

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 30 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460426

研究課題名(和文)胆汁ショットガン・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

研究課題名(英文)Proteomic analysis of bile

研究代表者

柳澤 信之 (Yanagisawa, Nobuyuki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80337914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：複数回のLC-MS解析結果を1つにまとめ、検出ペプチド数1000以上の例について絞り検討したところ、最終的に正常コントロール4例・胆嚢炎7例・胆石症(炎症なし)2例・胆嚢adenoma1例・膵胆管合流異常症1・胆嚢癌6例(うち4例は2回ずつ解析)、計25例となり、同定した総タンパク数は3762種類となった。そのうち胆嚢癌でのみ検出されたタンパクは42種類(2例以上。3例以上は9種類)、adenomaのみは53種類、膵胆管合流異常症のみは39種類で、胆嚢炎・胆嚢癌で検出されたタンパクは計217種類であった。現在ウェスタンブロットティング・免疫染色で発現を確認中である。

研究成果の概要(英文)：The bile and tissue samples including 204 cases of chronic cholecystitis, 30 cases of bile duct carcinomas, 15 cases of gallbladder carcinomas, 5 cases of pancreaticobiliary malformations and 4 cases of gallbladder adenomas were collected. Using LC-MS analysis, 42 proteins were detected only in gallbladder cancer, 53 proteins in gallbladder adenoma, 39 proteins in pancreaticobiliary malformation and 217 proteins both in cholecystitis and gallbladder cancer.

研究分野：人体病理学

キーワード：胆嚢癌 胆嚢炎 発癌 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

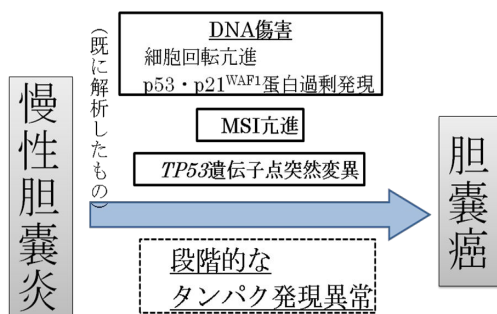
(1) 非ステロイド系抗炎症薬の長期服用患者には顕著に大腸癌・膵癌の発生が少ないという疫学的研究報告や、*H.pylori* 関連胃炎と胃癌、潰瘍性大腸炎(UC)と大腸癌といった慢性臓器炎からの発癌経路の存在が示唆されており(岡安・柳澤ら、病理と臨床 1999)、慢性炎症における発癌機構の解明が臨床的に強く要望されている。

(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

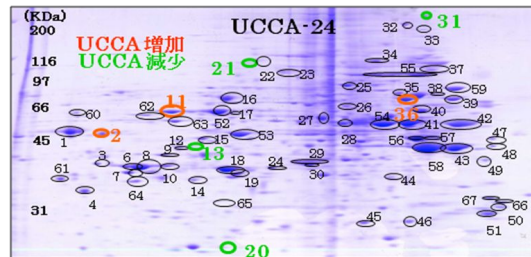
- ① 胆嚢腺腫の癌化
- ② 膵胆管合流異常による粘膜過形成
- ③ 遷延した慢性胆嚢炎
- ④ de novo 発癌

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  $\beta$ -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。

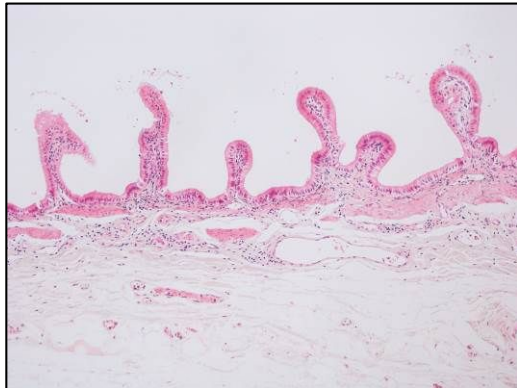
3. 研究の方法

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 2 ~ 3 に相当するもの) 20 症例、胆嚢癌及びその背景粘膜 10 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 3 症例、比較対照として炎症のない胆嚢粘膜 10 症例 (Inflammatory Score 1 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。

