

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月2日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390380

研究課題名（和文） 膵液中分子マーカーによる膵がん診断研究の総括と
IPMN subtype の臨床応用研究課題名（英文） General overview of research on diagnosis of pancreatic cancer using molecular
makers in pancreatic juice and clinical application of molecular makers on diagnosis of IPMN subtype

研究代表者

水元 一博（MIZUMOTO KAZIHIRO）

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：90253418

研究成果の概要（和文）：

膵癌および IPMN における遺伝子発現解析を手術組織切除標本や膵液細胞診由来膵癌細胞よりマイクロダイセクション法などを用いて mRNA や microRNA を抽出し、膵癌予後や化学療法感受性への関連や IPMN subtype 分析への応用について検討した。膵癌での Claudin 4 および S100A4 mRNA 発現は膵癌予後規定因子であった。膵癌での miR 21、miR 17-5p、miR 203 高発現症例は予後不良であり、miR 21 や miR 17-5p 強制発現により膵癌細胞の増殖、浸潤能や薬剤耐性が増強した。膵液検体中の miR 21、miR 155 発現は膵癌診断に有用であった。IPMN の subtype 解析では、intestinal type で Reg4 や claudin 4 が高発現し、特異な発現過程が存在する可能性を明らかとした。薬剤感受性解析では、hENT-1・dCK 高発現および RRM1・RRM2 低発現症例、また EGFR 低発現症例で gemcitabine による術後補助化学療法が有効であり、膵穿刺吸引細胞診検体から採取した上皮細胞でも解析可能であり、切除不能膵癌症例においても治療効果の予測が可能であることを証明した。マイクロアレイ解析により、miR 142-5p や miR 204 高発現群において gemcitabine による術後補助化学療法が有効であることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

We showed that LMO2 was more frequently detected in high-grade PanIN lesions and the LMO2 messenger RNA levels were significantly higher in invasive ductal carcinoma cells. Expression of claudin-4 and S100A4 mRNA is diagnostic and poor prognostic markers in PDCA. MicroRNA-21, microRNA-17-5p, microRNA-203 MicroRNA-21 expression were new poor prognostic markers of PDCA. High expression of microRNA-17-5p, microRNA-203 modulates biological functions of pancreatic cancer cells including their proliferation, invasion and chemoresistance. MicroRNA-200c was an independent better prognostic maker in PDCA. And microRNA-21 and microRNA-155 expression analyses in preoperative juice samples of PDCA. Expression of Reg-4 and claudin-4 were promising makers for prediction of the intestinal type in IPMN. The patients with high expression of hENT-1 and dCK mRNA and low expression of RRM1 and RRM2 and the patients with low EGFR mRNA expression were predicted for better outcome in pancreatic cancer after gemcitabine-based adjuvant chemotherapy. And high expression of microRNA-142-5p and microRNA-204 were also predictive markers for gemcitabine response after surgical resection of pancreatic cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

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、膵癌、mRNA/microRNA、IPMN

1. 研究開始当初の背景

- ① 膵がんは、画像診断技術が格段に進歩した現在でも早期発見は極めて困難である。早期膵がん検出のため、膵液や吸引細胞診検体の分子マーカーを用いた研究が活発に進められ、最近では、マイクロアレイによる網羅的解析やさらには質量分析による解析など先駆的研究が急速に進歩している。しかし、何れも少数例を対象とした部分的研究に留まり、膵がんの予後を決定する分子を包括的統合的に評価できる研究は達成されていない。
- ② 近年の画像診断の進歩にともない、膵腫瘍の中でも特に嚢胞性病変をとともなう膵管内乳頭粘液性腫瘍(intraductal papillary-mucinous neoplasm:以下 IPMN)の症例が急増している。しかし、現在の画像診断ではその悪性度を評価することは困難であり、手術適応の判断に苦慮するという新しい問題点が浮かび上がってきた。そのため、分子生物学的手法をとり入れた悪性度診断を確立することが急務となっている。
- ③ 膵癌治療は、Gemzar と TS1 が登場した現在大きな変貌を遂げようとしており、この両者の組み合わせを含む我が国で最初の Phase III 研究が大規模に展開されている。さらに、今後は分子標的薬剤が膵がん治療の現場にも登場することが予想され、個別化治療前に臨床的に採取できる微量サンプルを用いて治療効果を予測する研究の推進が急務である。その一環として我々は、Gemzar の感受性を左右する遺伝子を同定し報告した(Ohhashi et al, 2008)。

