

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 25 年 6 月 6 日現在

機関番号： 32202
 研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2010 ~ 2012
 課題番号： 22590318
 研究課題名 (和文) 膵管癌の発育進展に関与するマイクロ RNA 発現異常の解析
 研究課題名 (英文) Analysis of microRNA expression in pancreatic carcinogenesis.

研究代表者
 福島 敬宜 (FUKUSHIMA NORIYOSHI)
 自治医科大学・医学部・教授
 研究者番号： 40384937

研究成果の概要 (和文)：膵管癌の早期診断法の開発を目指し、前浸潤癌を含む膵管癌の早期像についての解析を進めてきた。膵管内腫瘍由来の浸潤癌のホルマリン固定パラフィン包埋切片から顕微鏡下で組織を採取し、採取した組織片から RNA を抽出し、microRNA マイクロアレイを用いて網羅的に microRNA 発現異常を解析した。その結果、miR320a, miR375, miR494, miR663, miR187 などが高発現していることを見出した。特に miR320a, miRNA-375 は他の癌腫の増殖調整に働いているなどの報告があり、膵癌の発育進展にも関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The aim of this study is to develop early diagnostic system of pancreatic cancer. The analyses of the early stage of pancreatic cancer, including pancreatic intraductal neoplasm have been performed. Total RNA from tissue specimens obtained by using microdissection method from formalin-fixed paraffin-embedded tissue, were collected and analyzed microRNA expression abnormalities. As a result, I have found that such as, miR375, miR494, miR663, miR187 miR320a is highly expressed. Possibility that has been reported, such as working for the cell growth of other carcinomas, are also involved in the development progress of pancreatic cancer has been suggested miR320a, miRNA-375 in particular.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：膵管癌, マイクロ RNA, 前癌病変

1. 研究開始当初の背景

膵管癌は依然として早期診断が困難で予後不良であり、早期診断法の確立が急務であ

る。膵癌登録 (2001-2004) によれば通常型膵癌 738 例中、2cm 以下の小膵癌(ts1)は 107 例(14.4%)、特に 1cm 以下は 13 例(1.8%)のみ

であり、腫瘍が増大もしくは浸潤してからの発見が大半を占める。

膵管癌の早期診断・治療のためには、その早期病変および前駆病変の解明が必須である。最近、microRNAは測定が比較的容易で癌診断用マーカーとなる可能性が報告され、治療標的ともなり得ると考えられてきている。しかし、これまでに膵管癌の前駆病変や早期病変においてmicroRNAの発現パターンを解析した研究はなかった。

ヒトに発生する浸潤性膵管癌の前駆病変と考えられている病変には、(A)膵上皮内腫瘍性病変(pancreatic intraepithelial neoplasia, PanINs), (B)膵管内乳頭粘液性腫瘍(intraductal papillary mucinous neoplasms, IPMNs)などがあることが知られており、これらは、これまでの多くの研究から多段階的に様々な分子異常が蓄積して組織グレードを増し、最終的に浸潤癌に進展する可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

(1) 膵癌の前駆病変から浸潤癌への進展(浸潤癌の初期像)に関与するmicroRNAの発現異常を検出するため、微小浸潤癌を伴う膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)において各成分(浸潤癌, 非浸潤癌)を網羅的に解析し、診断マーカー候補の検出を行う。

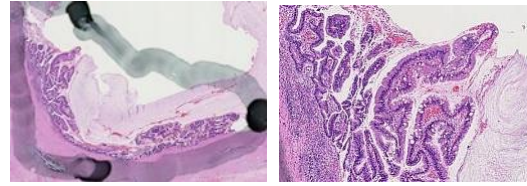
(2) IPMNには、いくつかの組織学的亜型があるが、それらについての遺伝子異常の違いを検索する。

