

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月30日現在

機関番号：32653

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659659

研究課題名（和文）糖鎖プロファイリングによる胆道系悪性腫瘍の糖鎖分子マーカーの探索

研究課題名（英文）Exploration of carbohydrate molecular markers for biliary tract cancers by carbohydrate profiling.

研究代表者

山本 雅一（YAMAMOTO MASAKAZU）

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：60220498

研究成果の概要（和文）：組織標本の癌および非癌部領域の双方についてレクチンアレイによる比較糖鎖プロファイリングを行った結果、癌部で有意にシグナルが上昇するレクチン種（WFA）が見出された。WFAはMY.1E12抗体で認識されるmucin core polypeptide 1（MUC1）をキャリアー蛋白としていた。WFA-MY.1E12による簡易サンドイッチアッセイ系の構築し、胆道癌症例の胆管胆汁におけるWFA-MY.1E12を測定し数値解析したところ、CA19-9と比較して感度の面で良好なスコアが示された。

研究成果の概要（英文）：As a result of tissue-targeted lectin microarray analysis, we found that *Wisteria floribunda* agglutinin (WFA) is the best probe to differentiate biliary tract cancer lesions from normal bile duct epithelia (BDE) ($P < 0.0001$). The subsequent histochemical study confirmed cancer-specific WFA staining on the tissue specimens. Furthermore, the results of the experiments strongly implied that sialylated MUC1 is a candidate glycoprotein that carries biliary tract cancer-associated, WFA-reactive glycans. Therefore, we developed a new WFA-MY.1E12 sandwich detection ELISA that is a highly sensitive diagnostic method for biliary tract cancers using bile specimens. The diagnostic sensitivity of WFA-MY.1E12 for the detection of biliary tract cancers were found to be superior to that of CA19-9.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器外科

キーワード：肝内胆管癌，バイオマーカー，糖鎖医学，レクチン，胆道癌モデル

1. 研究開始当初の背景

胆道癌は予後不良の癌腫である。胆道癌の発癌機序には、胆嚢癌が胆石症に合併することが多いこと、胆管癌が原発性硬化性胆管炎、肝吸虫症、肝内結石症より発生することより、胆道上皮の慢性持続性炎症が関与することが以前より多くの基礎および臨床研究より証明されている。このように胆道癌の周囲には慢性的炎症病態が存在しており、その発生と進

展環境の複雑性、また、それに関連すると考えられる癌進展様式の多様性を示すことより、最新の画像診断を駆使しても早期発見は困難な場合が多い。さらに、従来の腫瘍マーカーも殆どのものは有用性に乏しい状況である。胆道癌の治療成績の向上には、早期診断のための新しい分子マーカーの探索と診断システムの開発が重要である。

糖鎖は「細胞の顔」とも呼ばれており、上皮細胞の表面形質である粘液糖蛋白の糖鎖構造は癌化により変化する。これには糖鎖を合成する遺伝子群（糖鎖遺伝子）のスイッチが正常細胞と癌細胞では異なることが関係している。日常臨床に用いられている腫瘍マーカーの多くは糖鎖抗原である。タンパク質に付加した糖鎖は、癌の発生や進展の生物機能とも密接にリンクしている。これらを踏まえて、分担者の正田らは胆道癌の臨床標本の解析より、癌細胞表面に存在しその悪性挙動に重大な影響を与える分子の粘液糖蛋白の異常と糖転移酵素の発現異常について報告してきた。

このような状況下、糖鎖の構造解析に向けた技術開発競争が各国間で激化している。本邦では産業技術研究所が世界に先駆けて、「レクチンマイクロアレイ」を用いた糖鎖プロファイリングシステムの開発に成功した。組織標本における異常糖鎖構造の解析が可能となり、糖鎖工学の医療技術への応用に弾みがついている。

2. 研究の目的

先に述べたように、肝内胆管癌（IHCC）は完全治癒の期待出来ない難治性の癌である。近年、本邦ならびに欧米諸国では IHCC の発生率は増加傾向にある。その治療成績の向上には、早期診断のための鋭敏な分子マーカーの探索が急務である。そこで今回は、高感度糖鎖プロファイリング解析による IHCC の特異的糖蛋白質マーカーの探索とその高感度検出システムの構築を行う。

具体的には、探索された糖鎖分子マーカーが胆道癌の臨床標本にも検出されるかを解析し、臨床成績、病理データの視点より、早期診断、悪性度、生命予後や治療効果判定のマーカーとしての臨床的意義を検討する。絞り込まれたレクチン種とキャリアー分子による早期診断の ELISA システムの開発に繋げる。

