

機関番号：17701  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20590345  
 研究課題名（和文）膵胆管系腫瘍の新しい組織分類に関連するムチン抗原の遺伝子発現機構  
 研究課題名（英文）Mucin gene expression mechanism related to a new classification of pancreatobiliary neoplasms  
 研究代表者  
 米澤 傑 (YONEZAWA SUGURU)  
 鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授  
 研究者番号：10175002

## 研究成果の概要（和文）：

膵胆管系腫瘍の早期発見と悪性度の評価については、MUC1、MUC2、MUC4 ならびに MUC5AC の組み合わせ評価が有用であることを示した。最近、我々は、それらのムチンの遺伝子発現がエピジェネティクス機構により制御されていることを報告した。それらエピジェネティクスを含むムチン遺伝子発現機構をトランスレーショナルリサーチにより臨床応用することは、ヒト膵胆管系腫瘍の早期かつ正確な診断に寄与すると期待される。

## 研究成果の概要（英文）：

The combination of MUC1, MUC2, MUC4 and MUC5AC expression is useful for early detection and evaluation of the potential for malignancy of pancreatobiliary neoplasms. Regarding the mechanism of mucin expression, we have recently reported that expression of the mucin genes is regulated epigenetically in cancer cell lines. A future translational research into mucin gene expression mechanisms, including epigenetics, may provide new tools for early and accurate detection of human pancreatobiliary neoplasms.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：消化器、唾液腺

## 1. 研究開始当初の背景

我々の一連のムチン抗原発現の研究の過程で、MUC1(汎膜結合ムチン)や MUC2(腸型分泌ムチン)の発現と、臨床病理学的・臨床疫学的データとの組み合わせにより、膵の「膵

管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN)」を IPMN-intestinal type と IPMN-gastric type という亜型に分類できるようになった。それを基盤として、胆管の「粘液産生胆管腫瘍 (MPBT)」の新しい亜型分類「columnar type、

cuboidal type」にも到達した。

これらの分類の根底にある MUC2 の遺伝子発現へのエピジェネティクス機構の関与を示す基礎的研究を行うと共に、MUC1 や MUC4(気道型膜結合ムチン)の発現が、膵胆管系癌に共通な予後不良因子であることも見出した。

IPMN や MPBT の各種亜型や、膵癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) の前癌性病変の pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) 等、様々な膵胆管系腫瘍における種々のムチンの発現様式を整理すると共に、関連するムチン抗原の遺伝子発現機構を明らかにして臨床応用を図る研究が望まれるようになってきた。

## 2. 研究の目的

膵胆管系の粘液産生嚢胞性腫瘍(IPMN ならびに MPBT)は、良性から悪性までスペクトラムが広く、悪性度を含めた質的診断が困難で、手術適応や術式の選択に難渋する場合が多い。その鑑別診断の基本となる IPMN と MPBT の新分類の発端となった腫瘍細胞におけるムチンの遺伝子発現機構を、基礎医学的実験データによって解明し、組織形態学的所見の差異が、どのような分子機構と関わっているかを明らかにする。一方、画像診断等の臨床データとの比較により、我々が提唱した新分類が手術適応や術式選択の決定に有効となるよう臨床応用への展開を図る。

さらに、IPMN や MPBT に比べてはるかに予後の悪い膵癌(PDAC)や腫瘍形成性肝内胆管癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma-mass forming type, ICC-MF)にみられる MUC1 や MUC4 の発現が、IPMN や MPBT の悪性化に関連があるか否かについても検索し、膵胆管系腫瘍の悪性化の過程を明らかにする。

IPMN と MPBT を共通の視点から新しく亜型

分類する発端となった MUC2 の遺伝子発現機構をさらに詳細に検討すると共に、予後不良因子の MUC1 と MUC4 をはじめとする種々のムチンの遺伝子発現機構を解明し、予後因子としてのムチン抗原の発現の分子機構と、組織形態学的所見の差異がどのように関連しているかを明確にして、病理形態学と分子生物学との「橋渡し」をすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 臨床検体を用いた研究

多数の IPMN を、我々の提唱したムチン発現を加味した IPMN の新分類に従って再分類し、患者予後を含む臨床病理学的所見と比較する。

膵胆管系腫瘍の予後不良因子である MUC1 や MUC4、その分類の根底にある MUC2 が、IPMN や MPBT ではどのように発現し、また、両腫瘍の癌化や浸潤性増殖とどのように関連しているかを検索するために、マイクロディセクション標本を用い、膵胆管系腫瘍の組織標本より各種ムチンの発現陽性細胞と発現陰性細胞を採取し、ムチンの遺伝子発現とエピジェネティクス機構との関係を確認する。

