

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 30日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590399

研究課題名（和文）：膵胆道腫瘍における予後因子の解明

研究課題名（英文）：Investigation of prognostic factor in pancreatobiliary neoplasm

研究代表者：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

研究成果の概要（和文）：

我々は、ヒト膵胆道系腫瘍において、様々な癌の生物学的悪性度とムチン抗原(MUC1, MUC2, MUC4)の発現が密接に関連していることを報告してきた。膵液や胆汁等の臨床材料を、我々が開発した新規メチル化解析法を用いて検討したところ、膵胆道腫瘍の早期診断に応用できる可能性が示唆された。一方、肝内胆管癌においてはMUC16発現症例が有意に予後不良であった。浸潤性膵管癌では、MUC17陽性率が乳頭癌症例では高かった。MUC16/CA125とMUC17はMUC1やMUC4と同じく臨床応用に役立つ可能性があることを示した。

研究成果の概要（英文）：

We had reported that expression profiles of mucins (MUC1, MUC2 and MUC4) are closely associated with biological behavior of human pancreatobiliary neoplasms. We tried to analyse of clinical human samples, *i.e.* pancreatic juices or bile duct juices, used by a new method, MSE (methylation specific analysis) developed by us. This new tool has a potential for the application to early diagnosis of pancreatobiliary neoplasms. In addition, in intrahepatic cholangiocellular carcinoma, MUC16 expression is related to poor prognosis. In pancreatic ductal adenocarcinoma, MUC17 expression rate in the papillary adenocarcinoma is higher than in the tubular adenocarcinoma. Thus, MUC16/CA125 and MUC17, as well as MUC1 and MUC4, would be new useful prognostic markers in the pancreatobiliary neoplasm.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：人体病理学

キーワード：病理学、膵胆道腫瘍、ムチン抗原、予後因子、MUC1、MUC4、MUC16、MUC17

1. 研究開始当初の背景

膵癌ならびに胆道癌は、予後不良な悪性腫瘍の一つである。画像診断が発達した今日にお

いても早期発見が困難なことや、膵胆道系腫瘍自体が高い悪性度を有し早期より浸潤・転移を来しやすいことなど、複合的要因が考えられる。またその解剖学的位置のため、根治

的治療である外科的治療には多大な侵襲が伴い長期の闘病生活を余儀なくされ、その間の患者本人の身体的負担や本人・家族の経済的負担は大きい。現在では手術療法単独ではなく、放射線療法や化学療法も加えた集学的療法も行われており、予後の改善が図られているが、他臓器に比較して依然予後は不良である。そのため、**膵胆道系腫瘍の早期診断あるいはその予後因子の確定**が望まれている。

2. 研究の目的

申請者らの所属する研究グループでは、癌の生物学的悪性度とムチン抗原発現の関連性について、詳細な検討を行ってきた結果、**膜結合型ムチン MUC1 発現が予後不良因子であり、分泌型ムチン MUC2 発現が予後良好因子であることを世界に先駆けて報告し、さらに、その成果を継続して積み重ねている。**腫瘍形成性肝内胆管細胞癌、浸潤性膵管癌、肝外胆管癌や肺癌において、**気管支型膜結合型ムチン MUC4 発現が予後不良因子であることを**も見いだしている。

本研究では、膵胆道系腫瘍の予後因子であるムチン抗原発現の検討を基盤とし、手術適応や術式の選択といった**臨床応用に役立つマーカー**を確立してゆく。また、膵液や胆汁液、血液中などの術前生検材料から、ムチン抗原の発現に関連する DNA、mRNA あるいは蛋白質を抽出し、**腫瘍の質的診断や早期診断**に応用可能であるか否かを検討する。