3. 研究の方法

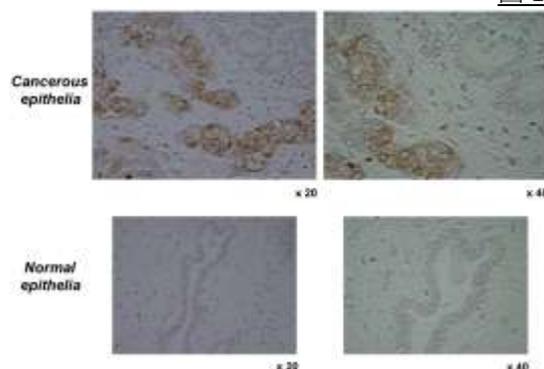
新規 IHCC マーカーの探索に向けて、先ず癌特異的なプローブレクチンを見出すために、ホルマリン固定組織切片を材料とし癌領域・非癌領域についてレクチンアレイによる比較糖鎖プロファイリングを施行する。統計学的手法による詳細な解析を行い、癌で最も有意にシグナルが上昇するレクチンを見出す。さらに、組織染色においても本シグナルが有意な差を示すことが確認する。一方、この癌特異的染色と、IHCC を含む胆管癌の悪性度に相関があることが報告されているキャリアー蛋白分子について、免疫沈降とプロテオーム解析にて検索する。胆管癌患者の胆汁からビオチン化レクチン-ストレプトアビ

ジンビーズにより共沈降した分子を詳細に解析する。

4. 研究成果

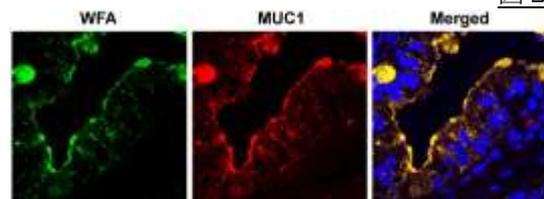
組織標本の癌および非癌部領域の双方についてレクチンアレイによる比較糖鎖プロファイリングを施行した。その結果より、癌部で有意にシグナルが上昇するレクチン種（WFA）が見出された。本レクチン種の陽性率は、肝内胆管癌（IHCC）88%、混合型肝癌 胆管癌（CC）部分 80%/肝細胞癌（HCC）部分 0%、HCC 0%、正常肝内胆管 32%であった。WFAは組織染色において、IHCC癌部に特異的な染色様式（apical-, cytoplasmic-, diffuse-type）を示した（[図1](#)）。

[図1](#)



蛍光免疫染色にて、WFAはMY. 1E12抗体で認識されるmucin core polypeptide 1（MUC1）と一部 merge していた（[図2](#)）。このことより、WFA- MY. 1E12の胆管癌の検出に向けた有用性の検証のために、WFA-MY. 1E12（レクチン-抗体）による簡易サンドイッチアッセイ系の構築した。本アッセイ系を用いて、肝内胆管癌、肝外胆管癌と胆道系良性疾患より得られた胆管胆汁におけるWFA-MY. 1E12を測定し数値解析したところ、胆汁中CA19-9と比較して感度の面で良好なスコアが示された。胆管癌症例について、胆汁中WFA-MY. 1E12レベルと胆汁細胞診の結果を比較検討したところ、前者の優位性が示された。さらに、本サンドイッチアッセイ系は、胆汁に加えて、血清においてもWFA-MY. 1E12の測定可能であることが判明した。

[図2](#)



高感度糖鎖プロファイリング解析により肝

内ならびに肝外胆管癌に特異的な糖蛋白質マーカーを見出した。今後、より大規模なバリデーションを行うとともに、血清試料についても検討していく予定である。

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 13 件)

- ① Ariizumi S, Kotera Y, Takahashi Y, Katagiri S, Yamamoto M: Impact of hepatectomy for huge solitary hepatocellular carcinoma. J Surg Oncol 2012, In press.
- ② Katagiri S, Ariizumi S, Kotera Y, Takahashi Y, Yamamoto M: Right hepatectomy using Glissonean pedicle transection method with anterior approach (with video). J Hepatobiliary Pancreat Sci 19:25-9, 2012.
- ③ Ohki T, Yamato M, Ota M, Takagi R, Murakami D, Kondo M, Sasaki R, Namiki H, Okano T, Yamamoto M: Prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection using tissue-engineered cell sheets. Gastroenterology 143:582-588, 2012.
- ④ Yamamoto M, Katagiri S, Ariizumi S, Kotera Y, Takahashi Y.: Glissonean pedicle transection method for liver surgery (with video). J Hepatobiliary Pancreat Sci 19:3-8, 2012.
- ⑤ Nakayama M, Yamada N, Kumashiro Y, Kanazawa H, Yamato M, Okano T.: Thermoresponsive poly (N-isopropylacrylamide)- based block copolymer coating for optimizing cell sheet fabrication. Macromol Biosci 12:751-60, 2012.
- ⑥ Seto K, Shoda J, Horibe T, Warabi E, Ishige K, Yamagata K, Kohno M, Yanagawa T, Bukawa H, Kawakami K: Interleukin-4 receptor α -based hybrid peptide effectively induces antitumor activity in head and neck squamous cell carcinoma. Oncology Report 2013, In press.
- ⑦ Onuki K, Sugiyama H, Ishige K, Kawamoto T, Ota T, Ariizumi S, Yamato M, Kadota S, Takeuchi K, Ishikawa A, Onodera M, Onizawa K, Yamamoto M, Miyoshi E, Shoda J: Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in the subserosal layer correlates with postsurgical survival of pathological tumor stage 2 carcinoma of the

gallbladder. J Gastroenterol 2013, In press.

