



Title	DJ-1の浸潤性胆管癌に対するバイオマーカーとしての有効性に関する検討
Author(s)	田畑, 佑希子
Description	配架番号 : 2425
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13290号
Issue Date	2018-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13290
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71885
Type	doctoral thesis
File Information	Yukiko_Tabata.pdf



学位論文

DJ-1 の浸潤性胆管癌に対する
バイオマーカーとしての有効性に関する検討

(DJ-1 is a useful biomarker for invasive
extrahepatic cholangiocarcinoma)

2018 年 9 月

北海道大学

田畑 佑希子

学位論文

DJ-1 の浸潤性胆管癌に対する
バイオマーカーとしての有効性に関する検討

(DJ-1 is a useful biomarker for invasive
extrahepatic cholangiocarcinoma)

2018 年 9 月

北海道大学

田畑 佑希子

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語集	6 頁
実験方法	7 頁
実験結果	13 頁
考察	23 頁
総括および結論	25 頁
謝辞	26 頁
引用文献	27 頁

発表論文目録および学位発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Yukiko Tabata, Yoshitsugu Nakanishi, Kanako C. Hatanaka, Yutaka Hatanaka, Takahiro Tsuchikawa, Keisuke Okamura, Takehiro Noji, Toshiaki Shichinohe, Yoshihiro Matsuno and Satoshi Hirano

DJ-1 is useful biomarker for invasive extrahepatic cholangiocarcinoma.

Human Pathology, 76, 28-36 (2018)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

Yukiko Tabata, Masaki Miyamoto, Takehiro Maki, Yutaka Hatanaka, Kanako C. Kubota, Yoshihiro Matsuno, Satoshi Hirano

The protein analysis of bile duct cancer using tissue microarray, and the application to pathological diagnosis.

第 71 回日本癌学会学術総会, 2012/09/20, 札幌.

緒 言

肝外胆管癌 (extrahepatic cholangiocarcinoma: EHCC) の発生頻度は 1.02 /100,000 人とされている。人種間で発症頻度に差があり、アメリカ合衆国では白人 1 に対して黒人は 0.93 と少なく、日本人を含むアジア系で 1.38、ヒスパニック系で 1.31 と多い (Saha et al., 2016)。また、性差もあり、男性 1.2 /100,000 人に対して女性 0.8 /100,000 人と男性に多く、年齢は 70 歳代に多い (Aljiffry et al., 2009)。

また EHCC は、いまだ予後不良な悪性腫瘍の一つである (Nagino et al., 2013)。予後不良である要因の一つに比較的診断が困難である点が挙げられる。臨床症状は早期ではほとんどなく、あっても非特異的である。閉塞性黄疸で発症することがあるが、病期が進行していることが多い。近年では画像診断が向上しており、腹部超音波 (US) の感度は 89%、magnetic resonance cholangiography (MRCP) で感度 88%、特異度 95%、内視鏡的逆行性胆道造影 (ERCP) で感度 75-85%、特異度 70-75%、超音波内視鏡 (EUS) で感度 78%、特異度 84%、intraductal ultrasonography (IDUS) で感度 90%、特異度 93%と報告されている (Aljiffry et al., 2009)。組織生検の技術も向上し、腫瘍組織を得られるようになってきたが、EHCC では胆汁うっ滞により正常胆管上皮にも炎症性変化を伴うことが多いため、細胞診や病理組織診断の正確性は十分とは言えず、ERCP による擦過細胞診の感度は 30-88%、超音波内視鏡下穿刺吸引術 (EUS-FNA) による組織診の感度は 84%と報告されている (Miyazaki et al., 2015; Selvaggi, 2004; Wu et al., 2011)。血清腫瘍マーカーについても、臨床応用されているものは carcinoembryonic antigen (CEA) や carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9) など消化器癌で広く使用されているマーカーのみで、EHCC に特異的なものはない (Aljiffry et al., 2009; Khan et al., 2002)。