### (2) 細胞株を用いた研究

MUC1、MUC2、MUC4 等のムチンファミリー遺伝子の発現に関与するエピジェネティクス機構を解析するため、膵癌、乳癌、肺癌や大腸癌の各種細胞株を用い、プロモーター領域の DNA メチル化・ヒストン修飾状況の双方を、MSP 法、DNA メチル化定量解析法 (MassARRAY 法)、クロマチン免疫沈降法 (ChIP 法)により解析する。

### (3) 臨床応用へ向けた研究

ムチン発現のパターンを加味した我々の IPMN の新分類が、臨床で得られた画像診断の術前所見とどのような対応をするかについて比較検討し、手術前の正確な診断への応用

を検討する。

さらに、膵胆管系腫瘍の手術前に得られる膵液や胆汁液におけるムチンの遺伝子発現を検索し、それらの手術摘出標本におけるムチン発現と比較検討して、手術前に IPMN や MPBT の組織亜型等も含む病型や悪性度の判定が可能かどうかを検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 膵腫瘍の臨床検体を用いた研究

我々の提唱するムチン発現を加味した IPMN の新分類に従って多数の IPMN を再分類し、患者予後を含む臨床病理学的所見と比較したところ、IPMN-intestinal type は明らかに主膵管に多く発生し、癌化率も高く（表 1）、IPMN-gastric type よりも明らかに予後不良であった（図 1）。

表 1. IPMN-intestinal type と IPMN-gastric type における主病変の局在と悪性化の差異

	IPMN-intestinal type (n=31)	IPMN-gastric type (n=36)	
主病変の局在			
主膵管	28 (90%)	10 (26%)	(P<0.001)
分枝膵管	3 (10%)	26 (74%)	
悪化の程度	22 (72%)	4 (11%)	(P<0.001)
浸潤性の程度	11 (35%)	0 (0%)	(P<0.001)

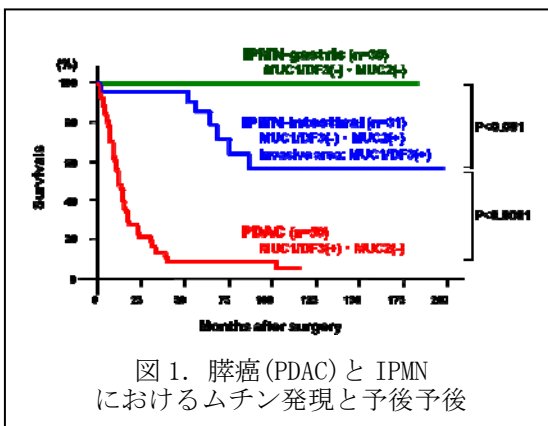


図 1. 膵癌 (PDAC) と IPMN におけるムチン発現と予後予後

膵癌やその前癌病変である PanIN に、上記の IPMN を加えた様々な膵腫瘍におけるムチン発現パターンを詳細に検討した結果、以下のようにまとめることができた（図 2）。

① MUC1 は悪性度や浸潤に関連し、MUC4 はさらなる高悪性に関係する。

② MUC2 は IPMN-intestinal type に特異的である。

③ MUC5AC (胃表層型分泌ムチン) は膵癌や IPMN のみでなく PanIN 等の前癌病変から高率に発現するため「早期マーカー」になりうる。

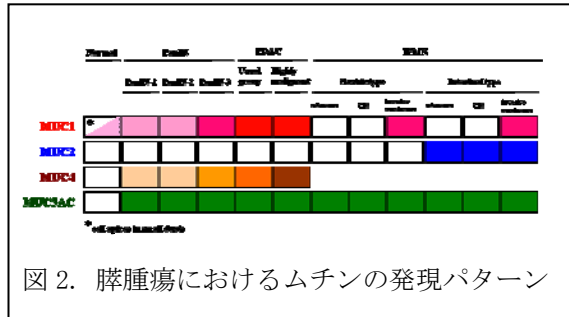


図 2. 膵腫瘍におけるムチンの発現パターン

##### (2) 胆管腫瘍における MUC16 の発現

腫瘍形成性肝内胆管癌 (ICC-MF) と粘液産生胆管腫瘍 (MPBT) において、卵巣癌のマーカーとして知られている MUC16 (CA125) の異なるエピトープを認識する 2 つのモノクローナル抗体 M11 と OC125 で検出されるムチン抗原である MUC16/M11 と MUC16/OC125 の発現を免疫染色で検索した。MUC16/M11 は浸潤性増殖をして予後不良の ICC-MF で、MUC16/OC125 は膨張性増殖をして予後良好の MPBT で有意に高い発現率を示した。さらに、ICC-MF のうち、MUC16/M11 陽性例は陰性例より有意に予後不良であったが、MUC16/OC125 ではそのような傾向はなかった。これらの結果より、MUC16/M11 が肝内胆管腫瘍の予後不良因子である可能性が示唆された。

##### (3) ムチンの遺伝子発現機構に関する研究

膵胆管系腫瘍の「悪性化」に密接に関連する MUC1 や MUC4、我々が提唱した IPMN ならびに MPBT の新分類の双方にとっての「key ムチン」である MUC2、「早期マーカー」である MUC5AC の遺伝子発現機構について、まず、膵癌・乳癌・肺癌・大腸癌の培養細胞株を用いて、エピジェネティクスの観点から検討した。

① MUC1 ならびに MUC4 の遺伝子発現

膵癌 (BxPC3、HPAFII、PANC1)・乳癌 (MCF-7、T-47D、MDA-MB-453)・肺癌 (NCI-H292、A427)・大腸癌 (LS147T、Caco2) の各種細胞株における 5-aza-2'-deoxycytidine (5-azadC) と trichostatin A (TSA) の処理による各々の mRNA の発現回復の検討や、DNA メチル化定量解析法 (MassARRAY 法)、MSP 法、ChIP 法を用いての検索の結果、MUC1 ならびに MUC4 の遺伝子発現制御には、転写開始付近における CpG のメチル化状態ならびにヒストン H3-K9 修飾状態の双方のエピジェネティクス機構が関与していることが示された (図 3)。

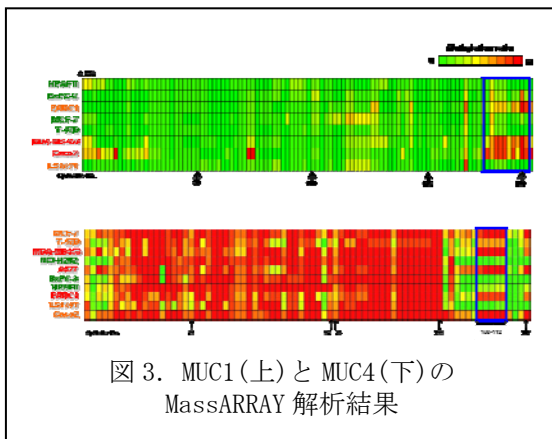


図 3. MUC1 (上) と MUC4 (下) の MassARRAY 解析結果

② MUC2 の遺伝子発現

すでに、膵癌培養細胞を用いて明らかにしていた MUC2 発現における DNA メチル化を、膵癌・乳癌・大腸癌・肺癌の各種細胞株における MassARRAY 法で確認した (図 4)。

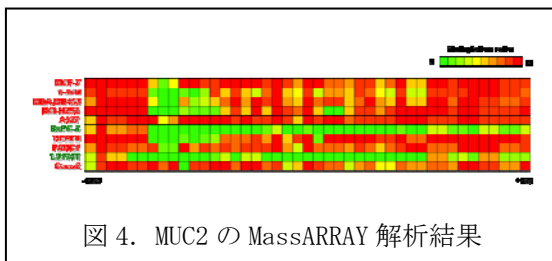


図 4. MUC2 の MassARRAY 解析結果

③ MUC5AC の遺伝子発現

MUC5AC 低発現細胞株において 5-azadC と TSA 処理を検討し、MUC5AC mRNA の発現回復を確認した後、膵癌・乳癌・大腸癌・肺癌の

各種細胞株について MassARRAY 法を用いてのメチル化解析を行った結果、MUC5AC プロモーターのかなり上流 (-3,718 to -3,670) におけるメチル化状態と MUC5AC mRNA 発現状態に相関が確認された。さらに、ChIP 法においても、同様の MUC5AC プロモーター上流領域におけるヒストン H3-K9 修飾状態が MUC5AC 発現に関与することが示され、MUC5AC の発現制御には、そのプロモーターのかなり上流領域における DNA メチル化とヒストン H3-K9 修飾の双方が影響していることが明らかとなった (図 5)。

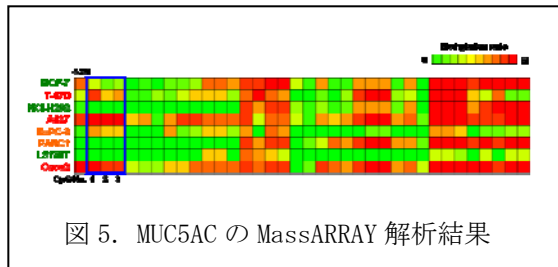


図 5. MUC5AC の MassARRAY 解析結果

④ MUC3A ならびに MUC17 の遺伝子発現

上記のムチンに加え、様々な癌において予後不良因子であることが報告されている MUC3A や、膵癌の予後不良に関連しているとされる MUC17 の遺伝子発現のエピジェネティクス機構についても膵癌・乳癌・大腸癌・肺癌の各種細胞株を用いて解析を行った。

MUC3A の転写活性には、プロモーター転写開始点近傍の CpG のメチル化状態が関与していることを見出した (図 6)。

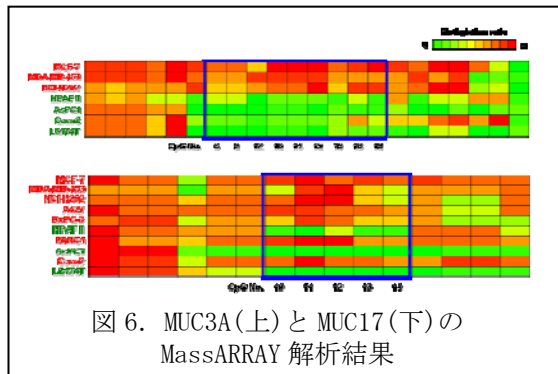


図 6. MUC3A (上) と MUC17 (下) の MassARRAY 解析結果

MUC17は、プロモーターの転写開始点近傍の CpG のメチル化状態と、同領域に存在する H3-K9 における化学修飾による制御を受けていることを明らかにした (図 6)。

さらに、近年、癌の進展におけるその機能が注目されているマイクロ RNA に関しても MUC17 の転写後制御に関わっている可能性を見出した(図 7)。

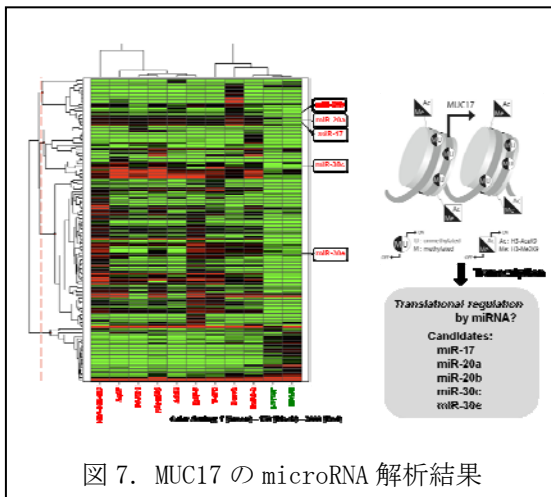


図 7. MUC17 の microRNA 解析結果

(4) ホルマリン固定やパラフィン包埋がムチン遺伝子発現の DNA メチル化解析へ与える影響

マイクロディセクション標本を用いた検索を行うにあたり、ホルマリン固定やパラフィン包埋が、MUC1、MUC2、MUC4 の標的領域でのメチル化にどのように影響するかを検討した。ホルマリン固定後パラフィンに包埋した標本において、包埋後 116 時間を越えて室温に放置したブロックからの標本では MUC1 と MUC4 で「高メチル化」シグナルが消失し、MUC2 では「低メチル化」シグナルが消失することを確認できた。少なくとも、ムチン遺伝子発現の DNA メチル化の解析には、長期保存されているホルマリン固定パラフィン包埋ブロックが適さないことを明らかにした。今後、パラフィン包埋の直後のサンプルにおいて、MUC1、MUC2、MUC4 の発現陽性細胞と発

現陰性細胞をマイクロディセクションにより採取し、各ムチンの遺伝子発現とエピジェネティクス機構との関係を確認する必要がある。

(5) 臨床応用へ向けた IPMN の亜型分類に関する画像的研究

IPMN を、予後良好である IPMN-gastric type と予後不良な症例も存在する IPMN-gastric type 以外に群分けして、IPMN の造影 CT 画像を解析し、画像診断所見から術前に亜型分類の推定が可能かを検討した。IPMN-gastric type 以外の群において、主膵管型が多く、主膵管径および交通枝の径が顕著に拡張し、3mm 以上の乳頭状隆起を有する症例が多いことが判明した。

