

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790359

研究課題名(和文) プロテオミクス解析による慢性胆嚢炎からの胆嚢発癌経路の解明：特発性癌との比較

研究課題名(英文) Proteomic analysis of human bile from chronic cholecystitis and gallbladder cancer

研究代表者

柳澤 信之 (Yanagisawa, Nobuyuki)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：80337914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：胆嚢炎症例160例、胆管癌33例、胆嚢癌7例と、膵胆管合流異常症2例、胆嚢腺腫4例の胆汁・非腫瘍部胆嚢粘膜の新鮮凍結材料を収集した。胆汁のプロテオーム解析について二次元電気泳動法を用いて解析したが分離スポット数が少なくまた泳動結果も不良であった。一部のスポットについてMS解析を行ったところ、有用な結果が得られなかった。そこで胆汁前処理とタンパク抽出法について再検討を行いつつ、LC-MS解析法への手技変更を進めた。

LC-MS法で胆汁の正常コントロール例・胆嚢炎・胆嚢癌症例の少数例での解析を行ったところ、胆嚢癌でのみ検出されたタンパクを8種、胆嚢癌では検出されなかったタンパクを11種類同定した。

研究成果の概要(英文)：The bile and tissue samples including 160 cases of chronic cholecystitis, 33 cases of bile duct carcinomas, 7 cases of gallbladder carcinomas, 2 cases of pancreaticobiliary malformations and 4 cases of gallbladder adenomas were collected. Using LC-MS analysis, 8 proteins were detected only in gallbladder cancer, and 11 proteins were not detected in gallbladder cancer.

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：慢性胆嚢炎 プロテオーム 胆嚢発癌

1. 研究開始当初の背景

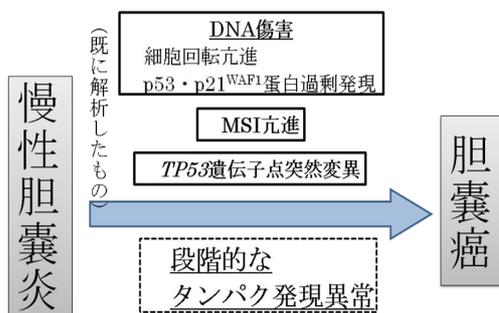
(1) 非ステロイド系抗炎症薬の長期服用患者には顕著に大腸癌・膵癌の発生が少ないという疫学的研究報告や、*H.pylori* 関連胃炎と胃癌、潰瘍性大腸炎(UC)と大腸癌といった慢性臓器炎からの発癌経路の存在が示唆されており(岡安・柳澤ら、病理と臨床 1999)、慢性炎症における発癌機構の解明が臨床的に強く要望されている。

(2) 胆嚢発癌経路は現在、胆嚢良性腫瘍(腺腫)からの経路 膵胆管合流異常による粘膜過形成を介した経路 遷延した慢性胆嚢炎からの経路あるいは de novo 発癌経路 が提唱されているが、完全には解明されておらず未だに混沌としている。しかし胆嚢癌の背景粘膜には慢性胆嚢炎を伴っている事が多く、実際当施設での胆嚢癌症例では約 90%に背景粘膜の慢性炎症を認めた。

胆嚢発癌経路

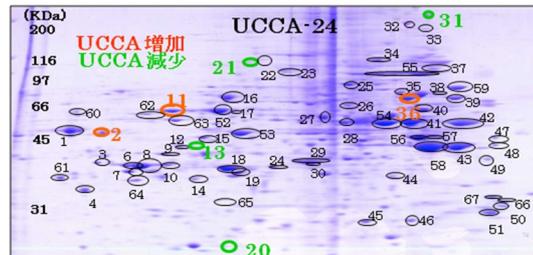
- ① 胆嚢腺腫の癌化
- ② 膵胆管合流異常による粘膜過形成
- ③ 遷延した慢性胆嚢炎
- ④ de novo 発癌

現在まで我々が得てきた成果として、高度な炎症性胆嚢粘膜では上皮細胞の p53・p21WAF1 蛋白の過剰発現、apoptosis・細胞増殖能の亢進が生じている事から、高度な炎症性胆嚢粘膜でも既に胆嚢上皮細胞の DNA 傷害があり、microsatellite instability (MSI) の亢進もみられる事が判明した (Yanagisawa N. et al., *Histopathology*, 2000, *Am.J.Clin.Pathol.*, 2003)。また胆汁上清スクリーニングの結果、非腫瘍性胆嚢粘膜においても少数 (2%, 7/294) ながら TP53 遺伝子の hot spot 以外を主体とした散発性 transition 型点突然変異を確認した (Yanagisawa N. et al. *Anticancer Res.*, 2010)。さらに大腸腫瘍と異なり、胆嚢腺腫 - 癌の経路は稀である事を β -catenin 遺伝子異常から示した (Yanagisawa N. et al. *Cancer Res.*, 2001)。従って多くの胆嚢癌では「慢性胆嚢炎 - 胆嚢癌連関」であることがつよく示唆できることを遺伝子異常の観点から指摘してきた。



