

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06482

研究課題名(和文)膵癌早期発見を目指した十二指腸液中S100タンパク質ファミリーの解析

研究課題名(英文) Analysis of S100 family proteins in duodenal juice as a diagnostic marker of pancreatic ductal adenocarcinoma.

研究代表者

森 泰寿 (MORI, Yasuhisa)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：50632642

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)：ELISA kitを用いて膵疾患群およびコントロール群の十二指腸液中のS100A2、S100A4、S100A6、S100A11、Glypican-1濃度を測定した。S100A2は全例検出下限以下であった。S100A4はコントロール群の濃度が高い傾向にあったが、有意差は認めなかった。S100A6・S100A11はそれぞれの疾患群およびコントロール群間で有意差は認めなかった。Glypican-1は膵癌群 vs 膵IPMN群で有意差を認め、膵IPMN由来癌または膵IPMN併存癌の早期発見に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：S100A2, S100A4, S100A6, S100A11, and glypican-1 concentrations in duodenal juice were measured using a ELISA kit. Duodenal juice was collected from the patients with pancreatic diseases and healthy control group. The concentrations of S100A2 could not be measured in all of the duodenal juice. The concentrations of S100A4 were higher in the healthy group than those in the disease group, although there was no significant difference. The concentrations of S100A6 and S100A11 did not differ between the disease group and the healthy control group. The concentrations of glypican-1 were significantly higher in the IPMN group than those in the PDAC group. The concentration of glypican-1 in duodenal juice might be useful for detection of PDAC in patients with IPMN.

研究分野：医歯薬学

キーワード：S100タンパク質ファミリー Glypican-1 十二指腸液

1. 研究開始当初の背景

各種画像診断による発見頻度の増加、手術手技の向上や化学療法の進歩にもかかわらず、膵癌は他癌と比較して必ずしも満足いく成績ではない。日本膵臓学会の報告では、切除例で膵癌病期別の3年生存率はstageで43%, stageで51%, stageで43%, stage aで19%, stage bで6%となっている。非切除例も含んだ膵癌全体の3年生存率は11%, 5年生存率は過去報告で6%程度と非常に予後不良であり、依然消化器癌の中では最も予後不良である。

この理由として膵癌は早期には症状に乏しく、発見時には進行癌であることが多いことが挙げられる。このため早期発見と効果的なスクリーニング法の開発が求められるが、微小膵癌の段階で診断されるのは極めて稀である。膵癌を疑う場合は血中の膵酵素(アミラーゼ, リパーゼ, エラスターゼ, トリプシン)や腫瘍マーカー(CEA, CA19-9, Dupan-2等)を測定するが、早期診断に有用とのエビデンスは確立されていない。膵癌診断の画像検査はCTやMRI, 超音波内視鏡検査(EUS)、内視鏡的膵胆管造影検査(ERCP)が挙げられるが、胃癌や大腸癌など内視鏡で直接観察し容易に病変組織を採取できる他の消化器癌と比較すると、解剖学的にアプローチが困難な部位に発生する膵癌の検出能や鑑別能は圧倒的に劣っている。

画像検査で膵癌が疑われ、確定診断を行う場合にはERCPでは経十二指腸乳頭的に検体を採取し、EUSでは穿刺吸引細胞診(EUS-FNA)を行う。しかし、ERCPでの経十二指腸乳頭的検体採取は膵管カニューレを必要とするため膵炎のリスクを伴い、EUS-FNAは穿刺後の癌細胞の播種のリスクが伴う。これらのリスクを回避し、より低侵襲に行うための検体採取法として十二指腸液採取を提案した。十二指腸液は膵管上皮細胞を含んでいると考えられ、膵液よりもはるかに低侵襲に採取可能である。

一方、S100タンパク質は細胞種特異的に発現し、2個のEF-handを持つカルシウム結合性タンパク質であり、現在までに20種類のサブファミリーが確認されている。これらS100タンパク質ファミリーの機能は、複雑で多岐に渡っていると考えられており、未解明の部分が多く残されている。

そこで本研究では十二指腸液中のS100タンパク質ファミリーに着目し、これまでに膵癌や慢性膵炎、膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)などの疾患の膵液において発現上昇の報告のあるS100A2、S100A4、S100A6、S100A11を測定・解析し、膵癌早期診断を目指すことを目的とした。これが可能となれば、将来的に小規模なクリニックでも上部消化管内視鏡検査施行時に十二指腸液を採取し、膵癌スクリーニング検査が行える可能性がある。本研究により膵癌の早期発見が可能となり、予後を改善できれば社会的貢献度は絶大である

と考えられる。

2. 研究の目的

十二指腸液中のS100タンパク質ファミリーおよびGlypican-1を測定し、膵癌スクリーニングに有意義かどうかを検討する。

3. 研究の方法

先行研究で膵癌群50例、膵癌以外の膵疾患群(膵管内乳頭粘液性腫瘍40例、慢性膵炎10例)、正常コントロール群30例(生体腎移植ドナーを対象)に対して十二指腸液採取を行っており、この検体を利用してELISA Kitを用いて十二指腸液中のS100タンパク質ファミリー、Glypican-1の測定を行う。

十二指腸液の採取方法は通常の検査に先立ち、倫理委員会承認の上で同意が得られた対象者に対して内視鏡挿入後すぐに十二指腸まで到達し、十二指腸乳頭部付近で十二指腸液を採取する。採取はPR-130Qカテーテル(Olympus社)を用いて行い、採取量は0.3ml以上を目標に5分以内で終了する。採取した十二指腸液はタンパク分解酵素阻害剤(Roche社Cat. No.05 829791001 Complete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free EASYpack)1錠相当を内部で破砕した保存チューブに注入し、即座に-80℃で保存する。保存検体中のタンパク変性により測定が困難な場合は、適切な保存法やタンパク分解酵素阻害剤の検討を行う。また、さらなる症例の蓄積のため倫理委員会承認のもとERCP/EUSの際に十二指腸液採取を行う。

採取した十二指腸液中の以下のタンパク質濃度をELISA kitを用いて測定する。

S100A2: 前癌病変では発現は認めないが、浸潤癌では発現増強し、高発現群では予後不良と報告してきた(Ohuchida K, J Pathol, 2007)。つまり早期発見のみならず、手術適応など治療方針の選択に寄与する可能性がある。

S100A4: 高発現により放射線治療抵抗性があることを報告した(Kozono S, Oncol Rep, 2013)。十二指腸液による診断と共に、予後予測と治療方針の決定に期待できる。

S100A6: 膵癌細胞および膵上皮内腫瘍性病変(PanIN)細胞で段階的な発現増強を認め、IPMNにおいても高発現する(Ohuchida K, Clin Cancer Res, 2005)。したがって、CT/MRIなどの画像診断では捉えきれない微小な病変を十二指腸液採取・解析により拾い上げができる可能性があり、スクリーニング検査に大きく貢献する可能性がある。

S100A11: PanIN病変のみならずIPMNや慢性膵炎など膵癌発生の高リスク群として認識されている病変に対しても発現増強を認めることを報告してきた(Ohuchida K, Clin Cancer Res, 2006)。つまり、S100A11の高発現群を厳重に経過観察することで膵癌を早期診断できる可能性が大きい。

Glypican-1: Meloらにより血中のGlypican-1が膵癌の早期診断に有用であると報告された(Nature 523(7559): 177-182)。

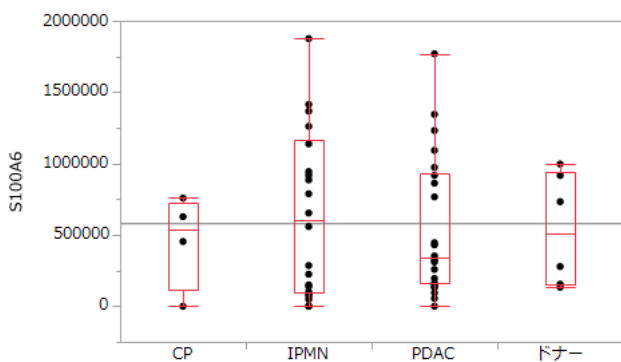
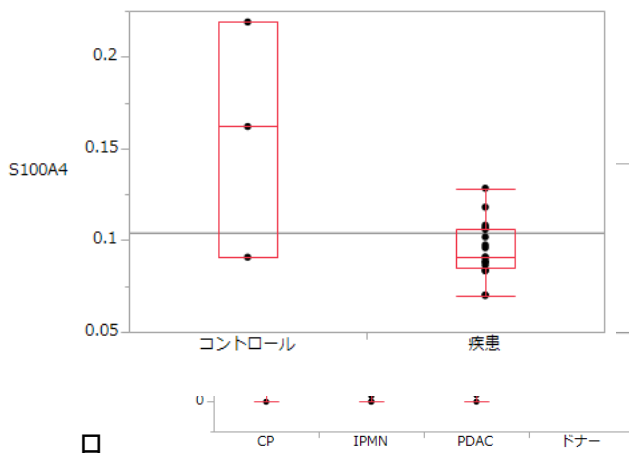
十二指腸液中の Glypican-1 濃度測定も膵癌の早期診断に有用である可能性がある。

4. 研究成果

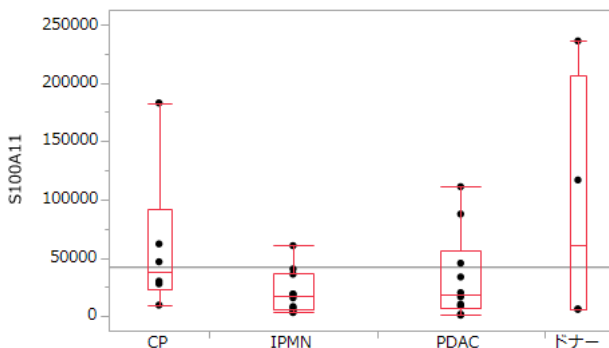
先行研究で採取されていた検体を利用し、ELISA kit を用いて十二指腸液中の S100A2、S100A4、S100A6、S100A11 濃度を測定した。対象症例は膵癌群 10 例、膵 IPMN 群 10 例、慢性膵炎群 7 例、コントロール群 4 例（生体腎移植ドナーから採取したもの）とした。