(3) 早期膵癌の病理組織学的特徴を明らかにする目的で、小膵癌(ts1)外科切除症例について臨床病理学的に検討する。

3. 研究の方法

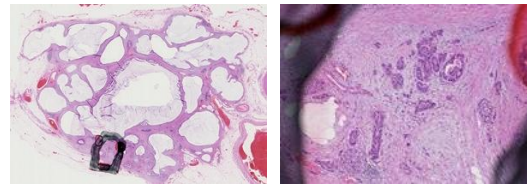
(1) 微小浸潤を伴う膵管内乳頭粘液性膵癌について、その外科切除材料のHE標本上で、

膵管内成分と間質浸潤成分を同定し、その標本のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックの連続切片(10 μ m厚)から、当該組織を削って採取し、RNAを抽出した。



(膵管内成分)

(膵管内成分の拡大)



(間質浸潤癌成分)

(浸潤癌の拡大)

抽出したRNAは、電気泳動で量および品質チェックした後、Hy5標識を行って3D-Geneチップ(東レ株式会社)とのハイブリダイゼーション(32 $^{\circ}$ C, 16h)を行った。各サンプルの総RNA量は290ng~500ngであった。各症例で膵管内成分と浸潤癌部を比較検討した。また膵管内成分のサンプルを混合し、各浸潤癌との比較検討も行った。

(2) 25例の外科切除検体(本研究は東京大学消化器内科との共同研究)。上記と同様に、ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックの連続切片(10 μ m厚)から、マイクロダイセクション法により当該組織を削って採取した。その組織検体からPKを用いてDNAをキット(Qiagen, Valencia, CA, USA)を用いて抽出した。ダイレクト・シーケンス法(KRAS exon2, BRAF exon15, PIK3CA-exon 10, 21)と免疫組織化学(MUC1, 2, 5AC, TP53, phospho-ERK (p-ERK), phospho-SMAD1/5/8, SMAD4, CDKN2A)により解析した。

(3) 2005年から2011年までに自治医科大学附属病院で外科切除された通常型膵管癌61例のうち組織学的な腫瘍進展範囲が最大径2cm以下の計11症例を対象とした。検討項

目は年齢、性別、診断契機、臨床診断のモダリティ、予後、病理組織学的各因子。

この中で、主膵管周囲の全周性かつ連続性に増生する弾性線維に着目した。

4. 研究成果

(1) 膵癌前駆病変の一つである膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) の膵管内腫瘍成分と膵管外の間質浸潤部の組織をそれぞれ別々に解析し比較した。その結果、miR320a、miR375、miR494、miR663、miR187 などが高発現していることを見出した。miR320a は、大腸癌において癌細胞の増殖や肝転移の抑制に、miR-200c は、大腸癌細胞の EMT に関与して大腸癌の転移能を調節している。miRNA-375 は insulin-like growth factor 1 receptor を介して食道癌の増殖、転移に抑制的に働いているなどの報告があり、膵癌の発育進展にも関与している可能性が示唆された。

引き続き、サンプル数を増やすと同時に各高発現 microRNA の膵癌の発育進展への関与について機能的に解析していく。

(2) IPMN25 例の内、胃型亜型 11 例、腸型 11 例、胆膵型 1 例、オンコサイト型 2 例であった。腸型の異型度は胃型より有意に高かったが、胃型は、腸型 (3/11, 27.3%) に比べて明らかに KRAS 遺伝子変異が高かった (9/11, 81.8%; $p < 0.05$)。KRAS 遺伝子変異を有した症例はすべて免疫組織化学で phospho-ERK 陽性を示した。腸型 (9/11, 81.8%) は、SMAD1/5/8 リン酸化 (+) が、胃型 (3/11, 27.3%; $p < 0.05$) に比べて高かった。以上より、胃型と腸型 IPMN は異なる発育進展過程が示唆された。

(3) 浸潤性膵管癌の早期像を明らかにする目的で外科切除された術前未治療の腫瘍最大径 2 cm 以下の小膵癌 (ts1) について臨床病理学的な検討を行った。その結果、これまで

報告してきた結節内の膵管内乳頭状成分の存在 (6 例 (54%)) に加え、主膵管周囲の弾性線維の増生が高頻度 (10 例 (91%)) に見られることを明らかにした。膵管壁が必ずしも破壊されていない状態でも見られており、腫瘍と間質との何らかのインターアクションが示唆された。

