

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790467
 研究課題名 (和文) 質量分析を用いた血中変異 SPINK1 測定系による膵癌早期診断への挑戦
 研究課題名 (英文) Challenge to earlier detection of pancreatic carcinoma by SPINK1 mutational analysis with Mass Spectrometry
 研究代表者
 糸 潔 (KUME KIYOSHI)
 東北大学・病院・医員
 研究者番号：30431563

研究成果の概要：

膵分泌性トリプシンインヒビター (SPINK1、別名 PSTI) は、膵腺房細胞で生成される内因性のトリプシンインヒビターであり、活性化されたトリプシンを速やかに不活化し、生体を防御する安全装置と捉えられている。本研究では本遺伝子変異が膵癌患者で高頻度に認められ、膵癌発生の高危険因子であることを明らかにした。また本邦の主要な変異では血清中の PSTI が異常低値となることが示された。PSTI 低値例を拾い上げることにより、膵癌の高危険群を同定できる可能性がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	0	2,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	300,000	3,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：膵癌・遺伝子異常・トリプシンインヒビター

1. 研究開始当初の背景

日本での膵臓癌患者は増加傾向を示し、癌の死因の第5位を占める重要な疾患であるが、その予後は極めて不良である。画像検査の発達した現在でも、75%以上は Stage IV という進行癌になってから診断されており、早期診断法の開発が急務である。膵分泌性トリプシンインヒビター Serine protease inhibitor Kazal Type 1 (SPINK1) (別名 PSTI) は、膵腺房細胞で生成されるトリプシンイン

ヒビターである。活性化されたトリプシンを速やかに不活化し、生体を防御する安全装置と捉えられている。近年、この SPINK1 遺伝子の変異が慢性膵炎患者において報告された。一方、健常人においても約 1% に SPINK1 遺伝子変異が同定され膵炎の疾患修飾因子として作用していると推測される。これまでに我々は日本人の特発性慢性膵炎患者においてイントロン 3 の IVS3+2T>C 変異が 11% に認められることを報告した。この頻度は欧米

の1%に比べて高頻度であり、日本人に特有な遺伝子異常であると考えられる。一方、本変異保有者において膵癌の家族歴を有するものが20%と多く、本変異が膵癌の危険因子である可能性がある。

2. 研究の目的

SPINK1 遺伝子変異と膵癌との関連の有無を明らかにする。また血液中の変異 SPINK1 を検出するマスキング系を確立し、膵癌患者における SPINK1 変異の意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 当施設で診断され、本研究への参加の同意が得られた膵癌 164 例と慢性膵炎患者 245 例、健常者 527 例を対象とした。

末梢白血球よりゲノム DNA を抽出した。SPINK1 遺伝子のプロモーター領域とエクソン3 領域を PCR で増幅した。IVS3+2T>C 変異と p.N34S 変異について制限酵素 TspR1 と Bgl1 を用いた PCR-RFLP によって解析した。また ABI3100 を使用しダイレクトシーケンスを行なった。また最近、膵炎保護因子として同定された PRSS2 遺伝子の p.G191R 変異についても Hpy188III を用いた PCR-RFLP によって解析した。

(2) 慢性膵炎患者より採取した血清中の PSTI 濃度を RIA 法により測定し、SPINK1 遺伝子変異保有と非保有にわけて比較検討した。

(3) 血清 1ml および膵液 1ml 中に PSTI 抗体ビーズを加えて、振倒し、PSTI 蛋白を免疫沈降により抽出した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離、精製し、トリプシン消化後にマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析装置により解析した。

4. 研究成果

(1) 解析を行なった慢性膵炎非合併の膵癌患者 156 例中、3 例に p.N34S 変異を、1 例に IVS3+2T>C 変異を認め、SPINK1 遺伝子変異保有者は計 4 例 (2.7%) であった。健常者の SPINK1 遺伝子変異保有率は 527 例中 2 例 (0.38%) であり、膵癌患者で有意に変異頻度が高かった (p 値 0.027)。また慢性膵炎合併の膵癌患者における SPINK1 遺伝子変異頻度は 8 例中 3 例 (37.5%) とさらに高頻度であった (p 値 < 0.001)。これらの全膵癌症例における SPINK1 遺伝子変異頻度は 164 例中 7 例 (4.3%) と有意に高率であり、膵癌と SPINK1 遺伝子変異との関連が示唆された。(表 1)。この研究より、本遺伝子変異と膵癌の関連性を初めて明らかとなった。また近年、慢性膵炎に膵癌が合併し易いことが明らかになってきている。SPINK1 遺伝子変異陰性の慢性膵炎患者 216 例において膵癌の合併が 5 例 (2.3%) であったのに対し、p.N34S 変異陽性の