2. 研究の目的

これまでの早期膵癌診断の研究を総括し、その手法を早期膵癌診断だけでなく、IPMN の術前悪性度診断や進行膵癌の治療前治療効果予測診断に用いて、近年新たに持ち上がった膵癌診断/治療の問題点を解決する。特に外科切除によって得られた豊富な FFPE 検体を用いた定量的包括的解析法の導入により、IPMN の術前 subtype 解析と新たなマーカーとして期待される microRNA 解析の 2 つを研究の柱として、臨床への架け橋となる translational research として従来の mRNA 解析データを基盤とした早期膵癌診断、IPMN 悪性度診断と膵癌治療効果予測のための大規模解析を行う。

2. 研究の方法

当施設において 1992 年から現在までに切除をおこなった全症例を整理し、予後調査を完了し、この症例の FFPE サンプルの中から主たる病変が存在する代表切片を病理学的に選択する。選択した代表切片を対象として、明らかに非腫瘍性である部位を肉眼的に取り除き (macrodissection)、残った腫瘍性病変から RNA を抽出する。抽出した RNA の integrity を評価し、十分量の RNA を抽出できた症例を対象として mRNA・microRNA の定量解析を行う。同時に、DNA を抽出して Methylation 解析を行う。網羅的な解析から IPMN のサブタイプに特異的な遺伝子を同定し、膵液を対象とした解析を行う。膵がんについては、予後情報に基づいて薬物治療の感受性を決定している遺伝子を同定する。また各種治療抵抗性細胞株の網羅的な解析により microRNA を含む新規予測関連分子を同定し、FFPE 検体による大規模検証を行う。この検証により臨床的意義を認めた遺伝子を対象として、進行膵癌患者の FNA サンプルまたは外科切除サンプルを対象として化学療法感受性に関する前向き研究を実施する。幾つかの遺伝子については、従来の laser-microdissection を用いて、膵がんの発生過程における発現解析を行い、早期膵癌診断マーカーとしての詳細な評価を行う。上記の解析と平行して、translational research として prospective に膵液解析、FNA 検体解析を行い、その臨床的意義を明確にする。

4. 研究成果

- ① 膵癌および IPMN 組織標本における mRNA および microRNA 解析
膵癌前癌病異変である PanIN2 以上で LMO2 が高率に発現し、その mRNA が浸潤癌細胞において有意に高発現することを見出した。また、膵癌組織中の Claudin4 および S100A4 mRNA 発現レベルが膵癌予後規定因子となりうることを見出した。MicroRNA においては、膵癌における miR 21、miR 17-5p、miR 203 高発現症例が有意に予後不良であった。また、miR 21 や miR 17-5p 強制発現により膵癌細胞の増殖、浸潤能や薬剤耐性が増すことも明らかとした。逆に miR 200c は高発現群で予後良好という結果であった。膵液検体でも miR 21、miR 155 の発現解析を行い、膵癌診断に有用であること証明した。
- ② IPMN の subtype 解析
IPMN の subtype の内 intestinal type において大腸癌の発癌に関与する Reg4 や細胞接着因子である claudin 4 が極めて高い発現を呈することを証明し、intestinal

type においては特異な発現過程が存在することを明らかとした。また、intestinal type 由来浸潤癌症例は切除により比較的予後良好な傾向にあることを示した。また、Senescence が IPMN への関与していることも報告した。

- ③ 膵癌薬剤感受性関連遺伝子の発現解析
切除膵癌組織を用いた解析により、hENT1・dCK高発現およびRRM1・RRM2低発現症例、またEGFR低発現症例において膵癌治療薬であるgemcitabineによる術後補助化学療法が有効であることを明らかとした。これらは膵穿刺吸引細胞診検体からのレーザーマイクロダイセクション法により採取した上皮細胞においても解析可能であり、切除不能膵癌症例においても治療効果の予測が可能であることを証明した。また、gemcitabine耐性膵癌細胞株を用いたマイクロアレイ解析によりgemcitabine耐性に関与する複数のmicroRNAを同定し、miR-142-5pやmiR-204高発現群においてgemcitabineによる術後補助化学療法が有効であることを明らかとした。

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 13 件)

