を参考に以下の方法でプロテオーム解析を行う。(1)EUS-FNA で採取した内容を速やかに -80°C に保存する。(2)サンプルを 140000 rpm, 15 分遠心し sludge を除去する。(3)protein assay kit を用いて蛋白濃度を測定し 100 μg を 1-dimensional 10% mini-gel で泳動後銀染を施行する。(4)各レーンを切り出し、water/acetonitrile 1:1 (v/v) で 2 回室温で 15 分間洗浄する。(5)100% acetonitrile に 5 分間浸す。(6)10 mM DTT を 100 mM ammonium bicarbonate に溶解した液体に 56°C, 45 分間浸して cytine を除去する。(7)55 mM iodoacetamide を含んだ 100 mM ammonium bicarbonate の溶液で室温暗所で 15 分間洗浄したのち 100% acetonitrile で脱水処理を行う。(8)12.5 ng/μl trypsin で酵素処理を行う。(9)同量の 50 mM ammonium bicarbonate で 37°C で一晩反応する。(10)上清を 5% formic acid で 5 分、その後同僚の 100% acetonitrile を加え 15 分間反応し、抽出作業を 2 回行う。乾燥後、10 μl の formic acid に溶解し LC-MS/MS で解析する。

iv). 検出されたバイオマーカー候補の妥当性の検討: 【外科切除例での検討】 当院で切除された分枝膵管型 IPMN の組織標本でも同様の解析を行い、EUS-FNA で得られたバイオマーカーが実際病変で発現しているか検討する。分枝膵管型に合致する画像所見を有する IPMN のうち、良性、上皮内癌、浸潤癌を各々数例選定し、免疫染色等により比較検討する。

4. 研究成果

1) 登録症例: 2012 年 07 月-2014 年 12 月までに 96 例(男女比: 46/50, 年齢: 中央値 70, (40-80) y, 占拠部位: 頭/体/尾=44/38/13, 嚢胞径: 中央値 26, (10-78) mm, 穿刺対象: 浸潤部/乳頭状病変/微小集簇/肥厚隔壁/対側嚢胞壁=3/28/17/26/22)) を登録した。

2) EUS-FNA: 穿刺回数は中央値 2 (1-4) 回、肉眼的に粘液は 71 例 (74%) で確認され、合併症として膵炎 5 例 (5.2%, うち重症 2 例) と膵液瘻 1 例 (1%) がみられた。診断に適した検体は 89 例 (92.7%) で得られ全例で免疫染色が施行可能であった。

3) 組織診断は IPMN 由来浸潤癌/非由来膵管癌/胃型 IPMN (うち高度異型)/腸型 IPMN (うち高度異型)/serouscyst adenoma/炎症性嚢胞/Schwanoma / 非悪性も確定診断不能=1/1/63(4)/4(1)/10/5/1/4 であった。このうち非 IPMN 由来膵管癌の 1 例が PanIN2 相当であり良性と、また胃型 IPMN の 5 例が IPMN 由来浸潤癌であり悪性と最終診断され、良悪性の正診率は 83/89 (93.3%) であった。

4) IPMN でのプロテオーム解析により、糖鎖関連分子 A, B がバイオマーカーの候補として表出した。IPMN における発現の検討は困難であったため、IPMN 由来膵癌組織における発現を preliminary に検討した (図 1)。

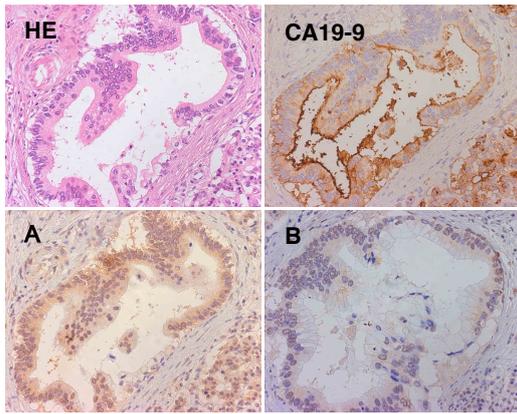


図1. IPMN由来膵癌組織における分子A, Bの発現

その結果, 糖鎖関連分子A, Bは腫瘍マーカーであるCA19-9が高値の症例において高い傾向が認められた(図2)。

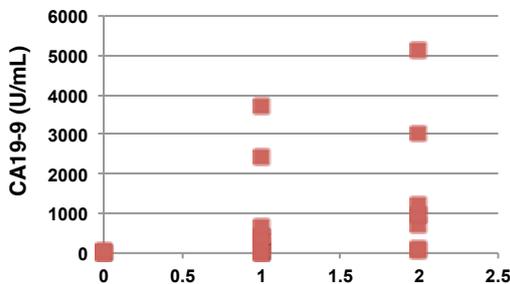


図2. 糖鎖関連分子の発現強度

更にこの結果を受けて, 当科で経験した膵癌症例と糖鎖関連分子の発現について retrospective に検討したところ, 図3に示すように陽性例において陰性例に比較し予後が有意に不良であった。