(6) ムチン発現の分析に関する革新的な新技術の開発 (臨床応用を目指して)

MUC1 の特定部位を鮮明に免疫染色することができる新規抗体(特許出願中)を開発し、この抗体により、これまで不十分であった種々の膵腫瘍における様々なタイプの MUC1 の発現機序を解明できた。

また、エピジェネティクスの分野において、従来の検出限界 5%を超える 0.1%の感度を有する新規 DNA メチル化検出法(特許出願中)を開発し、MUC1、MUC2、MUC3A、MUC4、MUC5AC、MUC17 の遺伝子発現過程における DNA メチル化のより詳細な解析を行えるようになり、膵液・胆汁液を用いた MUC1、MUC2、MUC3A、MUC4、MUC5AC、MUC17 の詳細な DNA メチル化解析を可能にした。

これらの革新的な新技術を、画像診断と組み合わせる臨床応用することにより、膵胆管系腫瘍の早期で確実な診断に近づくことができるかと期待される。

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 21 件)

1. Kitamoto S, Yamada N, Yokoyama S, Houjou I, Higashi M, Goto M, Batra S K, Yonezawa S: DNA methylation and histone H3-K9 modifications contribute to MUC17 expression. *Glycobiology*, 21(2):247-256, 2011, 査読有

2. Kitamoto S, Yamada N, Yokoyama S, Houjou I, Higashi M, Yonezawa S: Promoter hypomethylation contributes to the expression of MUC3A in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 397(2):333-339, 2010, 査読有

3. Yamada N, Nishida Y, Yokoyama S, Tsutsumida H, Houjou I, Kitamoto S, Goto M, Higashi M, Yonezawa S: Expression of MUC5AC, an early marker of pancreaticobiliary cancer, is regulated by DNA methylation in the distal promoter region in cancer cells. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 17(6):844-854, 2010, 査読有

4. Yonezawa S, Higashi M, Yamada N, Yokoyama S, Goto M: Significance of mucin expression in pancreaticobiliary neoplasms. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 17(2):108-124, 2010, 査読有

5. Yamada N, Nishida Y, Tsutsumida H, Goto M, Higashi M, Nomoto M, Yonezawa S: Promoter CpG methylation in cancer cells contributes to regulation of MUC4. *Br J Cancer*, 100(2):344-351, 2009, 査読有

6. Yonezawa S, Goto M, Yamada N, Higashi M, Nomoto M: Expression profiles of MUC1, MUC2 and MUC4 mucins in human neoplasms and their relationship with biological behavior. *Proteomics*, 8(16):3329-3341, 2008, 査読有

7. Yamada N, Nishida Y, Tsutsumida H, Hamada T, Goto M, Higashi M, Nomoto M, Yonezawa S: MUC1 expression is regulated by DNA methylation and histone H3 lysine 9 modification in cancer cells. *Cancer Res*, 68(8):2708-2716, 2008, 査読有

[学会発表] (計 25 件)

1. 米澤 傑、ムチン：ヒト癌における臨床病理学的意義と遺伝子発現機構の解明から腫瘍悪性度早期診断システムの構築まで、第 99 回日本病理学会総会(「日本病理学賞」受賞、宿題報告講演)、2010 年 4 月 27 日～29 日、京王プラザホテル (東京都)

2. 米澤傑、東美智代、山田宗茂、後藤正道、膝がんに対する病理診断の動向と展望、第 68 回日本癌学会学術総会(シンポジウム)、2009 年 10 月 1 日～3 日、パシフィコ横浜(横浜市)

[図書] (計 2 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

1. 名称：ムチン 1 (MUC 1) タンパク質に対する抗体及びその用途

発明者：米澤 傑

権利者：鹿児島大学

種類：特許

番号：特願 PCT/JP2011/052893

出願年月日：2011 年 2 月 10 日

国内外の別：外国

2. 名称：新規な DNA メチル化解析方法

発明者：横山勢也、米澤 傑

権利者：鹿児島大学

種類：特許

番号：特願 2010-098163

出願年月日：2010 年 4 月 21 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~byouri2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米澤 傑 (YONEZAWA SUGURU)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10175002

(2) 研究分担者

東 美智代 (HIGASHI MICHIO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・講師

研究者番号：60315405

後藤 正道 (GOTO MASAMICHI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員

研究員

研究者番号：80325779