慢性膵炎患者 16 例中 3 例 (18.8%) に膵癌が合併しており、p.N34S 変異陽性者で有意に高頻度であった (p 値 0.012) (表 2)。p.N34S 変異陽性の慢性膵炎は膵癌発症の高危険群と考えられた。SPINK1 遺伝子変異は膵癌の新たな危険因子として、早期診断のための重要な要素になりうるものである。

表 1 膵癌患者における SPINK1 遺伝子変異の頻度

病因	n	p.N34S	IVS3+2T>C	全 SPINK1 変異 (頻度)	p 値*
慢性膵炎非合併の膵癌	n=156	3 (ht)	1 (ht)	4 (2.7%)	0.027
慢性膵炎合併の膵癌	n=8	3 (ht)	0	3 (37.5%)	<0.001
全膵癌症例	n=164	6 (ht)	1 (ht)	7 (4.3%)	<0.001
健常者	n=527	2 (ht)	0	2 (0.38%)	-

p 値*: SPINK1 遺伝子変異の頻度を患者群と健常者群とで比較検定

ht: heterozygous

表 2 慢性膵炎患者における膵癌の合併率と SPINK1 遺伝子変異

SPINK1 遺伝子変異	陰性	p.N34S	IVS3+2T>C	p 値*
膵癌 (頻度)	5/216 (2.3%)	3/16 (18.8%)	0/13 (0%)	0.012

p 値*: 膵癌合併の頻度を変異陰性群と p.N34S 変異群とで比較検定

一方、膵炎保護因子として同定された PRSS2 遺伝子の p.G191R 多型は、膵癌患者 128 例、IPMN 患者 49 例中、それぞれ 9 例 (7.0%) と 3 例 (6.1%) に認められた。これは健常者における p.G191R 頻度が 378 例中 25 例 (6.6%) であると同程度であり、本多型は膵腫瘍に対し、保護的作用はないと考えられた (表 3)。

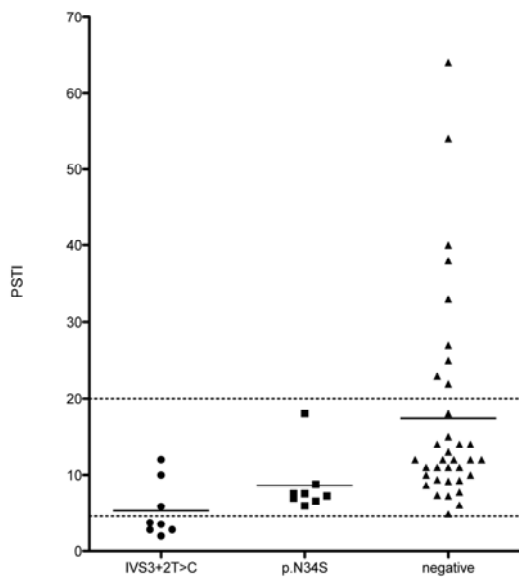
表 3 膵癌患者における PRSS2 遺伝子 p.G191R 多型の頻度

	n	p.G191R (hm)	頻度	p 値*	OR	95%CI
膵管癌	n=128	9 (0)	7.0%	0.84	1.068	0.493-2.316
IPMN	n=49	3 (0)	6.10%	>0.999	0.921	0.286-2.988
内分泌腫瘍	n=6	0	0	>0.999	-	-
他のまれな膵腫瘍	n=6	0	0	>0.999	-	-
全膵腫瘍	n=189	12 (0)	6.3%	>0.999	0.957	0.476-1.928
健常者	n=378	25 (2)	6.6%	-	-	-

p 値*: p.G191R 多型の頻度を患者群と健常者群とで比較検定

hm: homozygous

(2) おもに慢性膵炎症例を対象に血清中 PSTI 濃度を測定した。その結果、IVS3+2T>C 変異保有者では血清 PSTI が 5.7 ± 2.9 ng/ml と、変異非保有者の 17.4 ± 13.5 ng/ml に比べて有意に低値であった (p 値 < 0.01)。なおホモ接合型の IVS3+2T>C 変異保有者では 2.0 ng/ml 未満と検出限界以下と極めて低値であった。p.N34S 変異保有者でも血清 PSTI が 8.8 ± 3.2 ng/ml と変異非保有者に比べて低値であった (p 値 < 0.05)。(下図)