3. 研究の方法

(1)膵液等からの各ムチンコア蛋白遺伝子の mRNA 検出ならびにムチン蛋白の検出

膵胆道系腫瘍患者の、術前あるいは摘出検体から膵液や胆汁液を採取する。また比較対象として、非腫瘍性疾患(膵胆管合流異常や胆管炎など)患者から得られた組織も採取する。採取後、mRNA を抽出し高感度の定量 Real-time PCR 法を用い、各種ムチンコア蛋白の mRNA に関して解析を行う。また、ELISA や Western blotting 等も行い、ムチン蛋白の検出も試みる。同時に DNA 抽出も行い、次項のメチル化状態の検討に用いる。既に培養細胞上清からの mRNA 検出を行っており、陽性対象として使用する。試験的に行った数例の解析では、全例ではないが mRNA あるいは DNA の抽出ならびに解析に成功している。以上の分子生物学的検討は主に研究協力者が行なう。なお、摘出標本本体でのムチン発現並びに予後データ等も併せて比較検討し、腫瘍の質的診断を反映しているかどうかは研究代表者・分担者で判断してゆく。

(2)ムチンコア蛋白遺伝子 DNA プロモーター

領域のメチル化状態の検討

我々は培養膵癌細胞を用い、MUC1、MUC2、MUC4、MUC5AC 等のムチン発現が、プロモーター領域のメチル化によって規定されていることを明らかにしてきた。今後は実際の臨床材料を対象として、人体内での DNA メチル化状態を検討する。膵液等の検体からはムチン発現に関連する NA が採取できるメリットがあるが、夾雑物等サンプリングエラーの問題がつかまとう。一方、通常の組織標本からは「マイクロディセクション・システム」を用いて、ムチン発現陽性細胞と陰性細胞をそれぞれ採取し、DNA メチル化の状態を検討する。膵液等の検討と併せて組織標本の検討を行うことによってのみ、人体内でのメチル化状態の検討が正確に行えると考えられる。なお、通常の検体で解析が不十分な場合には、新鮮凍結標本を用いて検討する。

組織標本の対象材料としては、まず、膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)に対象を絞る。形態ならびにムチン発現を加味して提唱されている IPMN の亜型 intestinal type と gastric type を選び出し、腫瘍部分ならびに正常部分を数カ所ずつ採取する。そこから抽出した DNA を用い、メチル化を検討する。以上の結果を検討し、ヒト組織におけるムチン遺伝子発現に対する DNA メチル化の関与の有無を研究代表者が検討する。

4. 研究成果

我々は、難治性癌である膵癌ならびに胆管癌において、癌の生物学的悪性度とムチン抗原発現が密接に関連していることを報告してきた。また培養癌細胞を用いて、各種のムチン発現を調節しているのが、プロモーター領域の CpG 領域のメチル化状態あるいはヒストン H3-K9 のアセチル化状態によって規定されていることを明らかにしてきた。

(1) 臨床材料を用いたムチン遺伝子の検索

我々は、従来までの検出限界 5%を超える 0.1%の感度を有する新規 DNA メチル化解析法(特許出願中)を開発した。この解析法により、少量の膵液あるいは胆汁液でも解析が行えるようになり、MUC1、MUC2、MUC4、MUC5AC に重点を置き DNA メチル化解析を行っている。

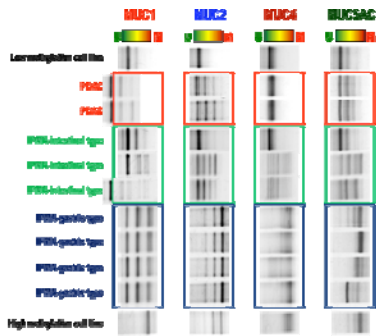


図 1) 新規メチル化解析法を用いた胆汁の解析例

研究期間内に、膵胆道系腫瘍患者から膵嚢胞性病変の嚢胞内容液十数例、胆汁は約 50 例採取した。これらの臨床材料から、主に MUC1, MUC2, MUC4 のメチル化状態の解析等を行った。

その結果、胆汁を用いた解析では、通常の浸潤癌の存在範囲と DNA のメチル化状態はよく関連していた。すなわち、癌細胞が直接接する部位から得られた胆汁では、MUC1 と MUC4 のプロモーター領域での脱メチル化が認められ、腫瘍組織での MUC1 と MUC4 ムチンの過剰発現を裏打ちするエピジェネティクス現象が生じている結果が得られた。一方、MUC2 でのプロモーター領域ではメチル化が認められており、腫瘍組織では発現が認められないことと関連していた。

