

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790355

研究課題名(和文)胆道癌の予後改善に向けた新規診断マーカー候補クロードインとマスピンの発現解析

研究課題名(英文)Expression analysis of new diagnostic marker candidate claudin and the mass pin towards the prognosis improvement of a biliary tract cancer

研究代表者

高澤 啓 (AKIRA, TAKASAWA)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：00593021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：胆道癌材料を用いたclaudin-18, maspin, p53の免疫染色を行い、その評価を行った。その結果、いずれの交代も腫瘍部での良好な染色性を示した。3抗体の組み合わせで腫瘍・非腫瘍を判別可能であることが確認された。胆道癌細胞株を用いた実験では、claudin-18が増殖・浸潤に関するシグナル伝達系で調節を受けている事、その発現が細胞株の増殖能、浸潤能に関与している可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：We exam the expression of claudin-18, maspin and p53 in biliary tract cancers, and benign biliary epithelium using immunohistochemistry and complex statistical analysis.e found that the above panel was sensitive and specific for differentiating in situ and invasive lesions from reactive biliary epithelium. In biliary cancer cell-lines, gene knockdown of claudin-18 suppressed tumorigenicity, invasive capability and tumor-initiation of cancer cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：クロードイン マスピン 胆道癌

1. 研究開始当初の背景

日本における胆道癌(胆嚢癌・肝内胆管癌・肝外胆管癌・乳頭部癌)の年間罹患患者は1.8万人、年間死亡者数は1.6万人、部位別がん死亡数では国内6番目である。胆道癌は発生頻度が低い癌であったが、日本を含む先進国では増加傾向にある。その罹患数と死亡数はほぼ同数であり、膵癌と並びきわめて予後不良な癌腫である。しかも、この30年間で治療成績に大きな改善は得られていない。外科的な完全切除が重要な予後因子であることから、少量かつ artifact の加わった生検材料による早期診断の精度が更に向上することが望まれており、診断・治療に寄与する胆道癌に特異的な診断マーカーの確立は急務かつ最重要課題である。本研究ではその有力候補として claudin-18 および maspin の解析を行う。

膜貫通タンパク質 claudin は、上皮系細胞間に形成されるタイト結合関連タンパク質であり、細胞間隙の物質透過性制御(バリア機能)や細胞極性維持(フェンス機能)、シグナル伝達や受容体としての機能を担い、上皮組織固有の生理機能に極めて重要な分子である。近年、膵癌手術材料の網羅的解析により、claudin-18 が上皮内腫瘍性病変を含め膵癌の診断マーカーおよび予後因子となりうる事が報告された(Am J Surg Pathol, 2008;32:188-196)。申請者らは、以前よりタイト結合に注目した解析を進めており、ヒト膵癌細胞株およびヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)遺伝子導入正常膵管細胞を用いた claudin-18 の発現調節機構について報告した(業績4)。最近では、申請者と Kuopio 大学(Finland)の Y. Soini 教授が行った膵癌手術材料および生検材料を用いた共同研究から、claudin-18 が診断感度・特異度ともに高く、膵癌細胞のマーカーとなりうることを確認した。申請者は膵臓と器官発生の部位が近接する

正常胆管上皮および胆管癌においても、claudin-18 は同様の発現調節を受けている可能性が高いと考えた。予備的検討として、肝内・肝外胆管癌で claudin-18 免疫染色を行い、選択性高く病変部が陽性になる事を複数症例で確認した。2011年に他のグループから胆管癌において claudin-18 が陽性となるとの報告がなされた(Virchows Arch, 2011;459:73-80)が、腫瘍性病変を主体とした検討であり、臨床上重要となる正常上皮や炎症性変化との比較、生検材料を用いた有用性の検討はいまだ十分とは言えない。

近年、Mammary specific serpin(以下 maspin)の免疫染色が膵癌の診断に有用であることが報告され(Clin Cancer Res 2001;7:812-817)、一部施設では実診療で診断補助にも利用されている。胆道癌生検材料でも、診断に苦慮する場面では、maspin の免疫染色が行われる事がある。しかし、胆道癌における maspin の染色態度を評価した報告はごく少数であり、生検材料を用い診断マーカーとしての有用性を検討している研究は、現在まで報告されていない。maspin は、正常乳腺上皮で同定された serpin family に属する serine protease inhibitor で、細胞質および核内に存在する。発現は乳腺に特異的ではなく、乳癌・大腸癌・前立腺癌などでは、maspin が核内に存在することで、浸潤・転移を抑制することが明らかとなっている。胆道癌においても局在と腫瘍の性質に関連があることが示唆されるが、未報告である。

