

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591593
 研究課題名（和文） I P M Nパラフィン包埋組織のm R N A 定量解析と機能解析 I P M N 治療の新機軸確立
 研究課題名（英文） Quantitative and functional analysis of mRNA using formalin fixed paraffin embedded samples of IPMN Innovation for new treatment of IPMN-
 研究代表者
 永井 英司（EISHI NAGAI）
 九州大学・大学院医学研究院・准教授
 研究者番号：30264021

研究成果の概要：

I P M Nパラフィン包埋組織（FFPE）サンプルを用いて、その発生から浸潤・転移の各段階における腫瘍細胞を対象とし、独自に開発したm R N A 定量解析法により候補遺伝子群の詳細な発現解析を行った。その結果腸型IPMNとその他のtypeのIPMNに特徴的な遺伝子を同定し、FFPEサンプルからのmRNA発現解析にも成功した。FFPEサンプルによるmRNAの発現が予後判定に有用であることを報告した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
総 計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：膵臓外科学 IPMN、FFPE

1. 研究開始当初の背景

膵管内乳頭状粘液性腫瘍（IPMN）は、我が国で発見され、我が国で最も多くの症例が報告され、我が国で世界をリードする数多くの臨床的・基礎的研究が進められている。しかし、最も進歩している我が国のIPMNの臨床研究においても、切除すべき症例と経過観察すべき症例の選択や、縮小手術から標準的切除、膵全摘術いたる適切な術式選択、遺

伝要因問題など、様々な未解決の問題が山積している。一方で、近年マイクロアレイによってIPMNや通常型膵癌に関連する多くの候補遺伝子が報告されたが余りにも多く、診断と治療における各遺伝子群の意義については未整理のままとなっている。

IPMNは現在 gastric type, intestinal type, oncocytic type, pancreatobiliary type の4type に分類されている。また、浸潤癌の一部は通常型膵癌と同様にその予後は

極めて不良であり、早期発見、早期治療が切望されている。現在のところ腫瘍径、壁在結節の大きさ、細胞診などを手がかりに手術適応の決定が試みられてきたが、十分な成果が得られていないのが現状である。そのため新たな術前マーカーの検討が必要であると考えられる。申請者らは腭液中の mRNA を定量解析することに成功し、外科切除材料を用いて IPMN 内の早期癌病巣の存在診断に有用な癌関連遺伝子を同定し、その後に腭液から癌細胞のみを抽出し、同定した幾つかの癌関連遺伝子が有意に上昇していることを確認した、また、通常の免疫染色において IPMN の発癌に関わる遺伝子を検討してきた。しかし、これまでの研究は外科切除後に、標本の極一部から採取・凍結したサンプルを対象としているため、IPMNの全体像を把握するには大きな限界があった。即ち、IPMNの大半の標本はホルマリンに固定し、パラフィン包埋サンプルとして詳細な病理診断に供される必要があるからである。

2. 研究の目的

本研究では、当該施設に豊富に蓄積されている IPMN パラフィン包埋組織を用いて、その発生から浸潤・転移の各段階における腫瘍細胞を対象とし、従来の蛋白発現解析に加えて、独自に開発した mRNA 定量解析法により候補遺伝子群の詳細な発現解析を行う。

3. 研究の方法

IPMN パラフィン包埋組織中の mRNA 定量解析法の確立

パラフィン包埋組織中の mRNA 定量のための House Keeping Gene の選択
パラフィン包埋組織による IPMN の組織亜型毎の mRNA 定量解析

パラフィン包埋組織による IPMN 浸潤癌の mRNA 定量解析と通常型膵癌との比較

腭液中の mRNA 定量解析による IPMN 浸潤癌の同定

IPMN 浸潤過程に関与する遺伝子群の機能解析

4. 研究成果

断片化が極端に進んでいるパラフィン包埋組織中の RNA に対してプライマー作成、mRNA 抽出に工夫を加え FFPE サンプル由来 mRNA の定量解析を確立した

Reference gene による normalization は、

断片化した RNA を定量するためには必須であり、最適な reference gene を用いるサンプルにあわせて選択することが重要である。すでに申請者らは、10 種類以上の reference gene の定量を施行しており、これらの基礎 data より、-actin、18SrRNA、B2M、HMBS などの複数の遺伝子の mRNA 定量解析がパラフィン包埋サンプルでも可能であることが明らかにし、最適な reference 遺伝子を 2 つ選択しており、相対定量の信頼性を確保した。

背景に示した 4 つのサブタイプは、ある程度異型度との相関がみられる、特に intestinal type IPMN とその他の type の IPMN に特徴的な遺伝子を同定、FFPE サンプルからの mRNA 発現解析にも成功した

パラフィン包埋組織による IPMN 浸潤癌の mRNA 定量解析と通常型膵癌との比較に成功、さらにはパラフィン包埋組織による mRNA の発現が予後判定に有用であることを報告した

前述のサブタイプ別に特徴的な mRNA が腭液でも発現していることを確認し、今後膵癌との比較も行っていく予定である

前述の IPMN サブタイプのうち特に intestinal type に特異的な発癌経路に関連する遺伝子を同定した

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 11 件)