EHCC の根治を得られる治療法は手術のみであるとされる。標準治療となる術式は、胆嚢管合流部より肝臓側に腫瘍の主座がある肝門部領域胆管癌では肝外胆管・尾状葉切除を伴う肝葉切除、胆嚢管の合流部より十二指腸側に主座がある遠位胆管癌では臍頭十二指腸切除であり、肝門部ならびに遠位胆管に両領域へ広範囲に癌は進展している場合には肝葉切除と臍頭十二指腸切除を同時に必要とする術式も適応される。いずれも極めて侵襲の大きな術式であり、肝不全などの重篤な術後合併症や手術関連死は他の消化器外科手術の中でも最も高率である (Nakanishi et al., 2016)。近年、手術手技や周術期管理の進歩により合併症は減少傾向にあり、肝門部胆管癌の国内の high volume center の報告 (Nagino et al., 2013) では、術後肝不全は 2000 年以前の 80%程から、2006-2010 年には 39.8%まで改善している。この報告では合併症率は 43.1%、手術関連死は 1.4%とされ、海外では USA の high volume center10 施設による報告 (Schimizzi et al., 2018) においても合併症率 69%、術後 30 日死亡率 8%と報告されており、やはり他臓器癌の手術と比べ危

陰性は高いと言える。

EHCC においては腫瘍遺残のない完全切除 (R0)、リンパ節転移陰性 (N0) であることが術後予後良好な因子とされている (Lim et al., 2012)。肝門部胆管癌の報告 (Nagino et al., 2013) では、5 年生存率は M0R0 症例のうち N0 症例が 67.1%であったのに対して所属リンパ節転移陽性 (N1) 症例は 22.1%であった。遠隔転移なし、組織学的または肉眼的断端陽性 (M0R1-2) 症例は 18.0%であり、リンパ節転移は腫瘍遺残に匹敵する予後不良因子と考えられる。また遠位胆管癌の報告でも、リンパ節転移を認めた症例で予後不良であり、その個数が多くなるほど不良であった (Kiriya et al., 2015)。よって、進行 EHCC では、遠隔転移がない症例でも所属リンパ節転移を伴う症例では、外科的切除を回避すべきと考えられるが、現在術前にリンパ節転移の有無を正確に診断する技術はない。すなわち EHCC 患者個々において最良の治療方針を決定するため、術後予後やリンパ節・遠隔転移の予測因子となりうる新規バイオマーカーの開発が期待されている。

このことから、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室 II では新規胆道癌バイオマーカー同定を目的として Liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) -based proteomics の手法を用いて、EHCC の手術検体より得た同一患者の胆管癌組織と非腫瘍性胆管組織に発現している蛋白の差異を網羅的に検索し、胆管癌組織で発現が亢進している蛋白を 38 種類拾い上げた。そのうち種類の蛋白については、さらに臨床検体を用いた免疫組織学的染色によって、腫瘍組織での発現を確認しており、その一つが DJ-1 である。(Kawase et al., 2009)

DJ-1 遺伝子は 1 番染色体の短腕 (1p36.12-1p36.33) に位置し、家族性パーキンソン病の原因遺伝子である PARK7 と同一であることが明らかになっている。DJ-1 蛋白は 189 個のアミノ酸からなる 20kda の蛋白で、その配列は原核細胞および真核細胞で保存されている。二次構造は 7 の β -strands と 9 の α -helices を持ち、二量体を形成している。正常組織では上皮細胞、平滑筋、血管、神経細胞で発現し、細胞質や核、ミトコンドリアに存在している (Ariga et al., 2013; Cao et al., 2015; Le Naour et al., 2001)。DJ-1 蛋白は複数の機能について報告があるが、現在もっともよく知られている機能の一つは、酸化ストレスから神経細胞を保護するというものである (Biosa et al., 2017)。パーキンソン病における神経変性の機序は明らかになっていないが、酸化ストレスとミトコンドリア機能不全が原因と考えられている。DJ-1 蛋白の持つ抗酸化作用は、superoxide dismutase (SOD1) に対する copper chaperone として働くこと、SOD1 や Trx1 などの抗酸化能を持つ遺伝子の転写を促進すること、あるいは蛋白凝集を防ぐ chaperone として働くことなど、単一ではなく複数の機序を介していることが明らかになっている。そのため、DJ-1 遺伝子の抗酸化ストレス能の機能不全がパーキンソン病発症の原因である可能性が示唆されている (Ariga et al., 2013; Biosa et al., 2017)。

乳癌、非小細胞肺癌、膵癌、食道扁平上皮癌、喉頭癌など、多くの腫瘍細胞で DJ-1 蛋白の過剰発現が報告されている (He et al., 2012; MacKeigan et al., 2003; Shen et al., 2011;

Tian et al., 2008; Tsuchiya et al., 2012; Yuen et al., 2008; Zeng et al., 2011)。DJ-1 蛋白の各悪性腫瘍の発癌における役割については Table 1 に示すように複数の報告があるが、その詳細についてはいまだ不明である (Cao et al., 2015)。また、DJ-1 蛋白の発現と EHCC の臨床病理学的因子や術後予後との関連について検討した報告はない。

