

# Analysis of Tumor-Related Genes In Pancreatic Juice Aiming to be Useful for Early Diagnosis of Pancreatic Cancer

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-12-15 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Sawabu, Norio メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24517/00049342">https://doi.org/10.24517/00049342</a>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



KAKEN
2004
14

金 沢 大 学

# 膵液中の癌関連遺伝子異常を指標とした 膵癌の早期診断に関する研究

(研究課題番号：14370177)

平成14年度～平成16年度科学研究費補助金(基盤研究(B)(2))

研究成果報告書

平成 17 年 5 月

研究代表者 澤 武 紀 雄

金沢大学附属図書館 (金沢大学がん研究所腫瘍内科)



0500-04110-5

## 研究組織

研究代表者：澤 武 紀 雄(金沢大学がん研究所 教授)

研究分担者：元 雄 良 治(金沢大学がん研究所 助教授)

研究分担者：渡 邊 弘 之(金沢大学医学部附属病院 講師)

研究分担者：山 口 泰 志(金沢大学がん研究所 助手)

## 交付決定額(配分額)

	直接経費	間接経費	合計
平成 14 年度	2,900 千円	0 円	2,900 千円
平成 15 年度	1,600 千円	0 円	1,600 千円
平成 16 年度	1,600 千円	0 円	1,600 千円
総計	6,100 千円	0 円	6,100 千円

## 研究発表

### (1)学会誌等

- 1) Okai, T., Fujii, T., Ida, M., Ueda, H. and Sawabu, N. EUS and ERCP features of nonalcoholic duct-destructive, mass-forming pancreatitis before and after treatment with prednisolone. *Abdom Imaging*, 27: 74-6, 2002.
- 2) Su, S.B., Motoo, Y., Xie, M.J., Mouri, H., Asayama, K. and Sawabu, N. Superoxide dismutase is induced during rat pancreatic acinar cell injury. *Pancreas*, 24: 146-52, 2002.
- 3) Xie, M.J., Motoo, Y., Su, S.B., Iovanna, J.L. and Sawabu, N. Effect of carboxamide derivative (IS-741) on rat chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci*, 47: 139-47, 2002.
- 4) Wakabayashi, T., Kawaura, Y., Satomura, Y., Fujii, T., Motoo, Y., Okai, T. and Sawabu, N.

- Clinical study of chronic pancreatitis with focal irregular narrowing of the main pancreatic duct and mass formation: Comparison with chronic pancreatitis showing diffuse irregular narrowing of the main pancreatic duct. *Pancreas*, 25: 283-9, 2002.
- 5) Xie, M.J., Motoo, Y., Su, S.B., Mouri, H. and Sawabu, N. Induction of chemokines in rat pancreatic acinar cell injury. *Pancreas*, 24: 198-204, 2002.
  - 6) Xie M.J., Motoo, Y., Su, S.B., Mouri, H., Ohtsubo, K., Matsubara, F. and Sawabu, N. Expression of clusterin in human pancreatic cancer. *Pancreas*, 25: 234-8, 2002.
  - 7) Sabet, E.A., Okai, T., Minamoto, T., Mai, M. and Sawabu, N. Three-dimensional endoscopic ultrasonography for the assesment of early gastric carcinoma invasion: Could it provide diagnostic innovations? *Digest Endosc*, 14: 53-60, 2002.
  - 8) Wang ,Y., Yamaguchi,Y., Watanabe,H., Ohtsubo,K., Wakabayashi,T. and Sawabu,N. Usefulness of *p53* gene mutations in the supernatant of bile for diagnosis of biliary tract carcinoma: comparison with *K-ras* mutation. *J Gastroenterol*, 37: 831-9, 2002.
  - 9) 渡辺弘之, 山口泰志, 王 穎, 大坪公士郎, 澤武紀雄. 肝胆膵癌の腫瘍マーカー; *K-ras* と *p53*. *肝胆膵* 44(6):779-788, 2002.
  - 10) 澤武紀雄. 腫瘍マーカーの選択と解釈. 今日の内臓器疾患の治療指針(第 2 版), 医学書院, 東京, 多賀須幸男, 他(編):112-114, 2002.
  - 11) 澤武紀雄. 巻頭言;肝胆膵癌における腫瘍マーカーの現状と展望. *肝胆膵* 44(6):717-719, 2002.
  - 12) Sabet, EA., Okai, T., Minamoto, T., Mai, M. and Sawabu, N. Visualizing the gastric wall with a 30-MHz ultrasonic miniprobe: *ex vivo* imaging of normal gastric sites and sites of early gastric cancer. *Abdom Imaging*, 28:252-256, 2003.
  - 13) Okai, T., Minamoto, T., Ohtsubo, K., Minato, H., Kurumaya, H., Oda, Y., Mai, M. and Sawabu, N. Endosonographic evaluation of c-Kit-positive gastrointestinal stromal tumor. *Abdom Imaging*, 28: 301-307, 2003.
  - 14) Xie, M.J., Motoo, Y., Iovanna, J.L., Su, S.B., Ohtsubo, K., Matsubara, F. and Sawabu, N. Overexpression of pancreatitis-associated protein (PAP) in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Dig Dis Sci*, 48(3): 459-464, 2003.