- ① Nakata K, Ohuchida K, Nagai E, Hayashi A, Miyasaka Y, Kayashima T, Yu J, Aishima S, Oda Y, Mizumoto K, Tanaka M and Tsuneyoshi M LMO2 is a novel predictive marker for a better prognosis in pancreatic cancer, *Neoplasia*, 11, 712-719, 2009
- ② Nakata K, Nagai E, Ohuchida K, Aishima S, Hayashi A, Miyasaka Y, Yu J, Mizumoto K, Tanaka M and Tsuneyoshi M, REG4 is associated with carcinogenesis in the intestinal pathway of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas, *Mod Pathol.*, 24, 533-541, 2009
- ③ Ikenaga N, Ohuchida K, Mizumoto K, Yu J, Fujita H, Nakata K, Ueda J, Sato N, Nagai E, Tanaka M, S100A4 mRNA is a diagnostic and prognostic marker in pancreatic carcinoma, *J Gastrointest Surg.*, 13, 1852-1858, 2009
- ④ Moriyama T, Ohuchida K, Mizumoto K, Yu J, Sato N, Nabae T, Takahata S, Toma H, Nagai E and Tanaka M, MicroRNA-21 modulates biological functions of pancreatic cancer cells including their proliferation, invasion and chemoresistance, *Molecular cancer therapeutics*, 8, 1067-1074, 2009
- ⑤ Sadakari Y, Ohuchida K, Nakata K, Ohtsuka T, Aishima S, Takahata S, Nakamura M, Mizumoto K and Tanaka M, Invasive carcinoma derived from the nonintestinal type intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas has a poorer prognosis than that derived from the intestinal type, *Surgery*, 147, 812-817, 2010
- ⑥ Ikenaga N, Ohuchida K, Mizumoto K, Yu J, Kayashima T, Sakai H, Fujita H, Nakata K and Tanaka M, MicroRNA-203 expression as a new prognostic marker of pancreatic adenocarcinoma, *Ann Surg Oncol*, 17, 3120-8, 2010
- ⑦ Sadakari Y, Ohtsuka T, Ohuchida K, Tsutsumi K, Takahata S, Nakamura M, Mizumoto K and Tanaka M, MicroRNA expression analyses in preoperative juice samples of pancreatic ductal adenocarcinoma, *JOP*, 11, 587-92, 2010
- ⑧ Yu J, Ohuchida K, Mizumoto K, Fujita H, Nakata K and Tanaka M, MicroRNA, has-miR-200c, is an independent prognostic factor in pancreatic cancer and its upregulation inhibits pancreatic cancer invasion but increases cell proliferation, *Mol Cancer*, 9, 169, 2010
- ⑨ Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, Itaba S, Ito T, Nakata K, Yu J, Kayashima T, Souzaki R, Tajiri T, Manabe T, Ohtsuka T and Tanaka M, Gene expression levels as predictive markers of outcome in pancreatic cancer after gemcitabine-based adjuvant chemotherapy, *Neoplasia*, 12, 807-817, 2010
- ⑩ Tsutsumi K, Sato N, Cui L, Mizumoto K, Sadakari Y, Fujita H, Ohuchida K, Ohtsuka T, Takahata S and Tanaka M, Expression of claudin-4 (CLDN4) mRNA in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas, *Modern Pathology*, 24, 533-541, 2011
- ⑪ Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, Itaba S, Ito T, Nakata K, Yu J, Kayashima T, Hayashi A, Souzaki R, Tajiri T, Onimaru M, Manabe T, Ohtsuka T, Tanaka M., High EGFR mRNA expression is a prognostic factor for reduced survival in pancreatic

cancer after gemcitabine-based adjuvant chemotherapy, International journal of oncology, 38(3), 629-641, 2011

⑫ Miyasaka Y, Nagai E, Ohuchida K, Fujita H, Nakata K, Hayashi A, Mizumoto K, Tsuneyoshi M and Tanaka M, Senescence in intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas, Human Pathology, 42, 2010-17, 2011

⑬ Ohuchida K, Mizumoto K, Kayashima T, Fujita H, Moriyama T, Ohtsuka T, Ueda J, Nagai E, Hashizume M and Tanaka M, MicroRNA expression as a predictive marker for gemcitabine response after surgical resection of pancreatic cancer, Ann Surg Oncol.,18, 2381-2387, 2011

[学会発表] (計 0 件)

[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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水元 一博 (MIZUMOTO KAZUHIRO)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：90253418

(2) 研究分担者

上田 純二 (UEDA JUNJI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90529801

当間 宏樹 (TOMA HIROKI)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：80437780

佐藤 典宏 (SATO NORIHIRO)

九州大学・大学院医学研究院・共同研究員

研究者番号：20423527

大内田 研宙 (OHUCHIDA KENKI)

九州大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：20452708

(3) 連携研究者

なし