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 15 件)

- ① 福嶋敬宜: IPMN 国際診療ガイドライン 2012—残された課題—病理診断の判定基準 —. 日本膵臓学会誌「膵臓」査読有, 第 28 巻 2 号, 2013, 156-161,
- ② Kimura W, Moriya T, Hanada K, Abe H, Yanagisawa A, Fukushima N (他 12 名, 6 番目): Multicenter study of serous cystic neoplasm of the Japan pancreas society. Pancreas. 査読有 41(3):2012, 380-7
- ③ Maeda E, Akahane M, Fukushima N (他 7 名, 10 番目) Comparison of CT findings of biliary tract changes with autoimmune pancreatitis and extrahepatic bile duct cholangiocarcinoma. Jpn J Radiol. 査読有 30(3): 227-34, 2012
- ④ Mohri D, Asaoka Y, Ijichi H, Ohta M, Tada M, Tanaka Y, Ikenoue T, Tateishi K, Isayama H, Kanai F, Fukushima N (他 7 名, 14 番目) Different subtypes of intraductal papillary mucinous neoplasm in the pancreas have distinct pathways to pancreatic cancer progression. J Gastroenterol. 査読有 47(2):203-13, 2012
- ⑤ 福嶋敬宜 (1 番目) 膵管内腫瘍の亜分類. 日消誌査読有 109 巻 2 号, 2012, 173-7
- ⑥ Tanaka M, Shibahara J, Fukushima N (他 5 名, 3 番目): Claudin-18 is an Early-Stage

Marker of Pancreatic Carcinogenesis. J Histochem Cytochem. 査読有
59(10):942-952, 2011

⑦ Yamao K, Yanagisawa A, Takahashi K, Kimura W, Doi R, Fukushima N (他 17 名, 6 番目) Clinicopathological Features and Prognosis of Mucinous Cystic Neoplasm With Ovarian-Type Stroma A Multi-Institutional Study of the Japan Pancreas Society. : Pancreas 査読有 40:67-71, 2011

⑧ 福島敬宜 : 胆膵腫瘍組織分類における癌 取扱い規約と WHO 分類の異同と課題. , 胆と膵, 査読無 32: 2011

⑨ 福島敬宜 : Mucinous Cystic Neoplasm 悪性例の病理像および悪性頻度. 肝胆膵, 査読無 2011

⑩ Tanaka M, Fukayama M, Fukushima N, Undifferentiated Carcinoma of the Pancreas With/Without Osteoclast-like Giant Cells. Pathol Case Reviews 査読有 15(6): 210-214, 2010

⑪ 福島敬宜 : 膵の SCN と MCN の病理. 肝胆膵 画像, 査読無 12 ; 687-692, 2010

⑫ 福島敬宜 : 胆膵疾患における細胞診・生 検診断の病理学的問題点. 胆と膵, 査読無 31 ; 815-818, 2010

⑬ 福島敬宜 : Intraepithelial neoplasia. 病理と臨床, 査読無, 第 28 巻 174-175, 2010

⑭ 福島敬宜 : 膵癌の前癌病変の病理. 肝胆 膵画像, 査読無 12, 161-166, 2010

⑮ 福島敬宜 : 膵, WHO 新分類の Overview. 肝胆膵, 査読無 62, 2011

[学会発表] (計 1 2 件)

①福島敬宜 : 早期膵癌・前駆病変研究におけ る多分野連携の重要性と病理医の役割 ― 国際 CAPS サミットからの考察. 第 102 回 日 本病理学会総会, 札幌, 2013 年 6 月 6 日

② Adsay V, et al. : International Consensus Study on the Terminology and Diagnosis of Tumoral Intraepithelial Neoplasms (“Adenomas” and “Intracystic Papillary Neoplasms” of WHO-2010) of the Gallbladder. The 102nd The Annual Meeting of United State and Canadian Academy of Pathology, Baltimore, MD, March2-8, 2013

③ 福島敬宜 : 浸潤性膵癌とその前駆病変 ― 病理学的視点から ― 第 75 回 東北膵胆道疾 患検討会, 仙台, 2012 年 7 月 20 日, (招待講 演)