- ⑧ Shoda J, Ishige K, Sugiyama H, Kawamoto T: Biliary tract carcinoma: clinical perspective on molecular targeting strategies for therapeutic options. JHBPS 19:342-353, 2012.
- ⑨ Suzuki R, Ariizumi S, Araida T, Hayashi K, Yamamoto M: Gastrectomy and chemotherapy with S-1 for gastric cancer in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. Int J Clin Oncol 16:71-5, 2011.
- ⑩ Sugiyama H, Onuki K, Ishige K, Baba N, Ueda T, Matsuda S, Takeuchi K, Onodera M, Nakanuma Y, Yamato M, Yamamoto M, Hyodo I, Shoda J: Potent *in vitro* and *in vivo* antitumor activity of sorafenib against human intrahepatic cholangiocarcinoma cells. J Gastroenterol 46:779-789, 2011.
- ⑪ Ariizumi S, Kotera Y, Takahashi Y, Katagiri S, Chen IP, Ota T, Yamamoto M: Mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma with marked enhancement on arterial-phase computed tomography reflects favorable surgical outcomes. J Surg Oncol 104:130-9, 2011.
- ⑫ Furukawa T, Hatori T, Fujita I, Yamamoto M, Kobayashi M, Ohike N, Morohoshi T, Egawa S, Unno M, Takao S, Osako M, Yonezawa S, Mino-Kenudson M, Lauwers GY, Yamaguchi H, Ban S, Shimizu M.: Prognostic relevance of morphological types of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. Gut 60:509-16, 2011.
- ⑬ Takahashi H, Nakayama M, Itoga K, Yamato M, Okano T.: Micropatterned thermoresponsive polymer brush surfaces for fabricating cell sheets with well-controlled orientational structures. Biomacromolecules 12:1414-8, 2011.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 樋口亮太, 梶山英樹, 谷澤武久, 小貫建一郎, 植村修一郎, 濱野美枝, 竹下信啓, 古川 徹, 太田岳洋, 新井田達雄, 山本雅一: 左三区域切除兼肝外胆道切除にて切除し得た Binf 陽性胆嚢癌の 1 例. 第 84 回日本胆道学会学術集会 (東京), 2012.
- ② 岡田浩介, 藤 栄治, 正田純二. 疾病モデルより解明された肝病態に対する転写因子 Nrf2 の演じる生体防御機構. 第 88 回日本消化器病学会総会 (東京), 2012.
- ③ 岡田浩介, 藤 栄治, 徳重克年, 石井哲

郎, 橋本悦子, 正田純一. *Nrf2/p62* 遺伝子二重欠損マウスは脂肪性肝炎を自然発症し, 肝腫瘍を発生する. 第48回日本肝臓学会総会 (東京), 2012.

- ④ 正田純一. 胆石の種類と成因. 日本胆道学会認定指導医養成講座3. 第48回日本胆道学会学術集会 (東京), 2012.
- ⑤ 正田純一: 胆管がんに対するハイブリッドペプチドの新しいバイオ療法 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」(東京), 2012.

[図書] (計4件)

- ① 正田純一: 胆石症・胆道炎・胆道がん 胆石症 概念・定義と疫学 最新医学社(大阪), pp.13-25 2011.
- ② 正田純一: 漢方薬の有効性と医療科学 インチンコウ湯 漢方薬の薬効と薬理 日本伝統医学テキスト 漢方編 平成22・23年度厚生労働科学研究費補助金 地域医療基盤開発推進研究事業「統合医療を推進するための日本伝統医学の標準化」研究班 pp. 295-297, 2012.
- ③ Shoda J: Inchinkoto, Clinical efficacy and pharmacology, Textbook of Traditional Japanese Medicine, Health and Labour Sciences Research Grant, Research on the standardization of traditional Japanese Medicine promoting integrated medicine. pp. 230-232, 2012.
- ④ Shoda J & Yamamoto M: Gallbladder Cancer Pathogenesis and Molecular Targeting Strategies for Therapeutic Options. Horizons in Cancer Research. Volume 48. pp.1-24. NOVA Science, 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本雅一 (YAMAMOTO MASAKAZU)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号: 60220498

(2) 研究分担者

有泉俊一 (ARIIZUMI SYUNNICHI)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号: 40277158

太田岳洋 (OHTA TAKEHIRO)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70203792

正田純一 (SHODA JUNICHI)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 90241827