S100A2 は膵癌群、膵 IPMN 群、慢性膵炎群、コントロール群ともに ELISA kit の検出下限以下であった。十二指腸液は採取時にタンパク質分解酵素阻害薬を添加しているものの、S100A2 はほぼ分解されている可能性が高いと考えられた。

S100A4 は有意差は認めなかったものの、コントロール群のみ濃度が高い傾向にあり、膵疾患スクリーニングという観点では有用なマーカーとなる可能性があると考えられた。

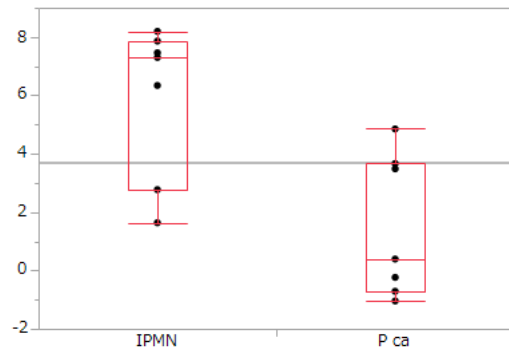


S100A11 はそれぞれの疾患群およびコントロール群間で有意差は認めなかった。



今回の検討では十二指腸液中 S100 タンパク family 測定の膵癌早期発見における有用性を明らかにすることはできなかったが、膵疾患スクリーニング検査としての S100A4 の有用性が示唆された。

また、十二指腸液中 Glypican-1 が膵癌早期発見マーカーとして有用かどうかを検討した。先行研究で採取されていた十二指腸液を利用し、ELISA kit を用いて十二指腸液中の Glypican-1 濃度を測定した。対象症例は膵癌群 7 例、膵 IPMN 群 7 例、コントロール群（生体腎移植ドナーから採取したもの）14 例とした。それぞれの Glypican-1 濃度の中央値は膵癌群：2ng/ml、膵 IPMN 群：37ng/ml、コントロール群：17ng/ml であり、膵癌群 vs 膵 IPMN 群では有意差を認めたが、膵癌群 vs コントロール群および膵 IPMN 群 vs コントロール群では有意差を認めなかった。また、膵疾患群（膵癌群 + 膵 IPMN 群）vs コントロール群での比較でも有意差は認めなかった。以上より、今回の研究では早期膵癌および膵疾患のスクリーニングという観点では Glypican-1 の有用性を明らかにすることはできなかった。ただし、膵 IPMN 群 vs 膵癌群では有意差を認めた。そのため、画像検査で膵 IPMN が疑われている患者に対し、十二指腸液中の Glypican-1 濃度を測定することで、膵 IPMN 由来癌または膵 IPMN 併存癌の早期発見に寄与し、膵 IPMN 患者の経過観察に有用である可能性が示唆された。



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 1 件)

Taketo Matsunaga, Takao Ohtsuka, Koichi Asano, Hideyo Kimura, Kenoki Ohuchida, Hidehisa Kitada, Noboru Ideno, Yasuhiisa Mori, Shoji Tokunaga, Yoshinao Oda, Sushovan Guha, Massimo Raimondo, Masafumi Nakamura, Masao Tanaka. S100P in duodenal fluid is a useful diagnostic marker for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 掲載予定・査読有

〔学会発表〕(計2件)

森 泰寿, 大塚 隆生, 中島 陽平, 松永 壮人, 宮坂 義浩, 大内田 研宙, 植木 隆, 永井 英司, 中村 雅史. 肝胆膵外科治療におけるバイオマーカーの意義と展望 低侵襲に膵癌早期発見を目指した十二指腸液中バイオマーカー解析の意義と今後の展望. 第 116 回日本外科学会定期学術集会. 2016 年 4 月 14 日. 大阪府大阪市

松永 壮人, 大塚 隆生, 中島 陽平, 後藤 佳登, 伊達 健治朗, 藤本 崇聡, 木村 英世, 森 泰寿, 大内田 研宙, 小田 義直, 永井 英司, 植木 隆, 田中 雅夫, M. Raimondo, 中村 雅史. 十二指腸液中分子マーカーを用いた膵疾患スクリーニング法. 第 100 回日本消化器内視鏡学会九州支部例会. 2015 年 12 月 5 日. 福岡県福岡市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 泰寿 (MORI, Yasuhisa)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：50632642

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

中島 陽平 (NAKASHIMA, Yohei)
九州大学大学院医学系学府臨床・腫瘍学分野・大学院生