- 15) Ohtsubo, K., Watanabe, H., Yamaguchi, Y., Hu, Y.X., Motoo, Y., Okai, T. and Sawabu, N. Abnormalities of tumor suppressor gene *p16* in pancreatic carcinoma: Immunohistochemical and genetic findings compared with clinicopathological parameters. *J Gastroenterol*, 38: 663-671, 2003.
- 16) Motoo, Y., Xie, M.J., Su S.B. and Sawabu, N. Molecular mechanisms of therapeutic effects of Saiko-keishi-to on spontaneous chronic pancreatitis in the WBN/Kob rat. *J Trad Med*, 20(4): 132-138, 2003.
- 17) Wakabayashi, T., Kawaura, Y., Satomura, Y., Watanabe, H., Motoo, Y., Okai, T. and Sawabu, N. Clinical and imaging features of autoimmune pancreatitis with focal pancreatic swelling or mass formation: comparison with so-called tumor-forming pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Am J Gastroenterol*, 98(12): 2679-2687, 2003.
- 18) 澤武紀雄、渡辺弘之、山口泰志、大坪公士郎. 膵癌の分子生物学的診断. *肝胆膵* 47 (3): 345-351, 2003.
- 19) 澤武紀雄、渡辺弘之、山口泰志. 膵・胆道癌における腫瘍マーカー; 癌関連遺伝子を中心に、先端医療シリーズ; 肝・胆・膵 疾患の最新医療、先端医療技術研究所、東京、戸田剛太郎、他(編): 375-382, 2003.
- 20) Wang Y, Yamaguchi Y, Watanabe H, Ohtsubo K, Motoo Y, and Sawabu N. Detection of *p53* gene mutations in the supernatant of pancreatic juice and plasma from patients with pancreatic carcinomas. *Pancreas*, 28(1): 13-19, 2004.
- 21) Feng SY, Ota K, Yamada Y, Sawabu N, and Ito T. A yeast one-hybrid system to detect methylation-dependent DNA-protein interactions. *Biochem Biophys Res Commun*, 313(4): 922- 925, 2004.
- 22) Sawabu N, Watanabe H, Yamaguchi Y, Ohtsubo K, and Motoo Y. Serum tumor markers and molecular biological diagnosis in pancreatic cancer. *Pancreas*, 28(3): 263-267, 2004.
- 23) Motoo Y, Xie MJ, Mouri H, and Sawabu N. Expression of interleukin-8 in human obstructive pancreatitis. *Journal of the Pancreas (JOP)*, 5(3): 138-144, 2004.
- 24) Jiang PH, Motoo Y, Iovanna JL, Pebusque MJ, Xie MJ, Okada G, and Sawabu N. Tumor protein p53-induced nuclear protein 1(TP53INP1) in spontaneous chronic pancreatitis in the WBN/Kob rat : drug effects on its expression in the pancreas. *Journal of the*