以上の結果から、胆汁を用いて癌の質的診断を行いうる可能性が示唆された。膵液では症例数が少ないため、確定的なことはいえず、引き続き検体を採取してゆく必要があった。膵液に関しては、研究協力施設から術前に採取した膵液を入手できることとなり、より多くの症例の解析が可能となる予定である。

一方、通常の組織標本を用いて、免疫染色のみでなく、「マイクロディセクション・システム」を用いて、ムチン発現陽性細胞と陰性細胞での DNA メチル化の状態の検討を行った。対象は、膵管内乳頭粘液性腫瘍であったが、膵液等の検討と矛盾する結果であった。その原因として、固定液や固定時間による影響、パラフィン包埋による影響等、複数の要因が考えられた。

(2) 組織標本における各ムチン分子のコア蛋白発現プロファイルの作成：
肝内胆管癌において、免疫染色を行い MUC16 の発現を比較検討した。外科切除を受けた腫瘍形成性肝内胆管癌 63 例を検討した。48%(30/63 例)で陽性であり、MUC16 陽性例では陰性例に比べて有意に予後不良であった (P=0.03)。

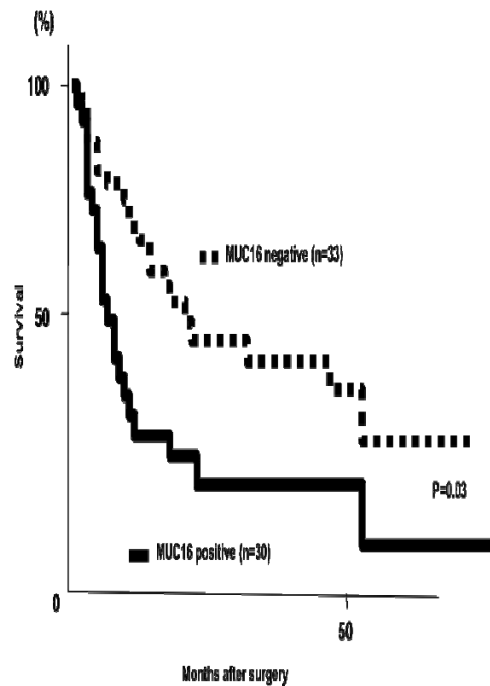


図 2) 腫瘍形成性肝内胆管癌における MUC16 発現による予後曲線

また、外科切除を受けた浸潤性膵管癌 66 例において、免疫染色を行い MUC17 の発現を比較検討した。52%(34/66 例)で陽性であった。組織型別では、乳頭腺癌が管状腺癌より陽性率が高く、低分化腺癌では陽性率は認めなかった。

以上のことから、MUC16/CA125, MUC17 は MUC1, MUC4 と同じく臨床応用に役立つマーカーであり、臨床応用に役立つ可能性がある。

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 25 件)

1) Yokoyama S, Kitamoto S, Yamada N, Houjou I, Sugai T, Nakamura S, Arisaka Y, Takaori K, Higashi M, Yonezawa S. The application of Methylation specific electrophoresis (MSE) to DNA methylation analysis of the 5' CpG island of mucin in cancer cells. BMC Cancer、査読有、2012、in press.

2) Higashi M, Yamada N, Yokoyama S, Kitamoto S, Tabata K, Koriyama C, Batra SK, Yonezawa S. Pathobiological Implications of MUC16/CA125 Expression in Intrahepatic Cholangiocarcinoma—Mass Forming Type. Pathobiology. 査読有、79 巻、2012、101-106

3) Yonezawa S, Kitajima S, Higashi M, Osako M, Horinouchi M, Yokoyama S, Kitamoto S, Yamada N, Tamura Y, Shimizu T, Tabata M, Goto M. A novel anti-MUC1 antibody

against the MUC1 cytoplasmic tail domain: use in sensitive identification of poorly differentiated cells in adenocarcinoma of the stomach

Gastric Cancer. 査読有、2011、DOI 10.1007/s10120-011-0125-2

4) Kitamoto S, Yamada N, Yokoyama S, Houjou I, Higashi M, Goto M, Batra SK, Yonezawa S. DNA methylation and histone H3-K9 modifications contribute to MUC17 expression. Glycobiology. 査読有、21 巻、2011、247-56