(3) 一方、我々はプロテオミクス解析法を用いて、慢性炎症発癌の代表的モデルである UC の関連癌細胞株において強い発現を示したコラーゲン特異的分子シャペロンである HSP47 を同定した (Araki K. et al., *Br.J.Cancer*, 2009)。

図: UC 関連細胞株(UCCA-24)の抽出タンパクの二次元電気泳動 孤発型大腸癌に比べ発現増加を示したタンパク 3 種 (スポット 2,11,36) 発現低下を示したタンパク 4 種 (スポット 13,20,21,31) を同定した。



2. 研究の目的

そこで、胆嚢癌及びその背景粘膜の他、膵胆管合流異常や胆石胆嚢炎といった発癌リスク症例のヒト胆嚢手術材料及び対応した胆汁の未固定凍結材料を用いて、

(1) プロテオミクス解析を行い、胆嚢発癌経路におけるタンパク異常の段階的变化について明らかにする。また診断の難しい胆嚢癌を検出するタンパクマーカーを抽出する。

(2) 同定されたタンパクについて real time RT-PCR による mRNA 発現を確認する。

(3) 免疫組織化学的に組織切片上でタンパク発現・局在を確認する。

(4) 炎症の程度との関連性の検討・臨床病理学的因子 (年齢性別、胆石の有無など) との相関の検討を行い、遺伝子異常に加えてタンパク発現の異常を検出することで現在までとは別の観点から我々の知見を補充して「慢性胆嚢炎における酸化的ストレス - 遺伝子不安定の亢進 - 遺伝子異常の蓄積 - タンパクの発現異常 - 癌化」という発癌機構を証明する。

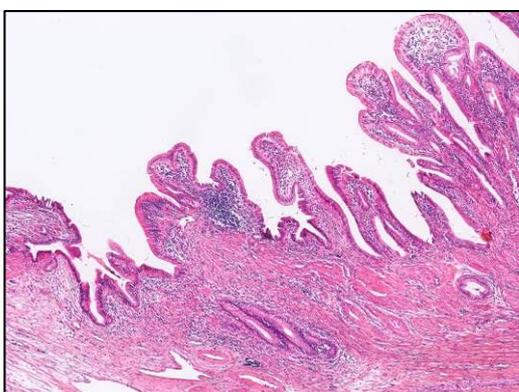
3. 研究の方法

当施設で外科的切除された胆嚢手術材料から、慢性胆嚢炎 (Yanagisawa の Inflammatory Score 改 2 ~ 3 に相当するもの) 20 症例、胆嚢癌及びその背景粘膜 20 症例 (炎症の有無で分類)、胆道発癌に関連すると言われている膵胆管合流異常 10 症例、比較対照として炎症のない胆嚢粘膜 10 症例 (Inflammatory Score 改 0 に相当するもの) 計 60 例について胆嚢粘膜及び対応した胆汁の未固定凍結材料を用いて、以下のように研究を遂行した。

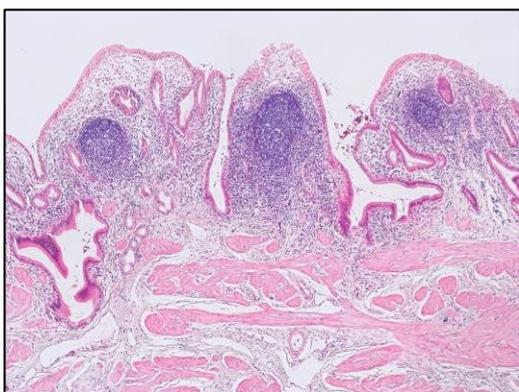
(1) 収集された症例について、ホルマリン固定パラフィン切片による病理学的診断を行い、さらに炎症の程度を Yanagisawa の Inflammatory Score (IS) を用いて 0~3 の 4 段階に分類した。



