

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24501337

研究課題名(和文) 予後改善を目指した膵悪性腫瘍の統合的病態解明と新規治療標的の探索

研究課題名(英文) Integrated analysis and detection of new therapeutic target aimed for improvement of prognosis in the patients with pancreatic malignant neoplasms

研究代表者

石原 武 (Ishiara, Takeshi)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：60312948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、網羅的メタボローム解析の結果、膵癌手術検体50症例を検討し約200種類のイオン性代謝物を同定し、膵癌において特異的な酵素活性異常を示す可能性のある代謝物を抽出した。また腫瘍部では非腫瘍部に比べて、乳酸の蓄積ならびにグルコースの低下がみられ、IPMA、IPMC、膵癌と、生物学的悪性度が進行すると顕著となることがわかった。また健常人96例、膵癌51例、IPMN7例の血清解析では、主成分分析にて健常人と比較し明らかな差異を認め、膵液解析ではメタボローム解析は困難であったが、IPMN46例で膵液中CEA濃度と良悪性が有意に関連し、免疫染色の結果と一致し、良悪性診断に有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used a comprehensive metabolomics technology to find metabolic biomarkers associated with pancreatic neoplasm. We identified about 200 metabolites of which concentration were higher in pancreatic cancer (PC, n=50) than normal pancreatic tissues. We also found lactate accumulation and decreased level of glucose in PC, which were detected more frequently as histologic grade progressed from intraductal papillary mucinous adenoma (IPMA), IPMC, to PC. With using serum samples, principal component analysis revealed significant difference between PC (n=51), IPMN (n=7) and healthy control subjects (n=96). Metabolomic analysis using pancreatic juice (PJ) samples could not revealed apparent difference. We examined CEA levels in PJ of 46 IPMN patients. CEA level of PJ in malignant IPMN was significantly higher than benign, which was consistent with result of CEA immunohistochemical analysis. CEA level of PJ might be useful for differentiation of malignant IPMN.

研究分野：膵疾患

キーワード：膵悪性腫瘍 メタボローム 膵液

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌は近年増加傾向にあり、本邦死因の第4位となっている。しかし他疾患と比較し5年生存率が7%と非常に悪く、最難治癌の一つと考えられる。この難治性の原因として、切除不能例に有効な治療法がないこと、および早期発見が困難で、発見時に手術適応がない症例が大部分であることがあげられる。膵癌の早期発見に関しては、以前我々は経鼻膵管ドレナージチューブ(ENPD)下の膵液細胞診にて膵上皮内癌を診断しえた報告をしている。

癌細胞におけるエネルギー代謝の異常は古くより「ワールブルグ効果」として知られ、また、2011年には癌細胞の異常性を定義する8つの特徴のうちの一つとして「エネルギー代謝のリプログラミング」が提唱されている。生体内代謝物質レベルの変化についてバイアスをかけず網羅的に解析するのがメタボロミクスであり、新規マーカー、治療標的探索ツールとして注目されている。

## 2. 研究の目的

今回膵悪性腫瘍のメタボロームに着目し、がん細胞の代謝という観点から新規治療法の探索を行う。また膵液を用いた膵悪性腫瘍早期発見マーカーの確率を目指し、新規マーカーの検討、および近年報告のある膵液腫瘍マーカーについての解析を行った。