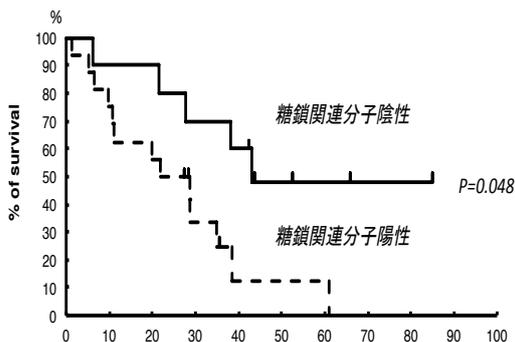


図3. IPMN由来膵癌組織における糖鎖関連分子発現と全生存率

今後, これらの分子の発現と発がん, 予後との関連性について研究を計画する予定である。

5. 主な発表論文等 (計15件)

1. Ishiwatari H, Hayashi T, Kato J, (他7名) Phase I trial of oral S-1 combined with hepatic arterial infusion of gemcitabine in unresectable biliary tract cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015 Apr;75(4):805-12.

doi:10.1007/s00280-015-2704-0.805-12. (査読あり)

2. Hoki T, Miyanishi K, Kato J, (他10名) Increased duodenal iron absorption through upregulation of DMT1 due to enhancement of IRP1 activity in patients with NASH. *Hepatology.* 2015. Mar 7.

doi:10.1002/hep.27774. (査読あり)

3. Sato Y, Hayashi T, Kato J, (他17名) A dose-escalation study of oxaliplatin/capecitabine/irinotecan (XELOXIRI) and bevacizumab as a first-line therapy for patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015 Mar;75(3):587-94. (査読あり)

4. Ishiwatari H, Hayashi T, Kato J, (他10名) EUS-guided celiac plexus neurolysis by using highly viscous phenol-glycerol as a neurolytic agent (with video). *Gastrointest Endosc.* 2015 Feb;81(2):479-83. (査読あり)

5. Tamura F, Hayashi T, Kato J, (他16名) RNAi-mediated gene silencing of ST6GalNAc I suppresses the metastatic potential in gastric cancer cells. *Gastric Cancer.* 2014 Dec 23. [Epub ahead of print] (査読あり)

6. Ishiwatari H, Hayashi T, Kato J (他10名) Phenol-based endoscopic ultrasound-guided celiac plexus neurolysis for East Asian alcohol-intolerant upper gastrointestinal cancer patients: a pilot study. *World J Gastroenterol.* 2014 Aug 14;20(30):10512-7. (査読あり)

7. Ono K, Hayashi T, Kato J, (他13名) A novel strategy inducing autophagic cell death in Burkitt's lymphoma cells with anti-CD19-targeted liposomal rapamycin. *Blood Cancer J.* 2014 Feb 7;4:e180. (査読あり)

8. Hirakawa M, Hayashi T, Kato J, (他12名) Fucosylated TGF- β receptors transduces a signal for epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *Br J Cancer.* 2014 Jan 7;110(1):156-63 (査読あり)

9. Tanaka S, Hayashi T, Kato J, (他8名) Increased hepatic oxidative DNA damage in patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 2013 Nov;48(11):1249-58. (査読あり)

10. Ishiwatari H, Kato J, (他15名) Treatment of pancreatic fibrosis with siRNA against a collagen-specific chaperone in vitamin A-coupled liposomes. *Gut.* 2013 Sep;62(9):1328-39. (査読あり)

11. Hayashi T, Ishiwatari H, Kato J, (他12名) Rapid on-site evaluation by endosonographer during endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration for pancreatic solid masses. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013 Apr;28(4):656-63. (査読あり)

12. Hirakawa M, Hayashi T, Kato J, (他20名). A phase II study of neoadjuvant combination

chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and S-1 for locally advanced resectable gastric cancer: nucleotide excision repair (NER) as potential chemoresistance marker. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013 Mar;71 (3): 789-97. (査読あり)

13. Hayashi T, Ishiwatari H, Kato J, (他 7 名)
A phase I trial of arterial infusion chemotherapy with gemcitabine and 5-fluorouracil for unresectable biliary tract cancer. *Int J Clin Oncol.* 2012 Oct;17(5):491-7. (査読あり)

14. Kikuchi S, Hayashi T, Kato J, (他 11 名)
Improvement of iron-mediated oxidative DNA damage in patients with transfusion-dependent myelodysplastic syndrome by treatment with deferasirox. *Free Radic Biol Med.* 2012 Aug 15;53(4):643-8. (査読あり)

15. Yoshida M, Takimoto R, Hayashi T, Kato J, (他 10 名)
Targeting anticancer drug delivery to pancreatic cancer cells using a fucose-bound nanoparticle approach. *PLoS One.* 2012;7(7):e39545. (査読あり)

[産業財産権]

□出願状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 毅 (hayashi,Tsuyoshi)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：60381258

(2)研究分担者

加藤 淳二 (kato, Junji)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：20244345

石渡 裕俊 (Ishiwatari,Hirotoishi)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：90468083