Table 1. DJ-1 蛋白の癌化における役割

PTEN: phosphatase and tensin homolog, Bax: Bcl-2 associated X, MAPK: mitogen-activated protein kinase, MEKK1: mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 1, HIF-1: hypoxia-inducible factor-1

因子	機序	文献
PTEN	DJ-1 が PTEN に結合し抑制することで PI3K/AKT pathway を介して、survivin の発現が増加し、細胞増殖が誘導され、アポトーシスを阻害する。	Kim et al., 2015; Kim et al., 2005; Kim et al., 2009
p53	DJ-1 が p53 に結合することで p53 の promoter DNA へ結合を阻害し、アポトーシス促進因子である Bax の転写を抑制する。	Fan et al., 2008
Daxx	DJ-1 が核内で Daxx と結合し細胞質への移動を阻害することで、Daxx が細胞質で MAPK pathway を介して誘導するアポトーシスを抑制する。	Junn et al., 2005
MEKK1	細胞質で DJ-1 が MEKK1 と結合し、核内への移動を阻害することで MEKK1 が細胞質に留まり、アポトーシスを亢進する SEK1-JNK1 の下流シグナルを抑制する。	Mo et al., 2008
ERK/SRC phosphorylation cascade	DJ-1 が ERK/SRC phosphorylation cascade を活性化し、細胞の遊走や浸潤を促進する。	He et al., 2012
Nrf2	酸化ストレスにより DJ-1 が Keap1 による Nrf2 分解を阻害し、転写を活性化する。	Clements et al., 2006
HIF-1	低酸素により DJ-1 が PI3K/Akt/mTOR pathway を活性化し、HIF-1 α を安定化することで、細胞死を防ぐ。	Kim et al., 2005; Vasseur et al., 2009

一方、悪性腫瘍患者における血清 DJ-1 蛋白濃度に関しては、乳癌や胃癌、子宮体癌、

ブドウ膜黒色腫など複数の癌腫において、健常者と比較して高値であったことが報告されている (Di Cello et al., 2017; Le Naour et al., 2001; Pardo et al., 2006; Shimwell et al., 2012)。さらに、Kawate らの報告では乳癌において血清 DJ-1 高値がリンパ節転移や遠隔転移と関連していた (Kawate et al., 2015)。また、乳癌では乳汁中の (Oda et al., 2012)、膵癌では膵液中の (Tian et al., 2008)DJ-1 蛋白濃度が高値であることも示されており、血清中やこれらの液性検体に含まれる DJ-1 蛋白値が新たな診断マーカーや予後予測因子として期待されている。担癌患者における DJ-1 の血清や乳汁、膵液中への蛋白高発現となる機序としては、腫瘍細胞からの細胞外分泌によると考えられている (Oda et al., 2012; Tian et al., 2008)。DJ-1 分泌の機序は明らかにされていないが、乳癌由来細胞株では培養細胞抽出蛋白と培地の両方に DJ-1 蛋白が含まれていることが確認されており、培養細胞から DJ-1 蛋白が分泌されていることは確かである (Le Naour et al., 2001)。また、細胞外分泌には、N 末端にシグナルペプチドを持つ蛋白が分泌顆粒や分泌小胞を介して分泌される経路 (classical pathway) と、リン脂質やコレステロール、スフィンゴ糖脂質、カベオリンで構成されるカベオラ、もしくはラフトからなる microdomain を介して分泌される経路 (non-classical pathway) があるが、DJ-1 蛋白はシグナルペプチドを持たず、一部の細胞株抽出蛋白では microdomain と同じ分画に含まれていることから、後者の non-classical pathway により細胞外に分泌されている可能性が示唆されている (Tsuboi et al., 2008)。

本研究では、多数例の浸潤性 EHCC 組織から作成された tissue micro array (TMA) を用いて免疫組織学的 (immunohistochemical: IHC) 染色を行うことにより、浸潤性 EHCC 組織における DJ-1 発現を score 化し評価した。さらに score の高低による臨床病理学的特徴、ならびに術後予後の差異について評価した。また、血清 DJ-1 蛋白値についても現在まで EHCC との関連性は報告されておらず、本研究では血清 DJ-1 値を健常者と浸潤性 EHCC 患者で測定・比較し、DJ-1 が新たな血清バイオマーカーとして臨床応用可能かの検討を行った。