## 3. 研究の方法

網羅的メタボローム解析はキャピラリー電気泳動-質量分析装置(capillary electrophoresis-mass spectrometry:CE-MS)を用いて陽イオンおよび陰イオン性代謝物の一斉分析を行った。グルコースに関しては、液体クロマトグラフィー-質量分析装置(LC-MS)を用いて定量値を算出した。グルコース下流の中心代謝経路(解糖系、ペントースリン酸回路、TCA回路)の他、アミノ酸の異化産物経路やプリン代謝、ピリミジン代謝、尿素回路の中間体につき、臓器1gあたりのモル量(nmol)を算出し検討した。CE-MS測定で得られたデータは、CE-MS解析に特化したソフトウェア(MasterHands)にて解析した。外科手術後に速やかに-80度へ凍結保存した、計50検体(膵癌27例、膵管内乳頭粘液性腺癌:Intraductal Papillary Mucinous Carcinoma(IPMC)17例、Intraductal Papillary Mucinous Adenoma(IPMA)6例の腫瘍部と非腫瘍部の平均値を比較検討した。また人間ドックで採取した健常人96例、膵癌51例、Intraductal Papillary Mucinous Neoplasia(IPMN)7例の血清の解析も行った。

膵液の解析では、膵管造影(ERCP)もしくは、経鼻膵管ドレナージチューブ

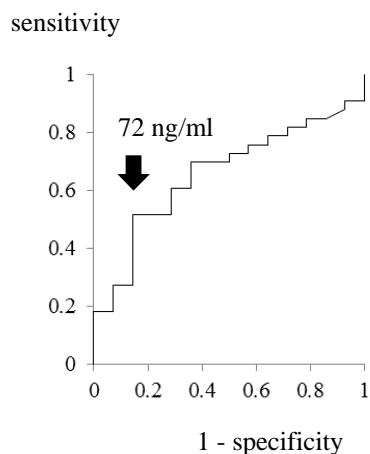
(ENPD)チューブ留置下に採取した膵液を用いた。膵癌と慢性膵炎患者について、マルチプレックスビーズアッセイにて血管新生関連サイトカインについて、またIPMN症例については、腫瘍マーカー(CEA、CA19-9、KL6、CA125等)について検討を行った。

## 4. 研究成果

(1)手術検体50例の検討で、膵癌において約200種類のイオン性代謝物を同定した。また腫瘍部と非腫瘍部の平均値を比較検討し、腫瘍部では非腫瘍部に比べて、乳酸の蓄積ならびにグルコースの低下がみられ、これまでの報告のある大腸がん・胃がん同様、Warburg効果を示すことがわかった。また腫瘍組織での比較ではIPMA→IPMC→膵癌と生物学的悪性度が高くなるにつれて、乳酸の蓄積ならびにグルコースの低下が進行することが明らかとなった。26年後は同定した代謝物の中から、正常組織と比較して生物学的悪性度が高くなるにつれ低下する、あるいは上昇する代謝物を抽出した。これら代謝物に關与する代謝酵素、例えばornithineからputrescineへ変換するornithine decarboxylaseや、hypoxanthineからxanthineへ変換するxanthine dehydrogenaseは膵癌組織で活性が亢進していると考えられ、これらは膵癌における特異的な酵素活性異常を示す可能性があり、新規創薬標的となりうると思われる。

(2)人間ドックで採取した健常人96例、膵癌51例、IPMN7例の血清の解析の結果は、主成分分析にて健常人と比較し明らかな差異を認められた。健常人と比較し膵癌で高値となる代謝物も同定され、これらは新規膵癌マーカーの候補となりうると思われる。今後鑑別対象となる慢性膵炎50例、前癌病変あるいは早期膵癌と考えられるIPMN80例を対象として、新規マーカーのさらなる絞り込みを行えればと考えている。

(3)膵液を用いた癌診断の解析においては、メタボローム解析は膵液濃度の変動が症例毎に大きく解析が困難であった。また膵液中のサイトカインの検討についても癌と良性疾患において明らかな差を認める物質を抽出することができなかった。IPMN症例における膵液腫瘍マーカーの検討では、膵液中CEA濃度が良性と比較して悪性病変で有意に高値であった。膵液中CEA濃度測定を行った46例について良悪性鑑別に有用なカットオフ値を計算した。ROC曲線(下図)より得られた解析では膵液中CEA濃度が72ng/ml以上を悪性とし、膵液細胞診と組み合わせると、感度67%、正診率72%と良好な成績が得られた。