- Pancreas (JOP), 5(4): 205-216, 2004.
- 25) Jiang PH, Motoo Y, Vaccaro MI, Iovanna JL, Okada G, and Sawabu N. Expression of vacuole-membrane protein-1 (VMP1) in spontaneous chronic pancreatitis in the WBN/Kob rat. *Pancreas*, 29(3): 225-230, 2004.
  - 26) Wakabayashi T, Kawaura Y, Satomura Y, Watanabe H, Motoo Y, and Sawabu N. Long-term prognosis of duct-narrowing chronic pancreatitis: Strategy for steroid treatment. *Pancreas*, 30(1): 31-39, 2005.
  - 27) Takahashi Y, Mai M, Sawabu N, and Nishioka K. A pilot study of individualized maximum repeatable dose (iMRD), a new dose finding system, of weekly gemcitabine for patients with metastatic pancreas cancer. *Pancreas*, 30(3): 206-210, 2005.
  - 28) Watanabe H, Okada G, Ohtsubo K, Yamaguchi Y, Mouri H, Motoo Y, Wakabayashi T, and Sawabu N. Expression of mesothelin mRNA in pure pancreatic juice from patients with pancreatic carcinoma, intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas, and chronic pancreatitis. *Pancreas*, 30(4): 349-354, 2005.
  - 29) Wakabayashi T, Kawaura Y, Satomura Y, Urabe T, Watanabe H, Motoo Y, and Sawabu N. Duct-narrowing chronic pancreatitis without immunoserological abnormality: Comparison with duct-narrowing chronic pancreatitis with positive serological evidence and its clinical management. *Dig Dis Sci* (in press).
  - 30) 渡辺弘之, 澤武紀雄. 腫瘍マーカー;その診断的意義と今後の展望; CA 19-9 と CA 50. *日本医師会雑誌* 131(5): 619-623, 2004.
  - 31) 山口泰志, 大坪公士郎, 渡辺弘之, 澤武紀雄. 膵癌の遺伝子診断. *外科治療* 90(3): 258-263, 2004.
  - 32) 澤武紀雄, 大坪公士郎, 山口泰志, 渡辺弘之. 分子生物学からみた膵癌のリスクファクター. *肝胆膵* 48(5): 567-572, 2004.
  - 33) Sawabu N, and Watanabe H. Altered expression of p27 protein in pancreatic carcinomas (Molecular pathology). Elsevier Science/ Academic Press, Hagat M.A. (eds)(in press).

## (2) 口頭発表

- 1) Yamaguchi Y, Wang Y, Watanabe H, Ohtsubo K, Motoo Y, Okai T, and Sawabu N.

Detection of *p53* gene mutations in the supernatant of pancreatic juice from patients with pancreatic carcinoma. 10<sup>th</sup> International Association of Pancreatology. 2002年3月24日, Heidelberg.

- 2) 山口泰志, 王 穎, 渡辺弘之, 大坪公士郎, 元雄良治, 岡井 高, 澤武紀雄. 胆汁中遺伝子診断の有用性; 特に上清を用いる利点. 99回 日本内科学会総会. 2002年3月24日, 名古屋.
- 3) 元雄良治, 澤武紀雄.  
パネル「ケモカインの消化器疾患での役割」膵炎におけるケモカインの発現とその意義. 88回 日本消化器病学会総会. 2002年4月25日, 旭川.
- 4) 若林時夫, 里村吉威, 澤武紀雄.  
ワークショップ「膵管狭細型慢性膵炎の病態と診断:膵癌との鑑別を含めて」限局性に腫瘤を形成した膵管狭細型慢性膵炎の病態と診断—アルコール性腫瘤形成膵炎および通常型膵癌との比較を中心に—. 88回 日本消化器病学会総会. 2002年4月25日, 旭川.
- 5) 大坪公士郎, 渡辺弘之, 山口泰志, 元雄良治, 岡井 高, 澤武紀雄.  
膵液における *p16* 癌抑制遺伝子異常の検討. 88回 日本消化器病学会総会, 2002年4月26日, 旭川.
- 6) 元雄良治, Xie MJ, 毛利久継, Iovanna JL, 澤武紀雄.  
膵癌における pancreatitis-associated protein (PAP)の発現. 88回 日本消化器病学会総会, 2002年4月27日, 旭川.
- 7) 元雄良治, 澤武紀雄.  
ワークショップ「膵炎とサイトカイン・ケモカイン」慢性膵炎におけるサイトカイン・ケモカインの発現動態;自然発症慢性膵炎モデルにおける検討. 33回 日本膵臓学会, 2002年9月5日, 仙台.
- 8) 若林時夫, 里村吉威, 澤武紀雄.  
ワークショップ「自己免疫性膵炎」血清免疫学的異常の有無からみた膵管狭細型膵炎の病態. 33回 日本膵臓学会, 2002年9月6日, 仙台.
- 9) 元雄良治, Xie MJ, 蘇 式兵, 毛利久継, 姜 培紅, 澤武紀雄.  
ヒト膵癌における pancreatitis-associated protein (PAP) の発現とその臨床的意義. 33回 日本膵臓学会, 2002年9月6日, 仙台.

