

機関番号：33303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590812

研究課題名（和文） 短縮ミッドカインを用いた外科的手術が必要な早期胃癌の新しい診断法

研究課題名（英文） New diagnose is with of early gastric cancer for recurred surgical operation that uses shortening midkine is necessary.

研究代表者

伊藤 透（ ITOH TOHRU ）

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：80193499

研究成果の概要（和文）：

本研究は早期胃癌（sm 胃癌）について以下の項目において行い、治療前にリンパ節転移を検索できないかの検討を行った。

1. 抗 tMK モノクローナル抗体の作製と検出感度及び特異性の確認
2. 胃癌培養細胞株での解析 tMKmRNA 発現及び tMK タンパク質の検出
3. ヒトの臨床検体である早期胃癌（sm1,sm2）切除標本での tMK モノクローナル抗体での解析および tMKmRNA および蛋白質発現解析

その結果、sm 癌における sm1 と sm2 の進達度の差による tMK の発現は、進達度が深い sm2 に強い傾向があるものの有意差は明確でなかった。また、リンパ節転移のある例の生検組織では、術前生検、リンパ節においての tMK の発現に関連性は見出せなかった。

研究成果の概要（英文）：

This study was carried out about early gastric cancer (sm gastric cancer) in the following items and conducted the examination that could not search lymph node metastases before treatment.

- 1.The manufacture of the antitMK monoclonal antibody and detectability and specific confirmation
- 2.Detection 3 of onset with the gastric cancer cell line of analysis tMKmRNA and the tMK protein.

As a result, the significant difference of the thing which tended to be strong in sm2 which was deep as for the onset of tMK by the difference of depth of sm1 and sm2 in the sm cancer depth was not clear the analysis in the tMK monoclonal antibody with the early gastric cancer (sm1,sm2) resected specimen which was the clinical specimen of the human and onset of tMKmRNA and protein analysis.

Also, with the biopsy tissue of the case with lymph node metastases, a preoperative biopsy, expression of tMK in lymph nodes were not able to find the association.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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

キーワード：早期胃癌、短縮ミッドカイン、内視鏡治療、酵素抗体法

1. 研究開始当初の背景

ミッドカイン（以下 MK と表記）は分子量 13 k Da の分泌タンパク質であり、塩基性アミノ酸とシステインに富んでいる。成体組織では MK の発現は限局されており、胎生中期での MK の高発現は、胎児性癌抗原の可能性を予感させるものであった。実際、癌部と非癌部を比較したとき、MK の高発現が 90% 以上の頻度に達することが明らかにされている。(Tsutsui J, et al *Cancer Res.*53:1281-1285,1993, Aridome K, et al, *Jpn J Cancer Res.*86:655-661,1995)。癌進展・転移に関して興味深いのは、短縮ミッドカイン(truncated MK:以下 tMK と表記)の存在である。これは第 3 エキソン(MK タンパク質の N 末ドメインに相当)が欠失した変異体であるが、癌組織特異的に認められ、ことに消化器癌リンパ節転移ではほぼ全例で検出される(Aridome K, et al, *Br J Cancer* 78:472-477 1998)。(これまで tMK タンパク質の検出の報告はされていない)また、Wilm's 腫瘍や胆管においても tMK の存在を示唆する報告がある(M,Kato,et al, *Histopathol* 18:129-134 2003, S.Paul,et al,*Cancer Letter* 163-245-251,2001)。しかし、癌特異的な tMKmRNA や tMK タンパク質を腫瘍マーカーや癌の臨床診断法として利用する研究は行われていない。また、消化器癌患者検体を腫瘍マーカーや癌の臨床診断法として利用する研究は行われていない。また、消化器癌患者検体からのリンパ節転移との診断法に tMKmRNA や tMK タンパク質を利用した研究は、国内外を問わず未だない。

欧米では、我が国と異なり絶対数の少ない消化器癌への関心は低い。また本邦においても同様の研究は十分な成果をあげていない。現在までの病理的研究によって早期胃癌(sm 浸潤)のうち粘膜下層の浅層(sm1-500 μ m)ではリンパ節転移がなく、深層(sm2)でリンパ節転移が 15~18%に認められることが分かっている(西村隆行、他。早期胃癌の治療法を左右する病理所見。胃と腸 36:1664-1677,2001)しかし sm2 癌は、逆に 80% がリンパ節転移を認めない。リンパ節転移の率がおよそ 18%あるため外科手術的に癌を除去し、かつ胃壁に付着しているリンパ節転移がないと分かれば、内視鏡的粘膜下層切開剥離術(ESD)で切除が行えるのである。外科的手術か内視鏡的手術かによる患者の侵襲には格段の差異があり、内視鏡的手術では