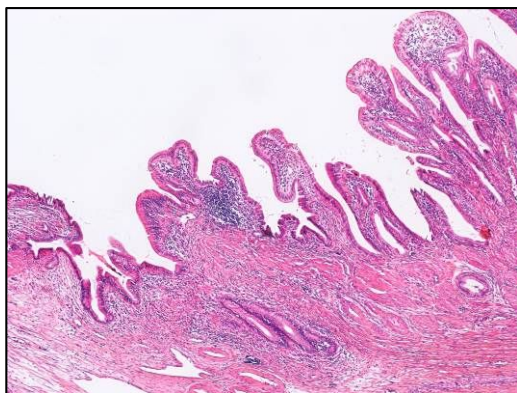
(1) 収集された症例について、ホルマリン

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) 改を用いて 0~3 の 4 段階に分類した。

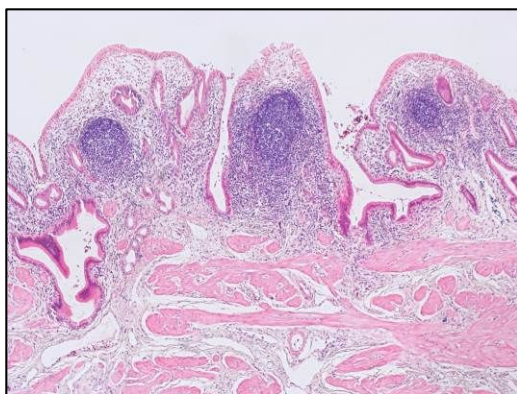
図 IS1 相当 (正常コントロール) の胆嚢粘膜



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) ショットガン・プロテオミクス解析  
理学部附属疾患プロテオミクスセンターの協力のもと、ショットガン・プロテオミクス法を用いた LC-MS 解析 (EASY-nLC 1000/Q Exactive, Thermo Scientific 社) によるタンパク同定を行った。

胆嚢未固定凍結材料・胆汁よりタンパクを抽出精製。

Lys-C・トリプシン酵素処理後、5% TFA/H2O で酸沈。

サンプルを C18 逆相カラムに通す。

精製したサンプルを freeze dry し、ACN 処理後に LC-MS 解析を行った。

同定されたタンパクについて、各疾患群

別に比較し検討した。

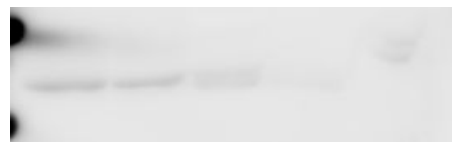
#### 4. 研究成果

平成 28 年度までの期間において、種々の胆嚢炎症例 (正常コントロールを含む) 204 例と胆嚢癌 30 例、胆嚢癌 15 例、膵胆管合流異常症 5 例、胆嚢 adenoma 4 例の胆汁・胆嚢粘膜 (31 歳~87 歳) 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出来た。胆汁サンプルのタンパク抽出調製については、症例間での胆汁の性質 (色調・粘調性) にかかなりの多様性がみられ、実際にタンパク濃度にも大きく差があった。従って LC-MS 用の胆汁サンプルの調整法について、最適と思われる方法を検討した。複数回の LC-MS 解析結果を 1 つにまとめ、検出ペプチド数 1000 以上の例について絞り検討したところ、最終的に正常コントロール 4 例・胆嚢炎 7 例・胆石症 (炎症なし) 2 例・胆嚢 adenoma 1 例・膵胆管合流異常症 1 例・胆嚢癌 6 例 (うち 4 例は 2 回ずつ解析) 計 25 例となり、同定した総タンパク数は 3762 種類となった。そのうち胆嚢癌でのみ検出されたタンパクは 42 種類 (2 例以上、3 例以上は 9 種類)、adenoma のみは 53 種類、膵胆管合流異常症のみは 39 種類で、胆嚢炎・胆嚢癌で検出されたタンパクは計 217 種類であった。これらの中で、特異的抗体のある興味深いタンパク計 9 種類を選定しウエスタンブロッティングで発現確認を試みた。

胆汁から抽出したタンパクを濃度計測し、10µg 量を用いたウエスタンブロッティングでは注目したマーカーにおいて明瞭な目的バンドが検出出来なかった。コントロールとしての Beta-actin についても検出が困難であったため、解析方法間の検出感度差に加え胆汁中タンパクの高度変性・分解状態が想定された。現在免疫沈降によるタンパク濃縮後検体での検討を考慮するとともに、新鮮凍結組織から抽出したタンパクについてウエスタンブロッティングを行っている。

図: 胆汁サンプルのウエスタンブロッティングによる Beta-actin の検出結果

Case 1 2 3 4 5



バンドが一部検出されているが非常に弱い。

図: 胆嚢癌サンプルのウエスタンブロッティングによるタンパク A の検出結果

Case1 2 3 4 5 6 7



多くの症例で発現が確認された。

図：胆嚢癌サンプルのウエスタンブロッティングによるタンパク B の検出結果

Case 1 2 3 4 5 6 7



一部の症例で発現が確認された。

#### 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 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)  
聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：80337914

##### (2) 研究分担者

村雲 芳樹 (MURAKUMO YOSHIKI)  
北里大学・医学部・教授  
研究者番号：40324438

##### (3) 連携研究者

小寺 義男 (KODERA YOSHIO)  
北里大学・理学部・准教授  
研究者番号：60265733