- 10) 山口泰志, 王 穎, 渡辺弘之, 大坪公士郎, 藤井保治, 毛利久継, 元雄良治, 岡井 高, 澤武紀雄.  
膵癌患者血漿中 *p53* 遺伝子変異の検出. 33 回 日本膵臓学会, 2002 年 9 月 5 日, 仙台.
- 11) 渡辺弘之, 登谷大修, 澤武紀雄.  
シンポ「遺伝子診断を応用した消化器がん検診の可能性」十二指腸液中 *K-ras* 変異検索による膵・胆道癌のスクリーニング. 44 回 日本消化器病学会大会, DDW 2002 年 10 月 25 日, 横浜.
- 12) 元雄良治, 澤武紀雄.  
パネル「慢性膵炎の発症と進展」慢性膵炎の発症と進展の分子機構; 自然発症慢性膵炎モデル (WBN/kob ラット) における検討. 44 回 日本消化器病学会大会, DDW 2002 年 10 月 26 日, 横浜.
- 13) 若林時夫, 里村吉威, 卜部 健, 岩田 章, 金子周一, 小林健一, 岡井 高, 澤武紀雄.  
膵管狭細型膵炎の治療と予後に関する検討. 44 回 日本消化器病学会大会, DDW 2002 年 10 月 27 日, 横浜.
- 14) 渡辺弘之, 岡田源作, 大坪公士郎, 毛利久継, 藤井保治, 山口泰志, 元雄良治, 岡井 高, 澤武紀雄.  
各種膵疾患々々における膵液中 mesothelin mRNA 発現の検討. 22 回 日本分子腫瘍マーカー研究会, 2002 年 9 月 30 日, 東京.
- 15) 元雄良治, 澤武紀雄.  
パネルディスカッション「急性膵炎の重症化をめぐって; 予知と対策」急性膵炎重症化予知マーカーとしての血清 PAP 測定の意義. 89 回 日本消化器病学会総会, 2003 年 4 月 24 日, さいたま市.
- 16) 若林時夫, 里村吉威, 澤武紀雄.  
ワークショップ「自己免疫性膵炎; 概念の整理と我が国における実態」膵管狭細型慢性膵炎の治療と予後. 89 回 日本消化器病学会総会, 2003 年 4 月 26 日, さいたま市.
- 17) 渡辺弘之, 岡田源作, 大坪公士郎, 毛利久継, 藤井保治, 山口泰志, 元雄良治, 岡井 高, 澤武紀雄.  
膵液中 mesothelin mRNA 発現に関する検討. 89 回 日本消化器病学会総会, 2003 年 4 月 25 日, さいたま市.
- 18) 元雄良治, J.L.Iovanna, J-C,Dagon, 毛利久継, 大坪公士郎, 山口泰志, 渡辺弘之, 澤武



紀雄.

膵癌における pancreatitis associated protein(PAP)の発現:血清・膵液・組織レベルでの検討. 34回 日本膵臓学会, 2003年7月11日, 千葉.

19) 大坪公士郎、岡井 高、山口泰志、渡辺弘之、元雄良治、澤武紀雄.

超音波内視鏡(EUS)による慢性膵炎の診断に関する検討. 34回 日本膵臓学会, 2003年7月11日, 千葉.

20) 若林時夫、里村吉威、澤武紀雄.

血清免疫学的異常を伴わない膵管狭細型慢性膵炎の検討—自己免疫性膵炎の診断における胆管狭窄の意義. 34回 日本膵臓学会, 2003年7月12日, 千葉.

21) 渡辺弘之、山口泰志、登谷大修.

シンポジウム「膵胆道癌—早期診断の進歩」膵胆道癌の早期診断をめざした診断体系における遺伝子診断の位置づけ. 45回 日本消化器病学会大会, DDW 2003, 2003年10月15日, 大阪.

22) 姜培紅、元雄良治、J.L.Iovanna, M.J.Xie, 毛利久継、岡田源作、大坪公士郎、山口泰志、渡辺弘之、澤武紀雄.

(プレナリーセッション)自然発症慢性膵炎モデル(WBN/Kob ネット)における tumor protein *p53*-inducible nuclear protein I(TP53INP1)の発現動態. 45回 日本消化器病学会大会, DDW 2003, 2003年10月16日, 大阪.

23) 岡田源作、渡辺弘之、毛利久継、大坪公士郎、山口泰志、元雄良治、澤武紀雄.

Real-time PCR法による膵癌患者の血清中h TERT mRNAの定量的測定. 23回 日本分子マーカー研究会, 2003年9月24日, 名古屋.

24) Motoo Y. Mouri H. Ohtsubo K. Yamaguchi Y. Watanabe H. and Sawabu N.

Expression of pancreatitis-associated protein (PAP) in human pancreatic cancer: analysis in serum, pancreatic juice and tissues. 7<sup>th</sup> International Symposium on Predictive Oncology & Intervention Strategies. 2004年2月8日, Nice.

25) Ohtsubo K. Watanabe H. Yamaguchi Y. Mouri H. Motoo Y. and Sawabu N.

Detection of *ppENK* hypermethylation in pure pancreatic juice for diagnosis of pancreatic carcinoma. 11<sup>th</sup> International Association of Pancreatology (IAP). 2004年7月11日, Sendai.

26) Watanabe H. Okada G. Ohtsubo K. Yamaguchi Y. Mouri H. Motoo Y. and Sawabu N.

Detection of *mesothelin* mRNA in the pancreatic juice from the patients with various

- pancreatic diseases. 11<sup>th</sup> International Association of Pancreatology (IAP). 2004年7月12日, Sendai.
- 27) Motoo Y. Jiang P-H. Iovanna JL. and Sawabu N.  
Gene expression kinetics of *TP53INP1* and *VMP1* in chronic pancreatitis in the WBN/Kob rat. 11<sup>th</sup> International Association of Pancreatology (IAP). 2004年7月13日, Sendai.
- 28) Wakabayashi T. Satomura Y. Urabe T. Watanabe H. Motoo Y. and Sawabu N.  
Long-term prognosis of duct-narrowing chronic pancreatitis: indications for steroid treatment. 11<sup>th</sup> International Association of Pancreatology (IAP). 2004年7月14日, Sendai.
- 29) 毛利久継, 元雄良治, 大坪公士郎, 山口泰志, 渡辺弘之, 澤武紀雄.  
ヒト慢性膵炎におけるインターロイキン8の発現. 101回 日本内科学会総会, 2004年4月8日, 東京.
- 30) 元雄良治, 澤武紀雄.  
慢性膵炎の進展機序の基礎的検討と治療薬の効果:新規膵炎関連蛋白の発現動態を中心に. 90回 日本消化器病学会総会, 2004年4月21日, 仙台.
- 31) 山口泰志, 毛利久継, 大坪公士郎, 岡田源作, 渡辺弘之, 元雄良治, 澤武紀雄.  
各種消化器癌患者における血清中 Midkine 値の測定. 90回 日本消化器病学会総会, 2004年4月22日, 仙台.
- 32) 大坪公士郎, 渡辺弘之, 山口泰志, 毛利久継, 元雄良治, 澤武紀雄.  
膵癌診断を目指した膵液中 *ppENK* のメチル化異常に関する検討. 90回 日本消化器病学会総会, 2004年4月23日, 仙台.
- 33) 岡田源作, 馮 疎影, 大坪公士郎, 渡辺弘之, 元雄良治, 澤武紀雄.  
膵液中 *SARP2* のメチル化を指標とした膵癌遺伝子診断. 24回 日本分子腫瘍マーカー研究会, 2004年9月28日, 福岡.
- 34) 若林時夫, 里村吉威, 澤武紀雄.  
パネルディスカッション「自己免疫性膵炎をめぐる新しい展開」血清免疫学的異常を伴わない膵管狭細型慢性膵炎の検討. 46回 日本消化器病学会大会, DDW'04, 2004年10月21日, 福岡.
- 35) 渡辺弘之, 岡田源作, 毛利久継, 大坪公士郎, 山口泰志, 元雄良治, 澤武紀雄.  
Real-time PCR 法による *hTERT*mRNA の定量的測定法の確立と膵癌患者血清を用いた測

定. 46 回 日本消化器病学会大会, DDW'04, 2004 年10月 22 日, 福岡.

36) 毛利久継, 山口泰志, 大坪公士郎, 岡田源作, 渡辺弘之, 元雄良治, 澤武紀雄.  
各種消化器癌患者における血清 Midkine 測定の意義. 46 回 日本消化器病学会大会,  
DDW'04, 2004 年10月 23 日, 福岡.

37) 若林時夫, 川浦幸光, 里村吉威, 卜部 健, 渡辺弘之, 元雄良治, 澤武紀雄.  
膵管狭細型慢性膵炎の治療と予後. 68 回 日本消化器内視鏡学会総会, DDW'04, 2004  
年10月 24 日, 福岡.

## 研究成果の概要

難治癌の代表的な存在である膵癌では胃や大腸癌のように生検が容易でなく、また膵液細胞診の有用性も低い。このようなことより膵液を用いた遺伝子診断に大きな期待が寄せられている。私共は内視鏡的に採取した膵液中の *K-ras* と *p53* の遺伝子変異が膵癌診断に有用なことを内外に先駆けて明らかにした。前者では感度は良好ではあるが、偽陽性がかなりみられ、癌特異性が問題になる。後者では癌特異性は優れているが、感度は 40% 余りであり、さらに有用な新たな分子腫瘍マーカーを用いた検出法の開発が望まれる。そこで、血清生化学的検査や US 検査にて膵の異常が疑われる患者において超音波内視鏡 (EUS) を用いて、膵の異常の有無を検索する。このようなスクリーニングにおいて膵に何らかの所見のある場合に、患者の同意を得て内視鏡下経乳頭的に膵液採取を行う。得られた膵液の主として上清において *mesothelin* mRNA や *h-TERT* (human telomerase reverse transcriptase) mRNA を定量的に測定する。また、*ppENK*, *SARP2*, *CLDN-5*, *NPTX-2* などの癌関連遺伝子のメチル化異常を検討する。加えて、従来行ってきた *p53* 変異の検出と *K-ras* 変異の定量的測定を行い、これら一連の検索が膵癌の早期診断や鑑別診断においてどのように有用であるかを解明しようとした。さらに、臨床病理学的事項との関連を検討し、こらら遺伝子異常の検索が悪性度や予後判定において如何なる意義を有するかを明らかにしようとした。膵癌か慢性膵炎かの鑑別が困難な場合には、EUS 誘導下細径針吸引膵生検 (FNAB) を行い、得られた膵細胞成分において上述の膵液の場合と同様な検討を行い、加えて、そのスメアの *p53* 染色を加味した細胞診や FISH 法による染色体異常も検索し、それらの診断的意義を明らかにしようとした。

本研究では次のような課題について、研究をすすめることにした。

- 1) 膵液の沈渣のみならず上清より DNA を抽出し、*K-ras*, *p53*, *p16* の変異を検索して、遺伝子診断における膵液の上清を用いる利点の解明。
- 2) 胆汁中における *K-ras* と *p53* の遺伝子変異検出の胆道癌と膵癌診断における有用性。
- 3) 膵液中 *mesothelin* mRNA 測定の膵癌診断における有用性。
- 4) 膵液および血液中 *h-TERT* mRNA の定量的測定法の確立とその膵癌診断における有用性。
- 5) 膵液中 *ppENK*, *SARP2*, *CLDN-5*, *NPTX-2* などの癌関連遺伝子のメチル化異常の測定とその膵癌診断における意義。
- 6) EUS 誘導下細径針吸引膵生検 (FNAB) 材料の膵癌遺伝子診断への応用。

課題 1), 2) に関して得られた成果については原著論文として *Pancreas* と *J Gastroenterol* に各々 2 編ずつ計 4 編の論文が掲載されているので、この報告書に付した。また、課題 3) に関して得られた成果についても *Pancreas* に原著論文として掲載されているので同様に付した。4), 5) についてもその研究成果の一部は論文として欧

文誌に投稿中である(研究発表参照)。さらに、残りの成果についてもいくつかの論文に纏めて、漸次国際学術雑誌に発表していく予定である。

- 1) 膵液の上清における *K-ras*, *p53*, *p16* 遺伝子変異の検索による膵癌遺伝子診断の有用性
- 2) 胆汁中における *K-ras* と *p53* の遺伝子変異検出の胆道癌と膵癌診断における有用性
- 3) 膵液中 *mesothelin* mRNA 測定膵癌診断における有用性

以上3つの課題については、報告書の最後に付した5編の原著論文を参照。

#### 4) *h-TERT* mRNA の定量的測定法の確立とその膵癌診断における有用性

Real-time PCR 法により *h-TERT* mRNA の定量的測定法を確立し、その定量性は 0.33pg/ml ~ 30ng/ml で得られる高感度なものであった。健常者の血清 *h-TERT* mRNA は 19 例中 6 例で検出されず、検出された 13 例の *h-TERT*/18S の M+2SD は  $3.5 \times 10^{-4}$  であった。一方、膵癌では全例 *h-TERT* mRNA が検出され、*h-TERT*/18S 比が  $3.5 \times 10^{-4}$  より高い例が 5 例(40%)にみられ、血清 *h-TERT* mRNA の測定は膵癌の診断マーカーなる可能性が示唆された。さらに、本法を用いて各種膵疾患々者より採取した膵液において *h-TERT* mRNA を測定中であり、その膵癌診断における有用性を明らかにしようとしている。

#### 5) 膵液中 *ppENK*, *SARP2*, *CLDN-5*, *NPTX-2* などの癌関連遺伝子のメチル化異常の測定とその膵癌診断における意義

膵癌患者 38 例、膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)患者 18 例、慢性膵炎 19 例を対象として、内視鏡下経乳頭的に採取した膵液より DNA を抽出し、methylation specific PCR(MSP)法および一部 real-time PCR による定量的 MSP 法を用いて *ppENK* (preproenkephalin), *SARP2*(secreted apoptosis related protein 2), *CLDN-5*(claudin 5), *NPTX-2*(neuronal pentax II)の各遺伝子につき、メチル化の有無を測定し、膵癌診断における有用性を検討した。なお IPMN 18 例は切除標本か画像所見より 7 例は良性、11 例は悪性と診断された。

MSP 法による *ppENK* のメチル化は膵癌 27 例中 14 例(52%)、IPMN 15 例中 4 例(27%)、慢性膵炎 13 例中 1 例(8%)に認められ、膵癌における *ppENK* のメチル化は明らかに高率であり、その癌特異性はかなり高いと思われる。

*SARP2* のメチル化は、MSP 法を用いた検討では膵癌で 75% (24/32)、IPMN で 85% (17/20)、慢性膵炎で 11% (2/19) で陽性であったが、膵疾患が認められなかった対照群 10 例では検出されなかった。Real-time PCR 法による Tm 値の解析を用いた判定では膵癌で 85% (23/27)、IPMN で 75% (15/20)、慢性膵炎で 26% (5/19) で *SARP2* のメチル化が陽性であった。また、real-time PCR 法による定量的 MSP 法においてカッ

トオフ値を設定すると、慢性膵炎で 11% (2/19)、IPMN の良性群で 33% (3/9)、悪性群で 55% (6/11)、膵癌で 52% (17/33) で *SARP2* のメチル化が陽性と判定された。*SARP2* のメチル化の癌特異性は高くないが、膵癌や IPMN における陽性率は高く、膵腫瘍性病変のスクリーニングとして有用性が期待される。

MSP 法による *CLDN-5* のメチル化は膵癌で 26% (9/35)、IPMN の悪性群で 64% (7/11)、良性群で 25% (2/8)、慢性膵炎で 16% (3/19) に認められ、*CLDN-5* のメチル化の検出は膵癌診断において有用性は乏しいと思われる。

一方、*NPTX2* の MSP 法を用いたメチル化の検出では、膵癌で 71% (25/35)、IPMN の悪性群で 73% (8/11)、良性群で 25% (2/8)、慢性膵炎で 37% (6/19) に陽性であり、膵癌や IPMN の悪性群で高率にメチル化異常がみられるが、定量的測定により検討をすすめている。

#### 6) EUS 誘導下細径針吸引膵生検 (FNAB) 材料の膵癌遺伝子診断への応用

EUS-FNAB 法による膵生検は膵病変の局在部位により難易度がかかなり異なり、膵吸引生検材料が必ずしも安定して得られていない。そのため、纏めて呈示する程の成果は挙っていない。膵液における遺伝子診断の経験を踏えて、EUS-FNAB 法により得られた生検材料において *K-ras* 変異の HPA 法による定量的測定、*p53* 変異の検出、*ppENK*, *SARP2*, *NPTX-2* の定量的 MSP 法によるメチル化異常の測定に加えて、生検材料におけるスメアの p53 蛋白の免疫染色および 9q, 17p, 18q の FISH 法による染色体異常の検索をすすめ、その有用性を明らかにする予定である。