IS0 相当 (正常コントロール) の胆嚢粘膜



IS2 相当 (軽度慢性胆嚢炎) の胆嚢粘膜



IS3 相当 (高度慢性胆嚢炎) の胆嚢粘膜 (HE 染色、40 倍)

(2) 二次元電気泳動法を用いたプロテオミクス解析

胆嚢未固定凍結材料・胆汁よりタンパクを抽出精製し、二次元電気泳動を行い、タンパクを分離した。

得られたゲルスポットの染色性を、NIH イメージ画像解析ソフトを用いて定量化した。

発現量の変化がみられたゲルスポットを切り出し、トリプシン処理・ペプチド断片の抽出を行った。

抽出したサンプルを質量分析計 (Shiseido SI-2/ESI-ITMS; Thermo LCQ^{DECA}) で解析し、データベース検索を行い、タンパク質の同定を

した。

4. 研究成果

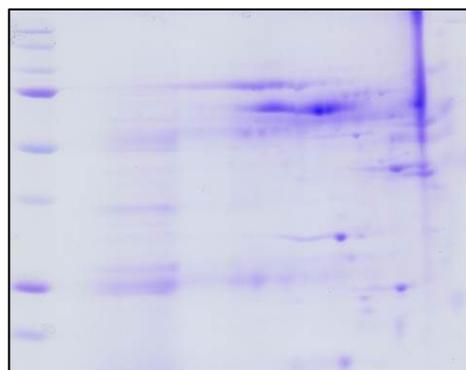
平成 25 年度までに種々の程度の胆嚢炎症例 160 例、胆管癌 33 例、胆嚢癌 7 例と、前癌病変である膵胆管合流異常症 2 例、胆嚢腺腫 4 例の胆汁・非腫瘍部胆嚢粘膜の新鮮凍結材料を収集した。一部の症例については腫瘍部の新鮮凍結材料も採取できた。

胆嚢粘膜の炎症の程度が評価できたものでは IS0 : 65 例、IS1 : 79 例、IS2 : 24 例、IS3 : 5 例となった。

胆汁のプロテオーム解析について、当初は Araki らの大腸粘膜新鮮凍結組織と同じ二次元電気泳動法を用いて解析を進める予定であったが、同方法 (CBB 染色) では分離スポット数が少なくまた泳動結果も不良であった (下図)。サンプル前処理法変更やより検出力の高い銀染色への変更も試し、検出数は増加したものの分離は依然として不良であった。一部のスポットについてゲル内消化後 MS 解析を行ったところ、albumin 断片などが多く、有用な結果が得られなかった。

図 1 正常コントロール胆嚢 (IS0) 症例の胆汁の二次元電気泳動結果の例

症例 CBB 染色法



検出スポット数が少ない。

症例 銀染色法



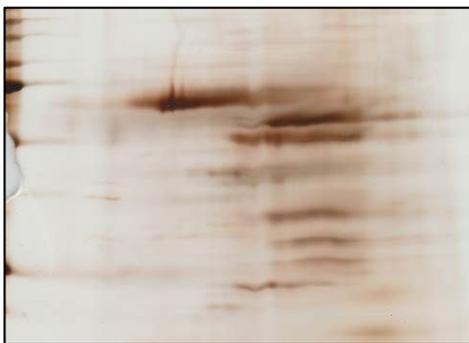
CBB 染色 (上) と比較し検出スポット数は増加したが、分離が悪い。

症例 CBB 染色法



検出されるスポット数は著しく少ない。

症例 銀染色法



検出スポットは著増したが、やはり分離は不良。

図 2 胆管癌症例の胆汁の二次元電気泳動結果の例



正常コントロール症例（図 1）と異なる泳動パターンがみられる。

図 1・2ともスポットの分離が悪く、また一部のスポットの MS 解析では有意なタンパクが同定できなかった。

そこで胆汁前処理とタンパク抽出法について再検討を行いつつ、LC-MS 解析法への手技変更を進めた。検討の結果、前処理には使用していた 2D Clean-up kit（GE ヘルスケア ジャパン）の代わりに脂質除去剤の使用と体腔液用タンパク抽出法を新たに採用し、

LC-MS 解析に持ち込むこととした。

LC-MS 法で胆汁の正常コントロール例（IS0）・胆嚢炎（IS2～3）・胆嚢癌症例の少数例での解析を行ったところ、胆嚢癌でのみ検出されたタンパクを 8 種、胆嚢癌では検出されなかったタンパクを 11 種類同定した。引き続き解析を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳澤 信之 (YANAGISAWA NOBUYUKI)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：80337914