5) Tsuji T, Togami S, Nomoto M, Higashi M, Fukukura Y, Kamio M, Yonezawa S, Douch T. Uterine cervical carcinomas associated with lobular endocervical glandular hyperplasia. Histopathology. 査読有、59 巻、2011、55-62

6) Togami S, Nomoto M, Higashi M, Goto M, Yonezawa S, Tsuji T, Batra SK, Douchi T. Expression of mucin antigens (MUC1 and MUC16) as a prognostic factor for mucinous adenocarcinoma of the uterine cervix. J Obstet Gynaecol Res. 査読有、36 巻、2010、588-97

7) Higashi M, Goto M, Saitou M, Shimizu T, Rousseau K, Batra SK, and Yonezawa S. Immunohistochemical study of mucin expression in periampullary adenomyoma. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 査読有、17 巻、2010、275-83.

8) 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. 査読有、397 巻、2010、333-9

9) Yamada N, Nishida Y, Yokoyama S, Tsutsumida H, Houjou I, Kitamoto S, Goto M, Higashi M, and Yonezawa S. Expression of MUC5AC, an early marker of pancreatobiliary cancer, is regulated by DNA methylation in the distal promoter region in cancer cells. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 査読有、17 巻、2010、844-54

10) Yonezawa S, Higashi M, Yamada N, Yokoyama S, Goto M. Significance of mucin expression in pancreatobiliary neoplasms. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 査読有、17 巻、2010、108-24

11) Yamada N, Nishida Y, Tsutsumida H, Goto M, Higashi M, Nomoto M, Yonezawa S. Promoter CpG methylation in cancer cells contributes to the regulation of MUC4. Br J Cancer. 査読有、100 巻、2009、344-51.

[学会発表] (計 24 件)

1) Higashi, M., et al. Immunohistochemical study of MUC17 expression in human pancreatic cancer, 23rd European Congress of Pathology, 2011 年 8 月 29 日、Helsinki Exhibition & Convention Center (Helsinki, Finland)

2) 東 美智代、他、膵胆管系腫瘍-難治性腫瘍-の早期診断システム確立への挑戦第 52 回日本組織細胞化学会総会・学術総会(招待講演)、2011 年 9 月 25 日、金沢大学宝町キャンパス(石川県)

3) 米澤 傑、ムチンと膵・胆道癌、第 8 回日本病理学会カンファレンス (招待講演)、2011 年 8 月 6 日、ホテルブエナビスタ (長野県)

4) Higashi, M., et al.、MUC16(CA125) is a novel prognostic factor of intrahepatic cholangiocarcinoma-mass forming type、第 56 回日本病理学会秋期特別総会、2010 年 11 月 25 日~26 日、北九州国際会議場(福岡)

5) Higashi, M. et al.、The expression of MUC16 (CA125) in intrahepatic bile duct tumors、MUCHINS IN HEALTH AND DISEASE (10th International Workshop on Carcinoma - associated Mucins)、2009 年 7 月 19 日~23 日、KING' S college, Cambridge, (London, UK)

[図書] (計 2 件)

1) 米澤 傑、他 株式会社文光堂、東京 病理診断に役立つ分子生物学: 第 2 部 病理診断医になじみのある疾患関連分子 MUC 解説編。(金井弥栄、石川俊平、池田栄二; 編集)、2011、328-333

2) 米澤 傑、他 株式会社文光堂、東京 病理診断に役立つ分子生物学: 第 2 部 病理診断医になじみのある疾患関連分子 MUC 診断編。(金井弥栄、石川俊平、池田栄二; 編集)、2011、334-340

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: ムチン 1 (MUC1) 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:

種類: 特許

番号: 特願 2010-097922

出願年月日: 2010 年 4 月 21 日

国内外の別: 国内

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:

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

東 美智代 (HIGASHI MICHIO)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准
教授
研究者番号：60315405

(2) 研究分担者

米澤 傑 (YONEZAWA SUGURU)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教
授
研究者番号：1017502

(4) 研究協力者

後藤 正道 (GOTO MASAMICHI)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・
客員研究員
研究者番号：80325779

横山 勢也 (YOKOYAMA SEIYA)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助
教

研究者番号：20569941