1. Kohei Nakata, Eishi Nagai, Kenoki Ohuchida, Shinichi Aishima, Akifumi Hayashi, Yoshihiro Miyasaka, Jun Yu, Kazuhiro Mizumoto, Masao Tanaka and Masazumi Tsuneyoshi. Reg4 expression is associated with carcinogenesis in the intestinal pathway of intraductal papillary mucinous neoplasms. Modern Pathology. 22, 460-468, 2009 査読あり

2. Kohei Nakata, Kenoki Ohuchida, Eishi Nagai, Akifumi Hayashi, Yoshihiro Miyasaka, Tadashi Kayashima, Jun Yu, Shinichi Aishima, Yoshinao Oda, Kazuhiro Mizumoto, Masao Tanaka and Masazumi Tsuneyoshi. LMO2 is a novel predictive

marker for a better prognosis in pancreatic cancer. Neoplasia. In press 2009 査読あり

3. Kenoki Ohuchida, Kazuhiro Mizumoto, Yoshihiro Miyasaka, Yu J, L Cui, Hiroshi Yamaguchi, Hiroki Toma, Shunichi Takahata, Norihiro Sato, Eishi Nagai, Koji Yamaguchi, Masazumi Tsuneyoshi, Masao Tanaka. Over-expression of S100A2 in pancreatic cancer correlates with progression and poor prognosis. J Pathol. 213 275-282 2007 査読あり

4. Ohuchida K et al., S100A6 is increased in a stepwise manner during pancreatic carcinogenesis: Clinical values of expression analysis in 98 pancreatic juice samples, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 16(4), 649-654, 2007

5. Ohuchida K et al., Twist, a novel oncogene, is upregulated in pancreatic cancer: Clinical implication of Twist expression in pancreatic juice, Int J Cancer, 120, 1634-1640, 2007

6. Yu J et al., LIM only 4 is overexpressed in late stage pancreas cancer, Mol Cancer, 7, 2008

7. Ohuchida K et al., Quantitative analysis of MUC1 and MUC5AC mRNA in pancreatic juice for preoperative diagnosis of pancreatic cancer, Int J Cancer, 118, 405-411, 2006

8. Ohuchida K et al., Quantitative Analysis of Human Telomerase Reverse Transcriptase in Pancreatic Cancer, Clin Cancer Res, 12(7), 2066-2069, 2006

9. Ohuchida K et al., S100P Is an Early Developmental Marker of Pancreatic Carcinogenesis, Clin Cancer Res, 12(18), 5411-5416, 2006

10. Ohuchida K et al., S100A11, A Putative Tumor Suppressor Gene, Is Overexpressed in Pancreatic Carcinogenesis, Clin Cancer Res, 12(18), 5417-5422, 2006

11. Ohuchida K et al., Sonic hedgehog is an early developmental marker of intraductal papillary mucinous neoplasms: clinical implications of mRNA levels in pancreatic juice, J Pathol, 210, 42-48, 2006

12. 大内田研宙ら、膵液中腫瘍マーカーと膵疾患、胆と膵、29、751-756、2008

〔学会発表〕(計6件)

1. Kohei Nakata, Eishi Nagai, Kenoki Ohuchida, Yoshihiro Miyasaka, Akifumi Hayashi, Kazuhiro Mizumoto, Masao Tanaka and Masazumi Tsuneyoshi. RegIV expression is involved in intestinal type carcinogenesis of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. Digestive Disease Week 2008 (San Diego), poster W1407 May, 2008. 査読あり

2. Kohei Nakata, Eishi Nagai, Kenoki Ohuchida, Yoshihiro Miyasaka, Akifumi Hayashi, Kazuhiro Mizumoto, Masazumi Tsuneyoshi and Masao Tanaka. Overexpression of LMO2 in pancreatic cancer and its clinical implication as a therapeutic target. Digestive Disease Week 2008 (San Diego), poster W1391 May, 2008. 査読あり

3. 仲田興平、永井英司、大内田研宙、宮坂義浩、水元一博、田中雅夫、恒吉正澄。膵癌における LMO2 発現と癌化における機能解析。第 108 回日本外科学会定期学術総会(長崎) 2008 年 5 月。査読あり

4. 仲田興平、永井英司、大内田研宙、相島慎一、宮坂義浩、林 晃史、水元一博、田中雅夫、恒吉正澄。Reg4 is involved in intestinal type carcinogenesis of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. 第 67 回日本癌学会定期学術総会(名古屋) 2008 年 10 月。査読あり

5. 宮坂義浩、永井英司、山口 浩、藤井 圭、井上崇弘、大内田研宙、山田知美、水元一博、恒吉正澄、田中雅夫。膵管内乳頭粘液腫瘍における DNA damage check point 経路の役割の検討。第 107 回日本外科学会定期学術総会(大阪) 2007 年 4 月。査読あり

6 . 研究組織

(1)研究代表者

永井 英司 (EISHI NAGAI)

九州大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：30264021

(2)研究分担者

田中 雅夫 (MASAO TANAKA)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：30163570

佐藤 典宏 (NORIHIRO SATO)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：20423570

高畑 俊一 (SHUNICHI TAKAHATA)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：50437779

大内田 研宙 (KENOKI OHUCHIDA)
九州大学・大学院医学研究院・特任助教
研究者番号：20452708

(3)連携研究者

なし