肉体的、精神的、経済的にも負担が軽くなり、さらに社会復帰への期間が短縮できるのである。手術前に内視鏡下における生検で採取した癌組織に tMK の陽性所見が認められれば、リンパ節転移の予測が可能となり、内視鏡治療の適応拡大、外科治療方法の選択に貢献できる可能性がある。また、癌特異性に発現する

tMK を検出する方法を胃癌検診等に用いることができれば、血液検査、尿検査という簡便な方法で早期胃癌が発見できる可能もある。

2. 研究の目的

消化器癌の中で胃癌の訂正死亡率は大腸癌のそれが飛躍的に増加したために第 2 位に後退したが、その実数は減少しておらず、未だに進行癌の発見が多い状況を見逃してはいけないと思われる。早期・進行胃癌のリンパ節転移と tMK 発現の関係が明らかになれば、内視鏡による臨床診断、病理診断によって、手術前にリンパ節転移の有無が予測可能となり、治療法選択の上で重要な指標となり得る。また、早期胃癌(vs 進行胃癌)において、この tMK タンパク質の検出が可能になれば腫瘍マーカーとしての利用価値は大きい。さらに分泌タンパク質として細胞外で検出されれば、血液または尿中からの検出も可能であり、その利用価値もさらに高まると思われる。

3. 研究の方法

(1) 抗 tMK モノクローナル抗体の作製と検出感度及び特異性の確認

① tMK の特異的配列を認識するペプチドを作製後、抗 tMK モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製し、精製されたモノクローナル抗体の tMK や MK に対する特異性や感度の検定は(KATO III 細胞株の培養上清から ELISA による検出とウエスタンブロットによって行う。さらに、)免疫細胞染色により確認する。

(2) 胃癌培養細胞株での解析 tMKmRNA 発現及び tMK タンパク質の検出

① cell bank から入手する予定の KATO III 等の腫瘍細胞株を用いて、tMKmRNA を RT-PCR 法により検出する。mRNA 検出には tMK 及び MK の確認を行い、tMK と MK の

関係を得る。また対照細胞も同様に行う。

(3) ヒトの臨床検体（早期胃癌（sm1,sm2）組織）を採取管理

①直視下あるいは内視鏡下に、胃癌患者の癌組織及び癌細胞を採取し、背景となる患者情報とともに関連付け管理する。

(4) 早期胃癌（sm1,sm2）患者の胃癌組織での解析

①癌組織中の tMKmRNA の発現確認を行う。早期・進行胃癌患者の組織を用いることにより、tMKmRNA の発現と癌進行度の関係を得る。また対照として正常人の臨床検体も同様に行う。

4. 研究成果

(1) 抗 tMK モノクローナル抗体の作製と検出感度及び特異性の確認

①tMK の特異的配列を確認するペプチドを作製後、抗 tMK モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製が難航し、精製したモノクローナル抗体による tMK や MK に対する特異性や感度の検定は残念ながら不調に終わった。それに伴い免疫細胞染色により抗 tMK モノクローナル抗体の感度も確認できなかった。

(2) 胃癌培養細胞株での解析 tMKmRNA 発現及び tMK タンパク質の検出

①cell bank から入手する予定の KATO III 等の腫瘍細胞株を用いて、tMKmRNA を RT-PCR 法により検出が順調に進まず、mRNA 検出には tMK 及び MK の確認が行えなかった。抗 tMK モノクローナル抗体作製が出来なかったため、ELISA 法により、tMK タンパク質及び MK タンパク質の発現を確認することが出来なかった。

(3) ヒトの臨床検体である早期胃癌

(sm1,sm2) 切除標本での tMK モノクローナル抗体での解析

①外科的に手術された SM 胃癌の切除標本および術前の生検組織を用いて tMK モノクローナル抗体の発現を確認した。SM 癌における sm1 と sm2 の進達度の差による tMK の発現は、進達度が深い sm2 に強い傾向があるものの有意差は明確でなかった。また、リンパ節転移のある例の生検組織で tMK の発現が対を成す術前生検、リンパ節における tMK の発現に関連性は見出せなかった。

(4) ヒトの臨床検体である早期胃癌

(sm1,sm2) 切除標本での tMKmRNA および蛋白質発現解析

①胃癌生検組織中の tMKmRNA の発現確認を RT-PCR 法での発現を試みたが、標本が小

さため検出は実現性が難しいと判断。手術標本（早期・進行）において検討を行ったが、tMKmRNA の発現と癌進行度の関係は明確に出来なかった。

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）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 透 (ITO TOHRU)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：80193499

(2) 研究分担者

神田 享勉 (KANDA TUGIYASU)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：40261838