IVS3+2T>C 変異保有者を検出するための血清 PSTI 濃度を決定するため、ROC 曲線により解析した結果、血清 PSTI 濃度を 6.0ng/ml 未満と設定すると感度 75%、特異度 97%で検出可能であった (表 4)。また p.N34S 変異を含めた全 SPINK1 遺伝子変異保有者を検出するためには、血清 PSTI 濃度を 9.0ng/ml 未満と設定すると感度 81%、特異度 82%で検出可能であった (表 5)。以上より血清 PSTI 低値例を抽出することで、SPINK1 遺伝子変異陽性者の拾い上げられることが示唆された。これにより多額の費用や労力を要する遺伝子解析に頼らず、容易に SPINK1 遺伝子変異陽性者の拾い上げが可能となると考えられる。また SPINK1 遺伝子の主要な変異である p.N34S 変異による機能障害のメカニズムはこれまで明らかにされていない。今回 p.N34S 変異陽性者において血清 PSTI 濃度が低値であったことは、変異により PSTI 産生誘導が障害される可能性を初めて示唆するものである。

表 4 血清PSTI測定によるIVS3+2T>C変異の検出

	血清PSTI濃度		p値*
	6.0ng/ml未満	6.0ng/ml以上	
IVS3+2T>C変異あり	6	2	<0.001
IVS3+2T>C変異なし	1	42	

表 5 血清PSTI測定によるSPINK1遺伝子変異の検出

	血清PSTI濃度		p値*
	9.0ng/ml未満	9.0ng/ml以上	
SPINK1遺伝子変異あり	13	3	<0.001
SPINK1遺伝子変異なし	6	29	

(3) 血清 1ml および唾液 1ml 中に PSTI 抗体ビーズを加えて、振盪し、PSTI 蛋白を免疫沈降により抽出した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、渡銀染色により PSTI 蛋白のバンドを確認した。しかし、抽出された蛋白量が 1ng 以下と微量なこともあり、現在、質量分析装置にかけける条件を改良中である。質量分析により直接変異を同定できれば、膵癌危険群のより確実な拾い上げが可能となると期待される。

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 11 件)

- ① 糸潔、正宗淳、高木康彦、ほか 7 名、A loss-of-function p. G191R variant in the anionic trypsinogen (PRSS2) gene in Japanese patients with pancreatic disorders、GUT、印刷中、2009、査読有
- ② 下瀬川徹、糸潔、濱田晋、膵臓疾患の分子機構、臨床消化器内科、24 巻、233-238、2009、査読無
- ③ 高木康彦、正宗淳、糸潔、ほか 6 名、Mmicrosatellite polymorphism in intron 2 of human Toll-like receptor 2 gene is associated with susceptibility to acute pancreatitis in Japan、Hum Immunol、70 巻、200-204、2009、査読有
- ④ 下瀬川徹、糸潔、正宗淳、膵炎は生活習慣病か？ 遺伝病か？、成人病と生活習慣病、38 巻、1192-1195、2008、査読無
- ⑤ 下瀬川徹、糸潔、正宗淳、SPINK1、ADH2、and ALDH2 gene variants and alcoholic chronic pancreatitis in Japan、J Gastroenterol Hepatol、23 巻、82-86、2008、査読無
- ⑥ 糸潔、正宗淳、下瀬川徹、遺伝子異常と膵癌の発症、胆と膵、29 巻、199-205、2008、査読無
- ⑦ 正宗淳、糸潔、下瀬川徹、慢性膵炎 慢性膵炎と遺伝子異常 膵炎発症の分子機序、最新医学、62 巻、181-1887、2007
- ⑧ 正宗淳、糸潔、高木康彦、ほか 4 名、N34S mutation in the SPINK1 gene is not associated with alternative splicing、Pancreas、34 巻、423-428、2007、査読有
- ⑨ 正宗淳、糸潔、下瀬川徹、Differential roles of the SPINK1 gene mutations in alcoholic and nonalcoholic chronic pancreatitis、J Gastroenterol、42 巻、135-140、2007、査読有

〔学会発表〕(計5件)

- ① 糸潔、膵炎関連遺伝子であるSPINK1 遺伝子変異は膵癌の危険因子か、日本消化器病学会、平成20年10月2日、東京
- ② 糸潔、A loss-of-function anionic trypsinogen (PRSS2) variant in Japanese patients with pancreatic diseases、Annual Meeting of the American Gastroenterological Assosiation、平成20年5月19日、San Diego, USA
- ③ 糸潔、遺伝子変異による機能異常と膵炎、日本消化器病学会総会、平成20年5月8日、福岡
- ④ 糸潔、SPINK1 遺伝子のホモ接合型N34S 変異を有する慢性膵炎の1例、日本内科学会東北地方会例会、平成19年9月1日、青森
- ⑤ 糸潔、膵炎遺伝子異常の観点からみた慢性膵炎の臨床経過と膵癌合併について、日本膵臓学会大会、平成19年6月28日、福岡

〔図書〕(計2件)

- ① 糸潔、中外医学社、Annual Review 2009 消化器、2009、239-244 頁
- ② 糸潔、中外医学社、膵疾患へのアプローチ、2008、136-143 頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

糸 潔 (KUME KIYOSHI)

東北大学・病院・医員

研究者番号：30431563