④ 福島敬宜 : 膵腫瘍 WHO 分類 2010 の概要. 第 101 回 日本病理学会総会, 東京, 2012 年 4 月 26 日

⑤ 今田浩生 : 小膵癌 (ts1) の臨床病理学的検 討. 第 101 回 日本病理学会総会, 東京, 2012 年 4 月 26 日

⑥ 福島敬宜 : IPMN についての日本と欧米で の考え方・取扱いの違い ― 病理の立場から. 第 98 回日本消化器病学会総会, 東京, 2012 年 4 月 19 日

⑦ 福島敬宜 : 消化器神経内分泌腫瘍の病理 診断 ～分類の変遷と新たな展開～. 第 38 回 日本神経内分泌学会学術集会, 東京, 2011 年 11 月 25 日 (招待講演)

⑧福島敬宜 : “早期” 膵癌と前駆病変 ― 病理 学的視点から ― 第 12 回北海道消化器画 像・MIT 研究, 札幌, 2011 年 6 月 25 日 (招 待講演)

⑨福島敬宜 : 膵・胆管粘液産生腫瘍の病理. 第 9 回病理・細胞診セミナー, 大阪, 2011 年 1 月 15 日 (招待講演)

⑩福島敬宜 : 胆膵腫瘍の病理診断 ― 新 WHO 分 類での改訂点もふまえて ― 第 22 回北陸病 理集談会, 福井, 2010 年 10 月 23 日 (招待講 演)

⑪福島敬宜 : 胆膵病変の病理 ― 新 WHO 分類

(2010)での変更点もふまえて。第31回備後肝胆膵研究会，福山，2010年6月24日（招待講演）

⑫ 福嶋敬宜：膵腫瘍WHO分類（第4版）の概要と改訂のポイント。第99回日本病理学会総会，東京，2010年4月27-29日

〔図書〕（計 8件）

① 福嶋敬宜，腫瘍性膵疾患。文光堂，キーワードとアルゴリズムで捉える肝胆膵の実践病理診断，2013年，209-240

② 福嶋敬宜，入門編，肝臓，胆道・十二指腸乳頭部，膵臓，応用編，資料編。医学書院，臨床に活かす病理診断学－消化管・肝胆膵編第2版，2011年，2-31，123-187，202-221，231-266

③ Iacobuzio-Donahue C，Fukushima N：Secondary tumours of the pancreas. In WHO Classification of Tumours of the Digestive System (Eds: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND) 4th Edition, IARC Press, Lyons France, 2010, 333

④ Klimstra DS，Fukushima N，Hruban RH，Klöppel G：Diagnostic algorithms for tumours of the pancreas. In WHO Classification of Tumours of the Digestive System (Eds: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND) 4th Edition, IARC Press, Lyons France, 2010, 334-337.

⑤ Fukushima N，Hruban RH，Kato Y，et al.：Ductal adenocarcinoma variants and mixed neoplasms of the pancreas. In WHO Classification of Tumours of the Digestive System (Eds: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND) 4th Ed, IARC Press, Lyons France, 2010, 292-295.

⑥ Benoit Terris B，Fukushima N，Hruban RH：Serous cystic neoplasms of the

pancreas. In WHO Classification of Tumours of the Digestive System (Eds: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND) 4th Edition, IARC Press, Lyons France, 2010, 296-299.

⑦ Zamboni G，Fukushima N，Hruban RH，Klöppel G：Mucinous cystic neoplasms of the pancreas. In WHO Classification of Tumours of the Digestive System (Eds: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND) 4th Edition, IARC Press, Lyons France, 2010, 300-303.

⑧ Adsay NV，Fukushima N（他8名，2番目）：Intraductal neoplasms of the pancreas. . In WHO Classification of Tumours of the Digestive System (Eds: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND) 4th Edition, IARC Press, Lyons France, 2010, 304-313.

6. 研究組織

(1)研究代表者

福嶋 敬宜 (FUKUSHIMA NORIYOSHI)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：40384937

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし