

厚生労働科学研究研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

「早期膵臓がん検出マーカーの同定」に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山下 義博

平成18(2006)年4月

目 次

I.	総括研究報告書	
	「早期膵臓がん検出マーカーの同定」に関する研究	
	自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 山下義博 -----	1
II.	分担研究報告	
1.	「DNA チップを用いた早期膵臓がん検出マーカーの同定」に関する研究	
	自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 山下義博 -----	8
2.	「cDNA サブトラクションクローニング法による早期膵臓がん検出マーカーの同定」に関する研究	
	自治医科大学・医学部・ゲノム機能研究部 間野博行 -----	10
3.	「早期膵臓がん検出マーカーの同定」に関する研究	
	自治医科大学・医学部・消化器内科学 菅野健太郎 -----	12
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	14
IV.	研究成果の刊行物・別冊 -----	18

主任研究者： 山下義博 自治医科大学医学部 講師

研究要旨：膵臓がんは最も予後不良な悪性腫瘍の一つであり、外科的切除を受けても根治する例は極めて稀である。確定診断のためには逆行性膵胆管造影（ERCP）検査の際に得る膵液の細胞診検査が重要であるが、本検査の正診率は現在なお低い。我々は診断目的に採取する膵液より正常および悪性膵管上皮細胞純化保存する「Pancreas Bank」事業を推進し、健常人47例、慢性膵炎54例、良性膵腫瘍56例、膵臓がん95例、その他78例の計330例に及ぶ大規模な膵管上皮検体バンクを構築した。さらに本バンクに属するサンプルを用いて大規模な遺伝子発現プロファイリングを行った。その結果複数の膵臓がんを選択的に発現する遺伝子セットを同定することに成功した。これらのがん特異的発現は、定量的リアルタイムPCR実験によって確認した。さらに遺伝子発現量に基づく膵臓がん診断法の開発を試み、5種類の遺伝子を用いた新たな統計アルゴリズムによって8割以上の正答率で膵臓がんを予測することができた。さらに今年度は膵管上皮細胞を試料として健常人と膵臓がんサンプル間でcDNAサブトラクショナルクロニング法によるスクリーニングを行い、SOD2遺伝子を始めとして、複数の膵臓がん特異的遺伝子を発見した。これらは膵臓がんの新規分子診断マーカーとして有用であると期待される。

分担研究者

山下義博	自治医科大学・ゲノム機能研究部・講師
間野博行	自治医科大学・ゲノム機能研究部・教授
菅野健太郎	自治医科大学・内科学消化器・教授

A 研究目的

膵臓がんは極めて予後不良な悪性腫瘍であり、特徴的臨床所見に乏しく、診断が確定した時点では既にがんが進行し根治手術が困難な例がほとんどを占める。しかも診断目的で施行する膵液細胞診による膵臓がんの診断率も依然高くなく新たな診断マーカーの同定が世界的な急務といえる。DNAチップは数千～数万種類の遺伝子の発現変化を数回の実験で解析可能にする最新の研究機器であり、本システムを用いることで膵臓がんの新たな分子診断マーカーが同定されるこ

とが期待される。我々は本研究計画において既に、健常人及び膵臓がん患者より膵胆管造影検査（ERCP）の際に得られる膵液より膵管上皮細胞を純化保存する大規模バンク事業「Pancreas Bank」を開始した。本バンク細胞を用いたDNAチップ解析を大規模に行うことにより、膵がん細胞特異的発現を示す遺伝子の同定が可能になると期待される。平成17年3月現在で健常人38例、慢性膵炎48例、良性膵腫瘍41例、膵臓がん72例、その他67例の純化検体細胞の保存に成功している。本研究計画では更にPancreas Bankの拡充を行い（目標症例数：正常、膵臓がん各200例）DNAチップによる網羅的スクリーニングを続行すると共に、既に同定された新規分子診断マーカーを用いたRT-PCR法による膵臓がん早期診断キットの開発を行う。

B 研究方法

（1）サンプルの採取。上皮細胞特異的表面蛋白MUC1は正常膵管上皮および膵臓がんの両者において発現することが既に知られている。そこで本蛋白に対する抗体を用いた

マグネティックビーズカラムによる MUC1 陽性細胞の簡便な純化装置を開発した。また本邦に広く分布する研究協力施設において、周辺病院より採取した膵液から膵管上皮細胞を効率よく純化保存する事業を開始した。既に自治医科大学消化器内科だけでなく、福島県会津中央病院消化器病センターを含む、全国レベルでの新たな膵液検体収集システム「Pancreas Bank」を構築している。これによって我々は健常人 47 例、慢性膵炎 54 例、良性膵腫瘍 56 例、膵臓がん 95 例、その他 78 例の計 330 例について収集することに成功した。

(2) DNA チップ解析。Pancreas Bank の健常人 25 例および膵臓がん 24 例より純化した膵管上皮サンプルより mRNA 分画を調整し、二本鎖 cDNA とした後、T7 RNA ポリメラーゼによって cRNA を作成した。これをアフィメトリクスジャパン社の全ヒト遺伝子 DNA チップ (HGU133) にハイブリダイズさせ、GeneChip スキャナーによって結合 cRNA 量を定量した。得られた膨大な遺伝子発現データは、housekeeping genes の発現量の平均値によって正規化した後、Silicon Genetics 社の GeneSpring ソフトウェアにより解析した。

(3) cDNA サブトラクションクローニング。健常人検体 4 例および膵臓がん患者検体 4 例よりそれぞれ cDNA 画分を作成し、それぞれ「健常」および「膵がん」cDNA プールを得た。後者においてのみ発現する遺伝子を取り出すため、cDNA サブトラクションクローニング解析を行い、当該 cDNA 断片をランダムに約 400 種類クローニングし、その塩基配列を決定した。

(4) ラット膵組織からPSCをコラゲナーゼ、プロナーゼによる酵素処理後、Nycodenz を用いて密度勾配遠心分離を行い、分離精製し初代培養系を作成した。

この培養系を用いて、膵の線維化に重要な役割を果たしていると考えられるTGF b、Interleukin-1 b (IL-1b)、interleukin-6 (IL-6))、Angiotensin II、及びCyclo-oxygenase 2 (COX-2)の役割を中心に検討した。

②インフォームドコンセントに基づいて慢性膵炎、比較的緩徐な経過を辿る膵腫瘍であ

るIntraductal papillary mucinous tumor (IPMT) 及び膵癌患者のERCP検査後、膵管内に留置カニューレーションを行い、セクレチン刺激後の純粋膵液を採取し、病理細胞診に供するとともに、連結可能匿名化とした後、識別番号を付したサンプルの収集事業を行った。

(倫理面の配慮)

遺伝子解析のための倫理規定は自治医科大学学内の遺伝子研究審査委員会ならびに倫理委員会の承認を得ており、文書による同意を得て検体の採取を行った。

C&D. 研究結果および考察

1) 上皮細胞特異的抗原であるMUC1に対するアフィニティカラムによって、膵液より簡便に膵管上皮細胞のみを純化する方法を確立した。本法を用いて、国内の複数の研究協力施設との共同研究の結果、健常人 47 例、慢性膵炎 54 例、良性膵腫瘍 56 例、膵臓がん 95 例、その他 78 例、計 330 例の純化膵管上皮細胞の保存に成功した。これらはいずれも匿名化された上で、-80℃にて保存されている。

2) 膵臓がん4例および健常者4例のサンプルからcDNA調整しそれぞれプールした後、両グループ間で発現が異なるcDNA断片のサブトラクションクローニングを行った。同定された $384 \times 2 = 768$ クローンのcDNAについてone-pass sequeunceを行い、そのannotationも終了した。これら膵癌特異的遺伝子の候補cDNAについて、検体約20例を用いた一次スクリーニングパネルによる定量的リアルタイムPCR実験を行った。その結果10種類以上の膵臓がんマーカーの候補が同定された。さらに症例数を増加した二次スクリーニングパネルの検体を用いた発現定量を行い、最終的にSOD2, HSPなど複数の新規膵臓がんマーカー遺伝子を同定することに成功した。中でもSOD2遺伝子の発現量は、正常膵臓30例において $0.55 \text{ U} \pm 1.79$ (平均 $\pm$ 標準偏差)、良性膵腫瘍19例において $32.4 \text{ U} \pm 70.1$ 、膵臓がん39例において $54.6 \text{ U} \pm 142.7$ と明瞭な腫瘍特異性を示した。

3) 健常者 25 例および膵臓がん患者 24 例より純化した膵管上皮細胞を用いてアフィメトリクス社 HGU133 チップセットによ

る網羅的遺伝子発現解析を行った。この結果約 33, 000 種類の全遺伝子発現量を健常者-膵臓がん患者間で網羅的に比較することが可能になった。膵臓がん特異的な発現を示す遺伝子を同定する目的で、両群間で発現量が有意に異なる遺伝子を Welch' s ANOVA テスト ($P < 0.001$) および effect size > 50 U でスクリーニングしたところ、21 プローブセット (20 遺伝子に相当) が同定された。これら疾患関連遺伝子の発現量から、正常膵管上皮と膵臓がんとの異同を検定したところ、両者が遺伝子発現プロファイルの面から部分的にオーバーラップがあるものの異なったグループに属する事が明らかになった。

4) PSC は Angiotensin II (AT-II) による増殖刺激により活性化するが、その機序について EGF 受容体を transactivation することにより PSC の増殖を促進することを昨年度報告した(Hama ら、Biochem. Biophys. Res. Comm. 315; 905-911, 2004)。しかし、EGF 受容体阻害剤では AT-II の PSC 増殖促進作用を約 50% しか抑制できず、これより AT-II の PSC におけるもう一つの増殖刺激伝達経路の存在が予測された。我々はその新しい AT-II の増殖刺激伝達経路の検討をおこなった。PSC は TGF- β を自ら産生、放出しそのオートクリン機構により自らの増殖を抑制している。しかし、AT-II は TGF- β 刺激伝達機構の細胞内抑制蛋白である Smad 7 の発現を増強することにより、オートクリン TGF- β の PSC 増殖抑制機構を阻害し、その結果 PSC の増殖を促進することを見いだした。更にはその AT-II による Smad 7 発現誘導は protein kinase C を介していることを明らかにした。これは、TGF- β /Smad シグナリング系と Angiotensin シグナリング系との負の相互作用を示した初めての知見である。慢性膵炎を生じた膵組織では、各種炎症性サイトカインが炎症の惹起、継続のメディエーターとして機能していると考えられるが、それらの炎症性サイトカインが PSC に対してどのように作用しているのかについては、十分検討されていなかった。我々は昨年からの検討で、IL-1 β 、IL-6 は、PSC の Cox-2 の発現を誘導するとともにその PSC の活性化を起こすこと、Cox-2 特異的抑制剤により、

PSC の Cox-2 活性を阻害すると PSC の活性化が抑制された。これらより、各種炎症性サイトカインは Cox-2 発現を誘導することにより PSC の活性化させ、かつ Cox-2 発現は PSC 活性化に不可欠であることが示された(Hama K ら論文投稿中)。一方、この研究過程で、われわれは炎症性サイトカインである IL-1 β や IL-6 が PSC 自体も発現しており、TGF β とともに、PSC 活性化の autocrine loop を形成していることを見出した。さらに自己制御機構においては、細胞内の Smad3, Extracellular stimulus regulated kinase (ERK) が関与していることを見出した。

E. 結論

本研究事業において膵臓がんの早期診断マーカー同定を目指した研究が順調に進行している。膵液より膵管上皮細胞を純化するバンク事業も順調に拡大しており、来年度から新たな研究協力施設も 2 カ所増加する予定である。膵液より純化した膵管上皮細胞のバンク事業として計 266 例を超えており、我々の Pancreas Bank は世界最大の膵管上皮バンクとなっている。本バンクサンプルによる膵臓がん早期診断マーカーの同定も、カスタム DNA チップ、アフィメトリクス社全ヒト遺伝子チップ、および cDNA サブトラクションクロニング法など多方面から解析がなされており、成果も確実に得られている。来年度は Pancreas Bank をさらに拡充し、また得られた遺伝子発現情報を統合するとともに、既に膵臓がん早期診断マーカーの良い候補として同定されたものについては、本遺伝子発現を RT-PCR 法により検出する「膵臓がん早期診断キット」の開発に着手する予定である。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

山下義博

- 1) Takada S, Ota J, Kansaku N, Yamashita H, Izumi T, Ishikawa M, Wada T, Kaneda R, Choi YL, Koinuma K,

- Fujiwara S, Aoki H, Kisanuki H, Yamashita Y & Mano H "Nucleotide sequence and embryonic expression of quail and duck Sox9 genes" *Gen Comp Endocrinol*, **145**: 208-213, 2006.
- 2) Koinuma K, Yamashita Y, Liu W, Hatanaka H, Kurashina K, Wada T, Takada S, Kaneda R, Choi YL, Fujiwara SI, Miyakura Y, Nagai H & Mano H "Epigenetic silencing of AXIN2 in colorectal carcinoma with microsatellite instability" *Oncogene*, **25**: 139-146, 2006.
 - 3) Numata A, Shimoda K, Kamezaki K, Haro T, Kakumitsu H, Shide K, Kato K, Miyamoto T, Yamashita Y, Oshima Y, Nakajima H, Iwama A, Aoki K, Takase K, Gondo H, Mano H & Harada M "Signal transducers and activators of transcription 3 augments the transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding protein alpha in granulocyte colony-stimulating factor signaling pathway" *J Biol Chem*, **280**: 12621-12629, 2005.
 - 4) Koinuma K, Kaneda R, Toyota M, Yamashita Y, Takada S, Choi YL, Wada T, Okada M, Konishi F, Nagai H & Mano H "Screening for genomic fragments that are methylated specifically in colorectal carcinoma with a methylated MLH1 promoter" *Carcinogenesis*, **26**: 2078-2085, 2005.
 - 5) Kisanuki H, Choi YL, Wada T, Moriuchi R, Fujiwara SI, Kaneda R, Koinuma K, Ishikawa M, Takada S, Yamashita Y & Mano H "Retroviral expression screening of oncogenes in pancreatic ductal carcinoma" *Eur J Cancer*, **41**: 2170-2175, 2005.
 - 6) Kaneda R, Ueno S, Yamashita Y, Choi YL, Koinuma K, Takada S, Wada T, Shimada K & Mano H "Genome-wide screening for target regions of histone deacetylases in cardiomyocytes" *Circ Res*, **97**: 210-218, 2005.
 - 7) Ishikawa M, Yoshida K, Yamashita Y, Ota J, Takada S, Kisanuki H, Koinuma K, Choi YL, Kaneda R, Iwao T, Tamada K, Sugano K & Mano H "Experimental trial for diagnosis of pancreatic ductal carcinoma based on gene expression profiles of pancreatic ductal cells" *Cancer Sci*, **96**: 387-393, 2005.
 - 8) Ishikawa M, Yoshida K, Yamashita Y, Ota J, Takada S, Kisanuki H, Koinuma K, Choi YL, Kaneda R, Iwao T, Tamada K, Sugano K & Mano H "Experimental trial for diagnosis of pancreatic ductal carcinoma based on gene expression profiles of pancreatic ductal cells" *Cancer Sci*, **96**: 387-393, 2005.
 - 9) Fujiwara S, Yamashita Y, Choi YL, Wada T, Kaneda R, Takada S, Maruyama Y, Ozawa K & Mano H "Transforming activity of the lymphotoxin-beta receptor revealed by expression screening" *Biochem Biophys Res Commun*, **338**: 1256-1262, 2005.
 - 10) Choi YL, Moriuchi R, Osawa M, Iwama A, Makishima H, Wada T, Kisanuki H, Kaneda R, Ota J, Koinuma K, Ishikawa M, Takada S, Yamashita Y, Oshimi K & Mano H "Retroviral expression screening of oncogenes in natural killer cell leukemia" *Leuk Res*, **29**: 943-949, 2005.
- 間野博行
- 1) Takada S, Ota J, Kansaku N, Yamashita H, Izumi T, Ishikawa M, Wada T, Kaneda R, Choi YL, Koinuma K, Fujiwara S, Aoki H, Kisanuki H, Yamashita Y & Mano, H "Nucleotide sequence and embryonic expression of quail and duck Sox9 genes" *Gen Comp Endocrinol*, **145**: 208-213, 2006.
 - 2) Taguchi J, Miyazaki Y, Tsutsumi C, Sawayama Y, Ando K, Tsushima H, Fukushima T, Hata T, Yoshida S, Kuriyama K, Honda S, Jinnai I, Mano, H & Tomonaga M "Expression of the myeloperoxidase gene in AC133 positive leukemia cells relates to the prognosis of acute myeloid leukemia" *Leuk Res*, 2006.
 - 3) Mano, H "Epigenetics and hematological disorders" *Rinsho Ketsueki*, **47**: 3-8, 2006.
 - 4) Mano, H "DNA microarray analysis of myelodysplastic syndrome" *Leuk Lymphoma*, **47**: 9-14, 2006.
 - 5) Koinuma K, Yamashita Y, Liu W, Hatanaka H, Kurashina K, Wada T, Takada S, Kaneda R, Choi YL, Fujiwara SI, Miyakura Y, Nagai H &

- Mano, H "Epigenetic silencing of AXIN2 in colorectal carcinoma with microsatellite instability" *Oncogene*, **25**: 139-146, 2006.
- 6) Takada S, Mano, H & Koopman P "Regulation of Amh during sex determination in chickens: Sox gene expression in male and female gonads" *Cell Mol Life Sci*, **62**: 2140-2146, 2005.
 - 7) Ohki R, Yamamoto K, Ueno S, Mano, H, Misawa Y, Fuse K, Ikeda U & Shimada K "Gene expression profiling of human atrial myocardium with atrial fibrillation by DNA microarray analysis" *Int J Cardiol*, **102**: 233-238, 2005.
 - 8) Numata A, Shimoda K, Kamezaki K, Haro T, Kakumitsu H, Shide K, Kato K, Miyamoto T, Yamashita Y, Oshima Y, Nakajima H, Iwama A, Aoki K, Takase K, Gondo H, Mano, H & Harada M "Signal transducers and activators of transcription 3 augments the transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding protein alpha in granulocyte colony-stimulating factor signaling pathway" *J Biol Chem*, **280**: 12621-12629, 2005.
 - 9) Koinuma K, Kaneda R, Toyota M, Yamashita Y, Takada S, Choi YL, Wada T, Okada M, Konishi F, Nagai H & Mano, H "Screening for genomic fragments that are methylated specifically in colorectal carcinoma with a methylated MLH1 promoter" *Carcinogenesis*, **26**: 2078-2085, 2005.
 - 10) Kisanuki H, Choi YL, Wada T, Moriuchi R, Fujiwara S, Kaneda R, Koinuma K, Ishikawa M, Takada S, Yamashita Y & Mano, H "Retroviral expression screening of oncogenes in pancreatic ductal carcinoma" *Eur J Cancer*, **41**: 2170-2175, 2005.
 - 11) Kaneda R, Ueno S, Yamashita Y, Choi YL, Koinuma K, Takada S, Wada T, Shimada K & Mano, H "Genome-wide screening for target regions of histone deacetylases in cardiomyocytes" *Circ Res*, **97**: 210-218, 2005.
 - 12) Ishikawa M, Yoshida K, Yamashita Y, Ota J, Takada S, Kisanuki H, Koinuma K, Choi YL, Kaneda R, Iwao T, Tamada K, Sugano K & Mano, H "Experimental trial for diagnosis of pancreatic ductal carcinoma based on gene expression profiles of pancreatic ductal cells" *Cancer Sci*, **96**: 387-393, 2005.
 - 13) Fujiwara S, Yamashita Y, Choi YL, Wada T, Kaneda R, Takada S, Maruyama Y, Ozawa K & Mano, H "Transforming activity of the lymphotoxin-beta receptor revealed by expression screening" *Biochem Biophys Res Commun*, **338**: 1256-1262, 2005.
 - 14) Choi YL, Moriuchi R, Osawa M, Iwama A, Makishima H, Wada T, Kisanuki H, Kaneda R, Ota J, Koinuma K, Ishikawa M, Takada S, Yamashita Y, Oshimi K & Mano, H "Retroviral expression screening of oncogenes in natural killer cell leukemia" *Leuk Res*, **29**: 943-949, 2005.
- 菅野健太郎
- 1) Osawa H, Kita H, Ohnishi H, Hoshino H, Mutoh H, Ishino Y, Watanabe E, Satoh K & Sugano K "Helicobacter pylori eradication induces marked increase in H+/K+-adenosine triphosphatase expression without altering parietal cell number in human gastric mucosa" *Gut*, **55**: 152-157, 2006.
 - 2) Hama K, Ohnishi H, Aoki H, Kita H, Yamamoto H, Osawa H, Sato K, Tamada K, Mashima H, Yasuda H & Sugano K "Angiotensin II promotes the proliferation of activated pancreatic stellate cells by Smad7 induction through a protein kinase C pathway" *Biochem Biophys Res Commun*, **340**: 742-750, 2006.
 - 3) Yano T, Yamamoto H, Kita H, Sunada K, Hayashi Y, Sato H, Iwamoto M, Sekine Y, Miyata T, Kuno A, Nishimura M, Ajibe H, Ido K & Sugano K "Technical modification of the double-balloon endoscopy to access to the proximal side of the stenosis in the distal colon" *Gastrointest Endosc*, **62**: 302-304, 2005.
 - 4) Tamada K & Sugano K "[Diagnosis and treatment of bile duct cancer—from the viewpoint of physician]" *Nippon*

- Shokakibyō Gakkai Zasshi*, **102**: 866–872, 2005.
- 5) Sunada F, Yamamoto H, Kita H, Hanatsuka K, Ajibe H, Masuda M, Hirasawa T, Osawa H, Sato K, Hozumi Y & Sugano K "A case of esophageal stricture due to metastatic breast cancer diagnosed by endoscopic mucosal resection" *Jpn J Clin Oncol*, **35**: 483–486, 2005.
 - 6) Satoh K, Yamamoto H, Kawata H, Osawa H, Hanatsuka K, Kita H, Sunada K, Hirasawa T, Yoshizawa M, Ajibe H, Satoh Y, Sunada F & Sugano K "Comparison of hemostatic effects by route of H2 receptor antagonist administration following endoscopic mucosal resection in patients with neoplastic gastric lesions" *Aliment Pharmacol Ther*, **21 Suppl 2**: 105–110, 2005.
 - 7) Osawa H, Nakazato M, Date Y, Kita H, Ohnishi H, Ueno H, Shiiya T, Satoh K, Ishino Y & Sugano K "Impaired production of gastric ghrelin in chronic gastritis associated with *Helicobacter pylori*" *J Clin Endocrinol Metab*, **90**: 10–16, 2005.
 - 8) Osawa H, Kita H, Ohnishi H, Mutoh H, Ishino Y, Satoh K & Sugano K "Histamine-2 receptor expression in gastric mucosa before and after *Helicobacter pylori* cure" *Aliment Pharmacol Ther*, **21 Suppl 2**: 92–98, 2005.
 - 9) Mutoh H, Satoh K, Kita H, Sakamoto H, Hayakawa H, Yamamoto H, Isoda N, Tamada K, Ido K & Sugano K "Cdx2 specifies the differentiation of morphological as well as functional absorptive enterocytes of the small intestine" *Int J Dev Biol*, **49**: 867–871, 2005.
 - 10) Mutoh H, Sakurai S, Satoh K, Osawa H, Tomiyama T, Kita H, Yoshida T, Tamada K, Yamamoto H, Isoda N, Ido K & Sugano K "Pericryptal fibroblast sheath in intestinal metaplasia and gastric carcinoma" *Gut*, **54**: 33–39, 2005.
 - 11) Kita H, Yamamoto H, Nakamura T, Shirakawa K, Terano A & Sugano K "Bleeding polyp in the mid small intestine identified by capsule endoscopy and treated by double-balloon endoscopy" *Gastrointest Endosc*, **61**: 628–629, 2005.
 - 12) Kawamoto C, Ido K, Isoda N, Hozumi M, Nagamine N, Ono K, Sato Y, Kobayashi Y, Nagae G & Sugano K "Long-term outcomes for patients with solitary hepatocellular carcinoma treated by laparoscopic microwave coagulation" *Cancer*, **103**: 985–993, 2005.
 - 13) Iwamoto M, Yamamoto H, Kita H, Sunada K, Hayashi Y, Sato H & Sugano K "Double-balloon endoscopy for ileal GI stromal tumor" *Gastrointest Endosc*, **62**: 440–441; discussion 441, 2005.
 - 14) Ishino Y, Ido K & Sugano K "Contamination with hepatitis B virus DNA in gastrointestinal endoscope channels: risk of infection on reuse after on-site cleaning" *Endoscopy*, **37**: 548–551, 2005.
 - 15) Ishikawa M, Yoshida K, Yamashita Y, Ota J, Takada S, Kisanuki H, Koinuma K, Choi YL, Kaneda R, Iwao T, Tamada K, Sugano K & Mano H "Experimental trial for diagnosis of pancreatic ductal carcinoma based on gene expression profiles of pancreatic ductal cells" *Cancer Sci*, **96**: 387–393, 2005.
 - 16) Hayashi Y, Yamamoto H, Kita H, Sunada K, Sato H, Yano T, Iwamoto M, Sekine Y, Miyata T, Kuno A, Iwaki T, Kawamura Y, Ajibe H, Ido K & Sugano K "Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small bowel injuries identified by double-balloon endoscopy" *World J Gastroenterol*, **11**: 4861–4864, 2005.
 - 17) Haruta H, Yamamoto H, Mizuta K, Kita Y, Uno T, Egami S, Hishikawa S, Sugano K & Kawarasaki H "A case of successful enteroscopic balloon dilation for late anastomotic stricture of choledochojejunostomy after living donor liver transplantation" *Liver Transpl*, **11**: 1608–1610, 2005.
 - 18) Aoki H, Ohnishi H, Hama K, Ishijima T, Satoh Y, Hanatsuka K, Ohashi A, Wada S, Miyata T, Kita H, Yamamoto H, Osawa H, Sato K, Tamada K, Yasuda H,

Mashima H & Sugano K "Autocrine Loop between Transforming Growth Factor- β 1 and Interleukin-1 β through Smad3- and ERK-dependent Pathways in Rat Pancreatic Stellate Cells" *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1 国際公開番号：PCT/WO97/34007・発明者：間野博行・名称「PROMOTER」・出願人：間野博行、株式会社 DNAVEC 研究所・公開日：1997 年 9 月 18 日
- 2 公開番号：特開 2001-269174・発明者：間野博行・名称「骨髓異形成症候群(MDS)の検出方法及び MDS の治療剤」・出願人：間野博行・公開日：2001 年 10 月 2 日
- 3 国際公開番号：PCT/WO 01/64946 A1・発明者：間野博行・名称「METHOD OF DETECTING CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA」・出願人：間野博行、宝酒造株式会社・公開日：2001 年 9 月 7 日
- 4 出願番号：特願 2001-337752・発明者：間野博行・名称「多発性骨髓腫の分子診断方法」・出願人：藤沢薬品工業株式会社・出願日：2001 年 11 月 2 日
- 5 出願番号：特願 2001-56438・発明者：間野博行・名称「慢性骨髓性白血病の分子診断方法」・出願人：藤沢薬品工業株式会社・出願日 2001 年 3 月 1 日
- 6 出願番号：特願 2004-505392・発明者：間野博行・名称「膵管細胞を利用した膵管癌特異的遺伝子の同定方法、同方法により同定される膵管癌特異的遺伝子を利用した膵管癌の検査方法、および膵管癌の治療または予防のための医薬候補化合物のスクリーニング方法」・出願人：藤沢薬品工業株式会社・出願日 2003 年 5 月 22 日・国際出願番号：PCT/JP/03/006398
- 7 出願番号：特願 2005-168336。出願日：平成 17 年 6 月 8 日。発明名称：成人 T 細胞白血病予防治療剤

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書
「DNAチップを用いた早期膵臓がん検出マーカーの同定」に関する研究

分担研究者： 山下義博 自治医科大学医学部 講師

研究要旨：膵臓がんは最も予後不良な悪性腫瘍の一つであり、外科的切除を受けても根治する例は極めて稀である。確定診断のためには逆行性膵胆管造影（ERCP）検査の際に得る膵液の細胞診検査が重要であるが、本検査の正診率は現在なお低い。我々は診断目的に採取する膵液より正常および悪性膵管上皮細胞純化保存する「Pancreas Bank」事業を推進し、計330に及ぶ大規模な膵管上皮検体バンクを構築した。さらに本バンクに属するサンプルを用いて大規模な遺伝子発現プロファイリングを行った。その結果 EPPK1, PLOD2, LZK1, RASAL2 など、複数の膵臓がんを選択的に発現する遺伝子セットを同定することに成功した。これらのがん特異的発現は、定量的リアルタイムPCR実験によって確認した。さらに遺伝子発現量に基づく膵臓がん診断法の開発を試み、5種類の遺伝子を用いた新たな統計アルゴリズムによって8割以上の正答率で膵臓がんを予測することができた。これは現在の膵臓がん診断法である病理診断法よりはるかに高い正診率であり、遺伝子発現による診断法の有用性を示すものである。

A 研究目的

膵臓がんは極めて予後不良な悪性腫瘍であり、特徴的臨床所見に乏しく、診断が確定した時点では既にがんが進行し根治手術が困難な例がほとんどを占める。しかも診断目的で施行する膵液細胞診による膵臓がんの診断率も依然高くなく新たな診断マーカーの同定が世界的な急務といえる。我々は本研究計画において既に、健常人及び膵臓がん患者より膵胆管造影検査（ERCP）の際に得られる膵液より膵管上皮細胞を純化保存する大規模バンク事業「Pancreas Bank」を開始した。本バンク細胞を用いたDNAチップ解析を大規模に行うことにより、膵がん細胞特異的発現を示す遺伝子の同定が可能になると期待される。

B 研究方法

(1) サンプルの採取。上皮細胞特異的表面蛋白MUC1は正常膵管上皮および膵臓がんの両者において発現することが既に知られている。そこで本蛋白に対する抗体を用いたマグネティックビーズカラムによるMUC1陽性細胞の簡便な純化装置を開発した。また本邦に広く分布する研究協力施設において、周辺病院より採取した膵液から膵管上皮細胞

を効率よく純化保存する事業を開始した。既に自治医科大学消化器内科だけでなく、福島県会津中央病院消化器病センターを含む、全国レベルでの新たな膵液検体収集システム「Pancreas Bank」を構築している。これによって我々は膵管上皮細胞を既にこれまで健常人47例、慢性膵炎54例、良性膵腫瘍56例、膵臓がん95例、その他78例の計330例を収集・保存することに成功した。

(2) DNAチップ解析。Pancreas Bankに属する臨床検体よりRNAを純化した後、mRNA分画のみを増幅した。本目的には米国Nugen社のOvationキットを用いた。得られた検体よりcDNAを増幅し、ビオチン標識した後、アフィメトリクス社のHGU133AおよびHGU133Bチップにハイブリダイズさせた。チップに対するビオチン標識cDNAの結合はGeneChipスキャナーによりスキャンニングして定量した。

（倫理面への配慮）

検体収集に関しては自治医科大学及びの生命倫理委員会認可を受けた事業として開始し、連結可能匿名化のもとで研究を行った。

C&D. 研究結果および考察

膵管上皮検体を用いた大規模な大規模な遺

伝子発現プロファイリングの結果、EPPK1, PLOD2, LZK1, RASAL2 など、複数の膵臓がんを選択的に発現する遺伝子セットを同定することに成功した。さらにこれら遺伝子の膵臓がん特異的発現は、検体 cDNA を基質とした定量的リアルタイム PCR 実験によって確認された。

さらに遺伝子発現量に基づく膵臓がん診断法の開発を試み、我々の膨大な遺伝子発現データベースより、疾患の診断に統計的に有意にリンクする遺伝子をスクリーニングし、得られた診断関連遺伝子の発現量を用いた膵臓がん診断アルゴリズムの開発をバイオインフォマティクスによって行った。その結果わずか 5 種類の遺伝子の発現量を基にし新たな統計アルゴリズムによって 8 割以上の正答率で膵臓がんを予測することができた。これは現在の膵臓がん診断法である病理診断法よりはるかに高い正診率であり、遺伝子発現による診断法の有用性を示すものである。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takada S, Ota J, Kansaku N, Yamashita H, Izumi T, Ishikawa M, Wada T, Kaneda R, Choi YL, Koinuma K, Fujiwara S, Aoki H, Kisanuki H, Yamashita Y & Mano H "Nucleotide sequence and embryonic expression of quail and duck Sox9 genes" *Gen Comp Endocrinol*, **145**: 208-213, 2006.
- 2) Koinuma K, Yamashita Y, Liu W, Hatanaka H, Kurashina K, Wada T, Takada S, Kaneda R, Choi YL, Fujiwara SI, Miyakura Y, Nagai H & Mano H "Epigenetic silencing of AXIN2 in colorectal carcinoma with microsatellite instability" *Oncogene*, **25**: 139-146, 2006.
- 3) Numata A, Shimoda K, Kamezaki K, Haro T, Kakumitsu H, Shide K, Kato K, Miyamoto T, Yamashita Y, Oshima Y, Nakajima H, Iwama A, Aoki K, Takase K, Gondo H, Mano H & Harada M "Signal transducers and activators of

transcription 3 augments the transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding protein alpha in granulocyte colony-stimulating factor signaling pathway" *J Biol Chem*, **280**: 12621-12629, 2005.

- 4) Koinuma K, Kaneda R, Toyota M, Yamashita Y, Takada S, Choi YL, Wada T, Okada M, Konishi F, Nagai H & Mano H "Screening for genomic fragments that are methylated specifically in colorectal carcinoma with a methylated MLH1 promoter" *Carcinogenesis*, **26**: 2078-2085, 2005.
- 5) Kisanuki H, Choi YL, Wada T, Moriuchi R, Fujiwara SI, Kaneda R, Koinuma K, Ishikawa M, Takada S, Yamashita Y & Mano H "Retroviral expression screening of oncogenes in pancreatic ductal carcinoma" *Eur J Cancer*, **41**: 2170-2175, 2005.
- 6) Kaneda R, Ueno S, Yamashita Y, Choi YL, Koinuma K, Takada S, Wada T, Shimada K & Mano H "Genome-wide screening for target regions of histone deacetylases in cardiomyocytes" *Circ Res*, **97**: 210-218, 2005.
- 7) Ishikawa M, Yoshida K, Yamashita Y, Ota J, Takada S, Kisanuki H, Koinuma K, Choi YL, Kaneda R, Iwao T, Tamada K, Sugano K & Mano H "Experimental trial for diagnosis of pancreatic ductal carcinoma based on gene expression profiles of pancreatic ductal cells" *Cancer Sci*, **96**: 387-393, 2005.
- 8) Ishikawa M, Yoshida K, Yamashita Y, Ota J, Takada S, Kisanuki H, Koinuma K, Choi YL, Kaneda R, Iwao T, Tamada K, Sugano K & Mano H "Experimental trial for diagnosis of pancreatic ductal carcinoma based on gene expression profiles of pancreatic ductal cells" *Cancer Sci*, **96**: 387-393, 2005.
- 9) Fujiwara S, Yamashita Y, Choi YL, Wada T, Kaneda R, Takada S, Maruyama Y, Ozawa K & Mano H "Transforming activity of the lymphotoxin-beta receptor revealed by expression screening" *Biochem Biophys Res Commun*, **338**: 1256-1262, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

「cDNA サブトラクショナルクロニング法による早期膵臓がん検出マーカーの同定」
に関する研究

分担研究者： 間野博行 自治医科大学医学部教授

研究要旨：膵臓がんは最も予後不良な悪性腫瘍の一つであり、外科的切除を受けても根治する例は極めて稀である。確定診断のためには逆行性膵胆管造影（ERCP）検査の際に得る膵液の細胞診検査が重要であるが、本検査の正診率は現在なお低い。膵臓がんの治癒率向上のためにも、治癒切除が可能な早期の段階で信頼性良く膵臓がん診断を可能にする新規分子マーカーの同定が世界的な急務である。我々は本研究計画において、健常人及び膵がん患者の膵液より膵管上皮細胞を純化し両者を直接比較すれば膵臓がん特異的分子マーカーが効率良く同定することを目指した。既にこれまで健常人 47 例、慢性膵炎 54 例、良性膵腫瘍 56 例、膵臓がん 95 例、その他 78 例、計 330 例の膵管上皮細胞の収集に成功している。これら膵管上皮細胞を試料として健常人と膵臓がんサンプル間で cDNA サブトラクショナルクロニング法によるスクリーニングを行い、SOD2 遺伝子を始めとして、複数の膵臓がん特異的遺伝子を発見した。これらは膵臓がんの新規分子診断マーカーとして有用であると期待される。

A 研究目的

膵臓がんは極めて予後不良な悪性腫瘍であり、特徴的臨床所見に乏しく、診断が確定した時点では既にがんが進行し根治手術が困難な例がほとんどを占める。しかも診断目的で施行する膵液細胞診による膵臓がんの診断率も依然高くなく新たな診断マーカーの同定が世界的な急務といえる。我々は本研究計画において既に、健常人及び膵臓がん患者より膵胆管造影検査（ERCP）の際に得られる膵液より膵管上皮細胞を純化保存する大規模バンク事業「Pancreas Bank」を開始した。本バンク細胞を用いた cDNA サブトラクショナルクロニング実験を行うことで、膵臓がんのみに発現する遺伝子の同定を網羅的に試み、これら遺伝子を利用した同疾患の早期診断キットの開発を試みる。

B 研究方法

(1) サンプルの採取。上皮細胞特異的表面蛋白 MUC1 は正常膵管上皮および膵臓がんの両者において発現することが既に知られている。そこで本蛋白に対する抗体を用いたマグネティックビーズカラムによる MUC1 陽性細胞の簡便な純化装置を開発した。また本邦に広く分布する研究協力施設において、周辺病院より採取した膵液から膵管上皮細胞を効率よく純化保存する事業を開始した。既に自治医科大学消化器内科だけでなく、福島県会津中央病院消化器病センターを含む、全国レベルでの新たな膵液検体収集システ

ム「Pancreas Bank」を構築している。これによって我々は膵管上皮細胞を既にこれまで健常人 47 例、慢性膵炎 54 例、良性膵腫瘍 56 例、膵臓がん 95 例、その他 78 例の計 330 例を収集・保存することに成功した。

(2) cDNA サブトラクショナルクロニング。健常者検体 4 例および膵臓がん患者検体 4 例よりそれぞれ cDNA 画分を作成し、それぞれ「健常」および「膵がん」cDNA プールを得た。後者においてのみ発現する遺伝子を取り出すため、cDNA サブトラクショナルクロニング解析を行い、当該 cDNA 断片をランダムに 768 種類クロニングし、その塩基配列を決定した。

（倫理面への配慮）

検体収集に関しては自治医科大学及びの生命倫理委員会認可を受けた事業として開始し、連結可能匿名化のもとで研究を行った。

C&D. 研究結果および考察

(1) 膵臓がん4例および健常者4例のサンプルからcDNA調整しそれぞれプールした後、両グループ間で発現が異なるcDNA断片のサブトラクショナルクロニングを行った。同定された $384 \times 2 = 768$ クロンのcDNAについてone-pass sequenceを行い、そのannotationも終了した。これら膵癌特異的遺伝子の候補cDNAについて、検体約20例を用いた一次スクリーニングパネルによる定量的リアルタイムPCR実験を行った。その結果10種類以上の膵臓がんマーカーの候

補が同定された。さらに症例数を増加した二次スクリーニングパネルの検体を用いた発現定量を行い、最終的にSOD2, HSPなど複数の新規膵臓がんマーカー遺伝子を同定することに成功した。中でもSOD2遺伝子の発現量は、正常膵臓30例において $0.55 \text{ U} \pm 1.79$ (平均 $\pm$ 標準偏差)、良性膵腫瘍19例において $32.4 \text{ U} \pm 70.1$ 、膵臓がん39例において $54.6 \text{ U} \pm 142.7$ と明瞭な腫瘍特異性を示した。

E. 結論

膵管上皮細胞のバンク事業はその後も拡充に努めており、さらにこれら試料を用いたcDNA サブトラクション法による膵臓がん特異的遺伝子のスクリーニングと、DNA マイクロアレイによる膵臓がん細胞の遺伝子発現プロファイル解析も継続している。前者についてはSOD2 単独だけでなく、第2, 第3の遺伝子と組み合わせることで特異性・感度を向上させる方向で研究する予定である。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takada S, Ota J, Kansaku N, Yamashita H, Izumi T, Ishikawa M, Wada T, Kaneda R, Choi YL, Koinuma K, Fujiwara S, Aoki H, Kisanuki H, Yamashita Y & Mano H "Nucleotide sequence and embryonic expression of quail and duck Sox9 genes" *Gen Comp Endocrinol*, **145**: 208-213, 2006.
- 2) Taguchi J, Miyazaki Y, Tsutsumi C, Sawayama Y, Ando K, Tsushima H, Fukushima T, Hata T, Yoshida S, Kuriyama K, Honda S, Jinnai I, Mano H & Tomonaga M "Expression of the myeloperoxidase gene in AC133 positive leukemia cells relates to the prognosis of acute myeloid leukemia" *Leuk Res*, 2006.
- 3) Mano H "[Epigenetics and hematological disorders]" *Rinsho Ketsueki*, **47**: 3-8, 2006.
- 4) Mano H "DNA micro-array analysis of myelodysplastic syndrome" *Leuk Lymphoma*, **47**: 9-14, 2006.
- 5) Koinuma K, Yamashita Y, Liu W, Hatanaka H, Kurashina K, Wada T, Takada S, Kaneda R, Choi YL, Fujiwara SI, Miyakura Y, Nagai H & Mano H "Epigenetic silencing of AXIN2 in colorectal carcinoma with microsatellite instability" *Oncogene*, **25**: 139-146, 2006.

- 6) Takada S, Mano H & Koopman P "Regulation of Amh during sex determination in chickens: Sox gene expression in male and female gonads" *Cell Mol Life Sci*, **62**: 2140-2146, 2005.
- 7) Ohki R, Yamamoto K, Ueno S, Mano H, Misawa Y, Fuse K, Ikeda U & Shimada K "Gene expression profiling of human atrial myocardium with atrial fibrillation by DNA microarray analysis" *Int J Cardiol*, **102**: 233-238, 2005.
- 8) Numata A, Shimoda K, Kamezaki K, Haro T, Kakumitsu H, Shide K, Kato K, Miyamoto T, Yamashita Y, Oshima Y, Nakajima H, Iwama A, Aoki K, Takase K, Gondo H, Mano H & Harada M "Signal transducers and activators of transcription 3 augments the transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding protein alpha in granulocyte colony-stimulating factor signaling pathway" *J Biol Chem*, **280**: 12621-12629, 2005.
- 9) Koinuma K, Kaneda R, Toyota M, Yamashita Y, Takada S, Choi YL, Wada T, Okada M, Konishi F, Nagai H & Mano H "Screening for genomic fragments that are methylated specifically in colorectal carcinoma with a methylated MLH1 promoter" *Carcinogenesis*, **26**: 2078-2085, 2005.
- 10) Kisanuki H, Choi YL, Wada T, Moriuchi R, Fujiwara SI, Kaneda R, Koinuma K, Ishikawa M, Takada S, Yamashita Y & Mano H "Retroviral expression screening of oncogenes in pancreatic ductal carcinoma" *Eur J Cancer*, **41**: 2170-2175, 2005.
- 11) Kaneda R, Ueno S, Yamashita Y, Choi YL, Koinuma K, Takada S, Wada T, Shimada K & Mano H "Genome-wide screening for target regions of histone deacetylases in cardiomyocytes" *Circ Res*, **97**: 210-218, 2005.
- 12) Ishikawa M, Yoshida K, Yamashita Y, Ota J, Takada S, Kisanuki H, Koinuma K, Choi YL, Kaneda R, Iwao T, Tamada K, Sugano K & Mano H "Experimental trial for diagnosis of pancreatic ductal carcinoma based on gene expression profiles of pancreatic ductal cells" *Cancer Sci*, **96**: 387-393, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1 出願番号：特願 2004-505392・発明者：間野博行・名称「膵管細胞を利用した膵管癌特異的遺伝子の同定方法、同方法により同定される膵管癌特異的遺伝子を利用した膵管癌の検査方法、および膵管癌の治療または予防のための医薬候補化合物のスクリーニング方法」・出願人：藤沢薬品工業株式会社・出願日 2003 年 5 月 22 日・国際出願番号：PCT/JP/03/006398

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

「早期膵臓がん検出マーカーの同定」に関する研究

分担研究者：菅野健太郎 自治医科大学医学部教授

研究要旨：膵癌発症のハイリスク状態である慢性膵炎における膵組織の線維化の機序を解明するため、ラット膵から線維化に中心的な役割を果たすと考えられる細胞であるStellate cellを単離し、昨年度に引き続き炎症性サイトカインの役割、その活性化の細胞内機構、活性化の阻害薬について検討した。ヒトのさまざまな膵疾患における膵液からの遺伝子発現診断を実用化するための第一歩として、留置カニューレシオン下で純粋膵液を採取し、細胞診を行うとともに、遺伝子発現プロファイル解析を行った。

A. 研究目的

- ①膵癌のハイリスク状態である慢性膵炎における膵線維化のメカニズムを解明するため、ラットの膵Stellate細胞（PSC）を単離し、その分子応答について本年もさらに詳細な検討を行った。
- ②膵液から採取したサンプルについて包括的遺伝子発現解析を行う。

B. 研究方法

- ①ラット膵組織からPSCをコラゲナーゼ、プロナーゼによる酵素処理後、Nycodenzを用いて密度勾配遠心分離を行い、分離精製し初代培養系を作成した。この培養系を用いて、膵の線維化に重要な役割を果たしていると考えられるTGF β 、Interleukin-1 β （IL-1 β ）、interleukin-6（IL-6）、Angiotensin II、及びCyclo-oxygenase 2（COX-2）の役割を中心に検討した。
- ②インフォームドコンセントに基づいて慢性膵炎、比較的緩徐な経過を辿る膵腫瘍であるIntraductal papillary mucinous tumor（IPMT）及び膵癌患者のERCP検査後、膵管内に留置カニューレシオンを行い、セクレチン刺激後の純粋膵液を採取し、病理細胞診に供するとともに、連結可能匿名化とした後、識別番号を付したサンプルの収集事業を行った。

（倫理面の配慮）

遺伝子解析のための倫理規定は自治医科大学学内の遺伝子研究審査委員会ならびに倫理委員会の承認を得ており、文書による同意を得て検体の採取を行った。

C. 研究結果

①PSCの分子応答

PSCはAngiotensin II（AT-II）による増殖刺激により活性化するが、その機序についてEGF受容体をtransactivationすることによりPSCの増殖を促進することを昨年度報告した（Hamaら、Biochem. Biophys. Res. Comm. 315; 905-911, 2004）。しかし、EGF受容体阻害剤ではAT-IIのPSC増殖促進作用を約50%しか抑制できず、これよりAT-IIのPSCにおけるもう一つの増殖刺激伝達経路の存在が予測された。我々はその新しいAT-IIの増殖刺激伝達経路の検討をおこなった。PSCはTGF- β を自ら産生、放出しそのオートクリン機構により自らの増殖を抑制している。しかし、AT-IIはTGF- β 刺激伝達機構の細胞内抑制蛋白であるSmad 7の発現を増強することにより、オートクリンTGF- β のPSC増殖抑制機構を阻害し、その結果PSCの増殖を促進することを見いだした。更にはそのAT-IIによるSmad 7発現誘導はprotein kinase Cを介していることを明かにした。これは、TGF- β /Smadシグナリング系とAngiotensinシグナリング系との負の相互作用を示した初めての知見である（論文1）。慢性膵炎を生じた膵組織では、各種炎症性サイトカインが炎症の惹起、継続のメディエーターとして機能していると考えられるが、それらの炎症性サイトカインがPSCに対してどのように作用しているのかについては、十分検討されていなかった。我々は昨年からの検討で、IL-1 β 、

IL-6 は、PSC の Cox-2 の発現を誘導するとともにそのPSCの活性化を起こすこと、Cox-2 特異的抑制剤により、PSC の Cox-2 活性を阻害するとPSCの活性化が抑制された。これらより、各種炎症性サイトカインはCox-2発現を誘導することによりPSCの活性化させ、かつCox-2発現はPSC活性化に不可欠であることが示された(Hama Kら論文投稿中)。一方、この研究過程で、われわれは炎症性サイトカインであるIL-1 β やIL-6がPSC自体も発現しており、TGF β とともに、PSC活性化のautocrine loopを形成していることを見出した。さらに自己制御機構においては、細胞内のSmad3, Extracellular stimulus regulated kinase (ERK) が関与していることを見出し、論文発表した(論文2、3)

②昨年に引き続き、純粋膵液の採取を継続した。一部を細胞診に供した残りを連結可能匿名化し、DNAチップ解析を行い、共同執筆論文として発表した(論文4)。

D&E. 考察及び結論

①ラットPSCを用いて線維化に関与する様々な因子の関与と、その相互作用ならびに細胞内機構の一部を明らかにしえた。種々の受容体阻害薬、COX-2阻害薬が線維化の抑制に有用である可能性が示唆された。

②膵癌発症のハイリスクである粘液産生膵腫瘍におけるCDXの関与について引き続き検討を行う。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hama K, Ohnishi H, Aoki H, Kita H, Yamamoto H, Osawa H, Sato K, Tamada K, Mashima H, Yasuda H, Sugano K.: Angiotensin II promotes the proliferation of activated pancreatic stellate cells by Smad 7

induction through a protein kinase C pathway. Bichim. Biophys. Res. Comm. 340, 742-750, 2006

2) Aoki H, Ohnishi H, Hama K, Ishijima T, Satoh Y, Hanatsuka K, Ohashi A, Wada S, Miyata T, Kita H, Yamamoto H, Osawa H, Sato K, Tamada K, Yasuda H, Mashima H, Sugano K: Autocrine loop between transforming growth factor- β 1 and interleukin-1 β through Smad3- and ERK-dependent pathways in rat pancreatic stellate cells. Am. J. Physiol. Cell Physiol. Dec 21, 2005 Epub ahead of print

3) Aoki H, Ohnishi H, Hama K, Shinozaki S, Kita H, Yamamoto H, Osawa H, Sato K, Tamada K, Sugano K: Existence of autocrine loop between interleukin-6 and transforming growth factor- β 1 in activated rat pancreatic stellate cells. J. Cell. Biochem. In press, 2006

4) Ishikawa M, Yoshida K, Yamashita Y, Ota J, Takada S, Kisanuki H, Koinuma K, Choi YL, Kaneda R, Iwao T, Tamada K, Sugano K, Mano H: Experimental trial for diagnosis of pancreatic ductal carcinoma based on gene expression profiles of pancreatic ductal cells. Cancer Sci. 96: 387-393, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

研究成果の刊行に関する一覧表

主任研究者: 山下 義博

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takada, S., Mano, H. & Koopman, P.	Regulation of Amh during sex determination in chickens: Sox gene expression in male and female gonads	<i>Cell. Mol. Life Sci.</i>	62	2140-2146	2005
Koinuma, K., Yamashita, Y., Liu, W., Hatanaka, H., Kurashina, K., Wada, T., Takada, S., Kaneda, R., Choi, Y.L., Fujiwara, S.I., Miyakura, Y., Nagai, H. & Mano, H.	Epigenetic silencing of AXIN2 in colorectal carcinoma with microsatellite instability	<i>Oncogene</i>	25	139-146	2006
Koinuma, K., Kaneda, R., Toyota, M., Yamashita, Y., Takada, S., Choi, Y.L., Wada, T., Okada, M., Konishi, F., Nagai, H. & Mano, H.	Screening for genomic fragments that are methylated specifically in colorectal carcinoma with a methylated MLH1 promoter	<i>Carcinogenesis</i>	26	2078-2085	2005
Kisanuki, H., Choi, Y.L., Wada, T., Moriuchi, R., Fujiwara, S.I., Kaneda, R., Koinuma, K., Ishikawa, M., Takada, S., Yamashita, Y. & Mano, H.	Retroviral expression screening of oncogenes in pancreatic ductal carcinoma	<i>Eur. J. Cancer</i>	41	2170-2175	2005
Kaneda, R., Ueno, S., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Koinuma, K., Takada, S., Wada, T., Shimada, K. & Mano, H.	Genome-wide screening for target regions of histone deacetylases in cardiomyocytes	<i>Circ. Res.</i>	97	210-218	2005
Ishikawa, M., Yoshida, K., Yamashita, Y., Ota, J., Takada, S., Kisanuki, H., Koinuma, K., Choi, Y.L., Kaneda, R., Iwao, T., Tamada, K., Sugano, K. & Mano, H.	Experimental trial for diagnosis of pancreatic ductal carcinoma based on gene expression profiles of pancreatic ductal cells	<i>Cancer Sci</i>	96	387-393	2005
Fujiwara, S., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Wada, T., Kaneda, R., Takada, S., Maruyama, Y., Ozawa, K. & Mano, H.	Transforming activity of the lymphotoxin-beta receptor revealed by expression screening	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun</i>	338	1256-1262	2005
Choi, Y.L., Moriuchi, R., Osawa, M., Iwama, A., Makishima, H., Wada, T., Kisanuki, H., Kaneda, R., Ota, J., Koinuma, K., Ishikawa, M., Takada, S., Yamashita, Y., Oshimi, K. & Mano, H.	Retroviral expression screening of oncogenes in natural killer cell leukemia	<i>Leuk. Res</i>	29	943-949	2005

研究成果の刊行に関する一覧表

分担研究者: 間野 博行

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Mano, H.	DNA micro-array analysis of myelodysplastic syndrome	<i>Leuk. Lymphoma</i>	47	9-14	2006
Koinuma, K., Yamashita, Y., Liu, W., Hatanaka, H., Kurashina, K., Wada, T., Takada, S., Kaneda, R., Choi, Y.L., Fujiwara, S.I., Miyakura, Y., Nagai, H. & Mano, H.	Epigenetic silencing of AXIN2 in colorectal carcinoma with microsatellite instability	<i>Oncogene</i>	25	139-146	2006
Takada, S., Mano, H. & Koopman, P.	Regulation of Amh during sex determination in chickens: Sox gene expression in male and female gonads	<i>Cell. Mol. Life Sci.</i>	62	2140-2146	2005
Ohki, R., Yamamoto, K., Ueno, S., Mano, H., Misawa, Y., Fuse, K., Ikeda, U. & Shimada, K.	Gene expression profiling of human atrial myocardium with atrial fibrillation by DNA microarray analysis	<i>Int. J. Cardiol.</i>	102	233-238	2005
Numata, A., Shimoda, K., Kamezaki, K., Haro, T., Kakumitsu, H., Shide, K., Kato, K., Miyamoto, T., Yamashita, Y., Oshima, Y., Nakajima, H., Iwama, A., Aoki, K., Takase, K., Gondo, H., Mano, H. & Harada, M.	Signal transducers and activators of transcription 3 augments the transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding protein alpha in granulocyte colony-stimulating factor signaling pathway	<i>J. Biol. Chem.</i>	280	12621-12629	2005
Koinuma, K., Kaneda, R., Toyota, M., Yamashita, Y., Takada, S., Choi, Y.L., Wada, T., Okada, M., Konishi, F., Nagai, H. & Mano, H.	Screening for genomic fragments that are methylated specifically in colorectal carcinoma with a methylated MLH1 promoter	<i>Carcinogenesis</i>	26	2078-2085	2005
Kisanuki, H., Choi, Y.L., Wada, T., Moriuchi, R., Fujiwara, S.I., Kaneda, R., Koinuma, K., Ishikawa, M., Takada, S., Yamashita, Y. & Mano, H.	Retroviral expression screening of oncogenes in pancreatic ductal carcinoma	<i>Eur. J. Cancer</i>	41	2170-2175	2005
Kaneda, R., Ueno, S., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Koinuma, K., Takada, S., Wada, T., Shimada, K. & Mano, H.	Genome-wide screening for target regions of histone deacetylases in cardiomyocytes	<i>Circ. Res.</i>	97	210-218	2005
Ishikawa, M., Yoshida, K., Yamashita, Y., Ota, J., Takada, S., Kisanuki, H., Koinuma, K., Choi, Y.L., Kaneda, R., Iwao, T., Tamada, K., Sugano, K. & Mano, H.	Experimental trial for diagnosis of pancreatic ductal carcinoma based on gene expression profiles of pancreatic ductal cells	<i>Cancer Sci</i>	96	387-393	2005
Fujiwara, S., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Wada, T., Kaneda, R., Takada, S., Maruyama, Y., Ozawa, K. & Mano, H.	Transforming activity of the lymphotoxin-beta receptor revealed by expression screening	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun</i>	338	1256-1262	2005
Choi, Y.L., Moriuchi, R., Osawa, M., Iwama, A., Makishima, H., Wada, T., Kisanuki, H., Kaneda, R., Ota, J., Koinuma, K., Ishikawa, M., Takada, S., Yamashita, Y., Oshimi, K. & Mano, H.	Retroviral expression screening of oncogenes in natural killer cell leukemia	<i>Leuk. Res</i>	29	943-949	2005
間野博行.	いかにして個別化医療が可能か	<i>Molecular Medicine</i>	42	848-850	2005
間野博行.	遺伝子発現プロファイリングによる急性骨髄性白血病の予後予測	<i>Molecular Medicine</i>	42	866-871	2005
間野博行.	マイクロアレイを用いた造血器悪性腫瘍の分類と予後	総合臨床	54	1752-1755	2005
間野博行.	DNAチップ解析による造血器腫瘍診断	日本内科学会雑誌	94	2224-2230	2005
間野博行.	DNAチップによるリンパ腫解析	血液・腫瘍科	49 (Suppl. 4)	248-253	2005
間野博行.	遺伝子発現解析に基づく予後判定	医学の歩み	212	355-359	2005
間野博行.	マイクロアレイ解析による急性骨髄性白血病の予後因子の同定	Annual Review 血液		124-130	2006

研究成果の刊行に関する一覧表

分担研究者: 菅野 健太郎

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Osawa H, Kita H, Ohnishi H, Hoshino H, Mutoh H, Ishino Y, Watanabe E, Satoh K & Sugano K	Helicobacter pylori eradication induces marked increase in H ⁺ /K ⁺ -adenosine triphosphatase expression without altering parietal cell number in human gastric mucosa	<i>Gut</i>	55	152-157	2006
Hama K, Ohnishi H, Aoki H, Kita H, Yamamoto H, Osawa H, Sato K, Tamada K, Mashima H, Yasuda H & Sugano K	Angiotensin II promotes the proliferation of activated pancreatic stellate cells by Smad7 induction through a protein kinase C pathway	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	340	742-750	2006
Yano T, Yamamoto H, Kita H, Sunada K, Hayashi Y, Sato H, Iwamoto M, Sekine Y, Miyata T, Kuno A, Nishimura M, Ajibe H, Ido K & Sugano K	Technical modification of the double-balloon endoscopy to access to the proximal side of the stenosis in the distal colon	<i>Gastrointest Endosc</i>	62	302-304	2005
Tamada K & Sugano K	Diagnosis and treatment of bile duct cancer--from the viewpoint of physician	<i>Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi</i>	102	866-872	2005
Sunada F, Yamamoto H, Kita H, Hanatsuka K, Ajibe H, Masuda M, Hirasawa T, Osawa H, Sato K, Hozumi Y & Sugano K	A case of esophageal stricture due to metastatic breast cancer diagnosed by endoscopic mucosal resection	<i>Jpn J Clin Oncol</i>	35	483-486	2005
Sugano K	Significance of the Japanese guideline for the management of gastric ulcer	<i>Nippon Rinsho</i>	63 Suppl 11	17-21	2005
Satoh K, Yamamoto H, Kawata H, Osawa H, Hanatsuka K, Kita H, Sunada K, Hirasawa T, Yoshizawa M, Ajibe H, Satoh Y, Sunada F & Sugano K	Comparison of hemostatic effects by route of H2 receptor antagonist administration following endoscopic mucosal resection in patients with neoplastic gastric lesions	<i>Aliment Pharmacol Ther</i>	21 Suppl 2	105-110	2005
Osawa H, Nakazato M, Date Y, Kita H, Ohnishi H, Ueno H, Shiya T, Satoh K, Ishino Y & Sugano K	Impaired production of gastric ghrelin in chronic gastritis associated with Helicobacter pylori	<i>J Clin Endocrinol Metab</i>	90	10-16	2005
Osawa H, Kita H, Ohnishi H, Sugano K & Nakazato M	Plasma and gastric ghrelin levels in subjects with Helicobacter pylori infection	<i>Nippon Rinsho</i>	63 Suppl 11	127-131	2005
Osawa H, Kita H, Ohnishi H, Mutoh H, Ishino Y, Satoh K & Sugano K	Histamine-2 receptor expression in gastric mucosa before and after Helicobacter pylori cure	<i>Aliment Pharmacol Ther</i>	21 Suppl 2	92-98	2005
Mutoh H, Satoh K, Kita H, Sakamoto H, Hayakawa H, Yamamoto H, Isoda N, Tamada K, Ido K & Sugano K	Cdx2 specifies the differentiation of morphological as well as functional absorptive enterocytes of the small intestine	<i>Int J Dev Biol</i>	49	867-871	2005
Mutoh H, Sakurai S, Satoh K, Osawa H, Tomiyama T, Kita H, Yoshida T, Tamada K, Yamamoto H, Isoda N, Ido K & Sugano K	Pericryptal fibroblast sheath in intestinal metaplasia and gastric carcinoma	<i>Gut</i>	54	33-39	2005
Kita H, Yamamoto H, Nakamura T, Shirakawa K, Terano A & Sugano K	Bleeding polyp in the mid small intestine identified by capsule endoscopy and treated by double-balloon endoscopy	<i>Gastrointest Endosc</i>	61	628-629	2005
Kawamoto C, Ido K, Isoda N, Hozumi M, Nagamine N, Ono K, Sato Y, Kobayashi Y, Nagae G & Sugano K	Long-term outcomes for patients with solitary hepatocellular carcinoma treated by laparoscopic microwave coagulation	<i>Cancer</i>	103	985-993	2005
Iwamoto M, Yamamoto H, Kita H, Sunada K, Hayashi Y, Sato H & Sugano K	Double-balloon endoscopy for ileal GI stromal tumor	<i>Gastrointest Endosc</i>	62	440-441; discussion 441	2005
Ishino Y, Ido K & Sugano K	Contamination with hepatitis B virus DNA in gastrointestinal endoscope channels: risk of infection on reuse after on-site cleaning	<i>Endoscopy</i>	37	548-551	2005

Ishikawa M, Yoshida K, Yamashita Y, Ota J, Takada S, Kisanuki H, Koinuma K, Choi YL, Kaneda R, Iwao T, Tamada K, Sugano K & Mano H	Experimental trial for diagnosis of pancreatic ductal carcinoma based on gene expression profiles of pancreatic ductal cells	<i>Cancer Sci</i>	96	387-393	2005
Hayashi Y, Yamamoto H, Kita H, Sunada K, Sato H, Yano T, Iwamoto M, Sekine Y, Miyata T, Kuno A, Iwaki T, Kawamura Y, Ajibe H, Ido K & Sugano K	Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small bowel injuries identified by double-balloon endoscopy	<i>World J Gastroenterol</i>	11	4861-4864	2005
Haruta H, Yamamoto H, Mizuta K, Kita Y, Uno T, Egami S, Hishikawa S, Sugano K & Kawarasaki H	A case of successful enteroscopic balloon dilation for late anastomotic stricture of choledochojejunostomy after living donor liver transplantation	<i>Liver Transpl</i>	11	1608-1610	2005
Arai Y, Tamada K, Satoh Y, Wada S, Tano S, Hanatsuka K, Ohashi A & Sugano K	Ultrasonography with liquid type CalorieMate for gallbladder motility	<i>Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi</i>	102	1412-1416	2005
Aoki H, Ohnishi H, Hama K, Ishijima T, Satoh Y, Hanatsuka K, Ohashi A, Wada S, Miyata T, Kita H, Yamamoto H, Osawa H, Sato K, Tamada K, Yasuda H, Mashima H & Sugano K	Autocrine Loop between Transforming Growth Factor- β 1 and Interleukin-1 β through Smad3- and ERK-dependent Pathways in Rat Pancreatic Stellate Cells	<i>Am J Physiol Cell Physiol</i>			2005

REVIEW

DNA micro-array analysis of myelodysplastic syndrome

HIROYUKI MANO

Division of Functional Genomics, Jichi Medical School, Kawachigun, Tochigi, Japan

Abstract

Myelodysplastic syndrome (MDS) is an enigmatic disorder characterized by ineffective hematopoiesis and dysplastic morphology of blood cells. The clinical course of MDS consists of distinct stages, with early stages often progressing to advanced ones or to acute myeloid leukemia (AML). Little is known of the molecular pathogenesis of MDS or of the mechanism of its stage progression. DNA micro-array analysis, which allows simultaneous monitoring of the expression levels of tens of thousands of genes, has the potential to provide insight into the pathophysiology of MDS. Several studies have applied this new technology to compare gene expression profiles either between MDS and the healthy condition, among the different stages of MDS or between MDS-derived AML and *de novo* AML. Selection of an appropriate hematopoietic fraction is important for such studies, which to date have been performed with differentiated granulocytes, CD34⁺ progenitors and CD133⁺ immature cells. These studies have revealed that each stage of MDS has its own 'molecular signature', indicating the feasibility of differential diagnosis of MDS based on gene expression profile. They have also demonstrated that the current clinical diagnosis of MDS results in the misclassification of patients with regard to these molecular signatures.

Keywords: *Myelodysplastic syndrome, DNA micro-array, acute myeloid leukemia, stage progression, gene expression profile*

Introduction

Myelodysplastic syndrome (MDS) is an enigmatic disorder that is characterized by 2 clinical manifestations: ineffective hematopoiesis (cytopenia in peripheral blood despite hyper- or normal cellularity in bone marrow) and dysplastic morphology of blood cells [1]. MDS mostly affects the elderly, with an incidence of 15–50 cases per 100 000 people per year [2]. Clonality in multiple lineages of blood cells is found in individuals with MDS, suggesting that MDS is a clonal disorder of multi-potent stem cells in bone marrow [3].

An important aspect of MDS is that it comprises different clinical stages. According to the World Health Organization (WHO) classification of MDS [4], affected individuals whose bone marrow contains < 5% blasts are diagnosed with refractory anemia (RA), RA with ringed sideroblasts (RARS), refractory cytopenia with multi-lineage dysplasia (RCMD) or refractory cytopenia with multi-lineage dysplasia and ringed sideroblasts (RCMD-RS), whereas those whose bone marrow contains 5–9%

or 10–19% blasts are diagnosed with RA with excess blasts (RAEB)-1 or RAEB-2, respectively. About 10–30% of MDS patients at the early stages (RA, RARS, RCMD or RCMD-RS) will eventually undergo stage progression to RAEB and, subsequently, to acute myeloid leukemia (AML).

Despite the relatively high incidence of MDS, its molecular pathogenesis is poorly understood (Figure 1). Gene mutations or other genomic alterations that might give rise to RA or RCMD remain to be identified and the ineffective hematopoiesis apparent in MDS patients remains to be characterized at the molecular biological level. It is also not known what triggers progression of early stages of MDS to advanced ones in some individuals but not others.

Cytopenia in peripheral blood is also found in patients with aplastic anemia (AA). Although the bone marrow of most individuals with AA is characterized by hypocellularity, the difference in marrow cellularity between patients with AA and those with RA or RCMD is not always clear. Anti-thymocyte globulin, a standard treatment for AA, is also effective in a sub-set of patients at the early

Correspondence: Hiroyuki Mano, MD, PhD, Division of Functional Genomics, Jichi Medical School, 3311-1 Yakushiji, Kawachigun, Tochigi 329-0498, Japan. Tel: +81-285-58-7449. Fax: +81-285-44-7322. E-mail: hmano@jichi.ac.jp

Received for publication 15 July 2005.

ISSN 1042-8194 print/ISSN 1029-2403 online © 2006 Taylor & Francis
DOI: 10.1080/10428190500264231