また 32 例において手術検体を用いて CEA 免疫染色を行った。術後検体の解析では CEA 免疫染色の評価を陰性、弱陽性、強陽性と 3 段階に分類し、膵液 CEA 濃度との関連を検討した。その結果、順位相関係数 0.67 ( $p < 0.01$ ) と有意な正の相関を認め、膵液中 CEA が組織 CEA 分泌を反映していると考えられた。CEA 免疫染色濃度が強陽性の症例では有意に悪性病変が多く、膵液 CEA 濃度が良悪性鑑別に有用と考えられた。

#### 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 3 件)

Jiang X, Kanda T, Nakamoto S, Haga Y, Sasaki R, Nakamura M, Wu S, Mikata R, Yokosuka O. Knockdown of glucose-regulated protein 78 enhances poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in human pancreatic cancer cells exposed to endoplasmic reticulum stress. 査読有り  
Oncol Rep. 2014 Dec;32(6):2343-8. doi: 10.3892/or.2014.3533.

Mikata R, Ishihara T, Tada M, Tawada K, Saito M, Kurosawa J, Sugiyama H, Sakai Y, Tsuyuguchi T, Miyazaki M, Yokosuka O. Clinical usefulness of repeated pancreatic juice cytology via endoscopic naso-pancreatic drainage tube in patients with pancreatic cancer 査読有り. J Gastroenterol. 2013 Jul;48(7):866-73. doi: 10.1007/s00535-012-0684-y.

Tawada K, Ishihara T, Yamaguchi T, Tsuyuguchi T, Hara T, Tada M, Mikata R, Sakai Y, Sugiyama H, Saito M, Kurosawa J, Nishikawa T, Yoshitomi H, Ohtsuka M, Miyazaki M, Yokosuka O. Comparison of branch duct and main pancreatic duct mural nodules in intraductal papillary mucinous neoplasm. 査読有り Pancreas. 2013 Oct;42(7):1193-5. doi: 10.1097/MPA.0b013e31828f9725.

〔学会発表〕(計 5 件)

Mikata R, Ishihara T, Differentiation of Malignant and Benign IPMN by repeated pancreatic juice cytology combination with CEA level in pancreatic juice. The 20<sup>th</sup> meeting of the International Association of Pancreatology 2016 年 8 月 5 日 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

平山明由, 三方 林太郎, 曾我朋義 キャピラリー電気泳動 - 質量分析法 (CE-MS) を用いたすい臓癌のメタボローム解析 日本生化学学会 2014 年 10 月 15 日 ~ 18 日 国立京都国際会館 (京都府・京都市)

三方 林太郎, 石原 武 膵癌早期診断における ENPD 留置下膵液細胞診の有用性の検討 第 45 回日本膵臓学会大会 2014 年 07 月 12 日 北九州国際会議場(福岡県・北九州市)

多田 素久, 三方 林太郎, 石原 武 病態解明を目指した膵腫瘍の網羅的メタボローム解析 第 44 回日本膵臓学会大会 2013 年 07 月 25 日 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

多田 素久, 三方 林太郎, 石原 武 肝癌・膵腫瘍における網羅的メタボローム解析 第 50 回日本臨床分子医学会学術集会 2013 年 04 月 12 日 東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石原 武 (Ishihara Takeshi)  
千葉大学・大学院医学研究院・特任教授  
研究者番号：60312948

### (2) 研究分担者

三方 林太郎 (Mikata Rintaro)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：60596146

### (3) 研究分担者

多田 素久 (Tada Motohisa)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：554239  
(平成 25 年 10 月 31 日移動のため削除)

### (4) 研究協力者

平山 明由 (Hirayama Akiyoshi)  
慶応大学・先端生命科学研究所・助教  
研究者番号：572405

### (5) 研究協力者

曽我 朋義 (Soga Tomoyoshi)  
慶応大学・先端生命科学研究所・教授  
研究者番号：60338217