2. 研究の目的

これまでの背景と申請者らの研究成果を踏まえ、本研究では

- 胆道癌手術材料における claudin-18、maspin および他の診断マーカー候補の免疫染色を行い、局在を含む発現様

式・態度を解析することで、診断マーカーとしての有用性を評価する。また、両者をパネルとして併用した場合の有用性についても評価する。

- ・ ヒト正常胆嚢上皮細胞培養法を確立し、正常上皮細胞と胆道癌細胞株における claudin-18、maspin の発現調節機構の解析を行う。更にさまざまな条件下で、正常上皮細胞と癌細胞の細胞遊走能・浸潤能・増殖能・造腫瘍能・転移能の変化を比較検討することにより、claudin-18、maspin の発癌および癌悪性化への関与について明らかにする。
- ・ 胆道癌生検材料に対して、claudin-18、maspin の免疫染色を行い、発現様式・態度を解析する。生検材料・手術材料を症例ごとに対応させて、診断マーカーとしての妥当性、予後予測因子としての有用性を評価する。

以上によって、胆道癌の診断精度の更なる向上に貢献し、予後改善に寄与する事を目的とした。

3 . 研究の方法

(1) 手術材料・生検材料を用いた免疫組織化学的検討

- ・ 胆嚢癌、肝内・肝外胆管癌の手術症例を集め、claudin-18、maspin、p53の免疫染色を行い、腫瘍・非腫瘍それぞれについて陽性強度・面積をスコア化する。特に、炎症反応が高度な領域を含む非腫瘍成分と上皮内腫瘍性病変(Bi IIN)を含む腫瘍成分に注目し、両者間での差異を検討する。
- ・ 正常上皮での免疫染色の結果と比較し、得られる感度・特異度から診断マーカーとしての有用性、他の診断マーカーと比較した優位性を明らかにする。claudin-18、maspinをパネルとして併用した場合の有用性についても評価する。

(2) 各種胆道癌細胞株における

claudin-18、maspinの発現比較、発現調節機構の解析

- ・ 癌細胞株を各種サイトカインや増殖因子、物理的ストレス負荷などで刺激し、claudin-18、maspin の発現誘導または抑制に関与する物質・刺激を検索する。

(3) claudin-18 の発癌過程、癌悪性化への関与の解析

- ・ claudin-18、maspin をsiRNAによるノックダウンあるいは発現ベクターによる強制高発現系を用い、発癌過程や癌悪性化への関与を解析する。ヌードマウスを用いた *in vivo* 造腫瘍能・転移能の変化を解析する。

4 . 研究成果

(1) 手術材料・生検材料を用いた免疫組織化学的検討

胆道癌切除材料を用いてclaudin-18、maspin、p53の免疫染色を実施した。いずれの抗体も腫瘍部での良好な染色性を示した。3種の抗体を組み合わせることで、感度、特異度ともに高く、腫瘍・非腫瘍を判別可能であることが確認された。更に、claudin-18とmaspinの二重免疫染色を実施した。二重免疫染色は腫瘍/非腫瘍の鑑別方法として

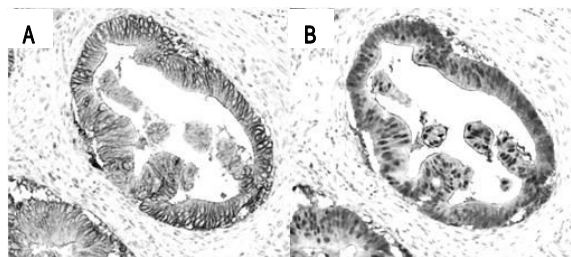


図 1. 肝外胆管癌の浸潤部。(A)claudin-18 免疫染色では細胞膜に強陽性、(B)maspin 免疫染色では核・細胞質に強陽性となる。

有用である可能性が示唆された。

(2) 胆道癌細胞株での各種刺激における claudin-18、maspinの発現変化を検討した。maspinは各種刺激に対して、顕著な発現変

化は確認されなかった。claudin-18はEGF, TFG 等により著明な発現増加が確認された。また、DNAの脱メチル化剤処置により、claudin-18の発現は増加した。maspinに変化は見られなかった。阻害剤による実験では、claudin-18の発現調節には ERK1/2の活性化の関与が示唆された。

(3) claudin-18 の発癌過程、癌悪性化への関与の解析

Claudin-18 のノックダウンにより、細胞株における増殖能、浸潤能が抑制される事を確認された。また、ヌードマウスを用いた *in vivo* 造腫瘍能を確認したところ、claudin-18 のノックダウンにより造腫瘍能が抑制される事を確認した。

<まとめ>

本研究により、claudin-18, maspin, p53 を併用することで、感度、特異度ともに高く、胆道上皮と胆道癌が判別可能であることが明らかとなった。更に症例を加えて診断への有用性を確認する予定である。また、胆道癌細胞株の実験において、claudin-18 が増殖能などに関与することが示唆された。今後は、その調節機構や claudin-18 を標的とした増殖抑制の可能性などについて検討していく予定である。

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 12 件)

1. Sugimoto K, Takasawa A, Shingo Ichimiya, Masaki Murata, Hiromichi Kimura, Johan JP Gille, Naoto Kuroda, Hiroshi Shimizu, Tadashi Hasegawa, Norimasa Sawada, Mitsuko Furuya and Yoji Nagashima. Multifocal and microscopic chromophobe renal cell carcinomatous lesions associated with “capsulomas” without *FCLN* gene abnormality. *Pathol Int*, (査読あり) 63(10), 510-515, 2013. doi: 10.1111/pin.12099.
2. Obata K, Kojima T, Masaki T, Okabayashi T, Yokota S, Hirakawa S, Nomura K, Takasawa A, Murata M, Tanaka S, Fuchimoto J, Fujii N, Tsutsumi H, Himi T, Sawada N. Curcumin prevents replication of respiratory syncytial virus and the epithelial responses to it in human nasal epithelial cells. *PLoS One*. (査読あり) 8(9), e70225, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0070225.
3. Someya M, Kojima T, Ogawa M, Ninomiya T, Nomura K, Takasawa A, Murata M, Tanaka S, Saito T, Sawada N. Regulation of tight junctions by sex hormones in normal human endometrial epithelial cells and uterus cancer cell line Sawano. *Cell Tissue Res*. (査読あり) 354(2), 481-494, 2013. doi: 10.1007/s00441-013-1676-9.
4. Eto K, Kawakami H, Kuwatani M, Kudo T, Abe Y, Kawahata S, Takasawa A, Fukuoka M, Matsuno Y, Asaka M, Sakamoto N. Human equilibrative nucleoside transporter 1 and Notch 3 can predict gemcitabine effects in patients with unresectable pancreatic cancer. *Br J Cancer*. (査読あり) 108(7), 1488-1494, 2013. doi: 10.1038/bjc.2013.108.
5. Kojima Y, Takasawa A, Murata M, Akagashi K, Inoue T, Hara M, Tokunaga Y, Minase T, Hasegawa T, Sawada N. A case of urothelial carcinoma, lipid cell variant. *Pathol Int*. (査読あり) 63(3), 183-187, 2013. doi: 10.1111/pin.12027.
6. Kyuno D, Kojima T, Yamaguchi H, Ito T, Kimura Y, Imamura M, Takasawa A, Murata M, Tanaka S, Hirata K, Sawada N. Protein kinase C inhibitor protects against downregulation of claudin-1 during epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer. *Carcinogenesis*. (査読あり) 34(6), 1232-1243, 2013. doi: 10.1093/carcin/bgt057.
7. Takasawa A, Kojima T, Ninomiya T, Tsujiwaki M, Murata M, Tanaka S, Sawada N. Behavior of tricellulin during destruction and formation of tight junctions under various extracellular calcium conditions. *Cell Tissue Res*. (査読あり) 351(1), 73-84, 2013. doi: 10.1007/s00441-012-1512-7.
8. Tsukahara T, Takasawa A, Murata M, Okumura K, Nakayama M, Sato N, Hasegawa T. NK/T-cell lymphoma of bilateral adrenal glands in a patient with pyothorax. *Diagn Pathol*. (査読あり) 7, 114, 2012. doi: 10.1186/1746-1596-7-114.
9. Soini Y, Takasawa A, Eskelinen M, Juvonen P, Kärjä V, Hasegawa T, Murata M, Tanaka S, Kojima T, Sawada N. Expression of claudins 7 and 18 in pancreatic ductal adenocarcinoma: association with features

- of differentiation. *J Clin Pathol.* (査読あり) 65(5), 431-436, 2012. doi: 10.1186/1746-1596-7-114.
10. Tanaka S, Takasawa A, Fukasawa Y, Hasegawa T, Sawada N. An undifferentiated embryonal sarcoma of the liver containing adipophilin-positive vesicles in an adult with massive sinusoidal invasion. *Int J Clin Exp Pathol.* (査読あり) 5(8), 824-829, 2012.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Tanaka+S%2C+Takasawa+A%2C+Fukasawa+Y%2C+Hasegawa+T%2C+Sawada+N>.
11. Maeda T, Murata M, Chiba H, Takasawa A, Tanaka S, Kojima T, Masumori N, Tsukamoto T, Sawada N. Claudin-4-targeted therapy using *Clostridium perfringens* enterotoxin for prostate cancer. *Prostate.* (査読あり), 72(4): 351-60, 2012. doi: 10.1002/pros.21436.
12. Ogawa M, Kojima T, Someya M, Nomura K, Takasawa A, Murata M, Tanaka S, Saito T, Sawada N. Epidermal growth factor modulates claudins and tight junctional functions in ovarian cancer cell lines. *Histochem Cell Biol.* (査読あり), 138(2):323-338, 2012. doi: 10.1007/s00418-012-0956-x.

[学会発表](計1件)

1. 高澤啓 他：胆道癌における claudin-18 maspin の免疫組織学的検討. 第101回日本病理学会総会 平成24年4月26-28日 東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

高澤 啓 (AKIRA TAKASAWA)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：24790355