上記の検討の結果、非腫瘍性胆管上皮細胞と比較して浸潤性 EHCC 細胞の細胞質における DJ-1 蛋白の発現頻度が高値であることが示された。また、浸潤性 EHCC 症例群において、DJ-1 細胞質低発現群は、高発現群と比較して予後不良であった。さらに、血清 DJ-1 蛋白値は EHCC 患者と健常者との間に差はなかったが、リンパ節もしくは遠隔他臓器に転移を有する患者では転移のない患者よりも高値である傾向があった。以上より、浸潤性 EHCC 組織での細胞質における DJ-1 低発現と血清 DJ-1 値の高値が、EHCC での予後不良や転移の予測因子として有用なバイオマーカーとなりうると考えられた。

略語集

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

EHCC	extrahepatic cholangiocarcinoma
LC-MS	liquid chromatography mass spectrometry
ELISA	enzyme-linked immune sorbent assay
FFPE	formalin fixed paraffin embedded tissue
HE	hematoxylin and eosin
IHC	immunohistochemical
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate – poly-acrylamide gel electrophoresis
TMA	tissue micro array
WB	Western blot
HRP	horse radish peroxidase

実験方法

本研究は Figure 1 に示した過程で検討を行った。

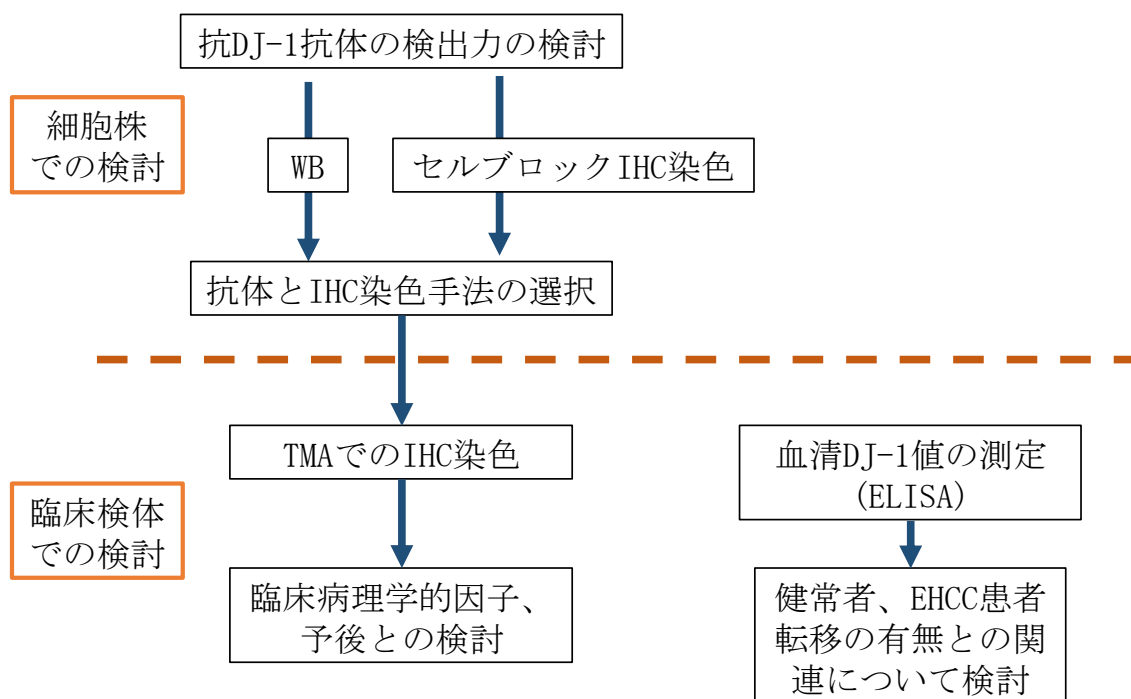


Figure 1. 本研究における検討の過程

1. 細胞株の蛋白発現と抗 DJ-1 抗体の検出力についての検討

immunohistochemical (IHC) 染色での検討に用いる抗 DJ-1 抗体とその手法を決定するため、同一の細胞株に対して Western blot (WB) と IHC 染色を行い、DJ-1 蛋白の検出の有無について比較した。

1.1. 細胞株

ヒト胆道癌由来細胞株は TFK-1, RBE, HuCCT-1, HuH28, TKKK の 5 種 (RIKEN BioResource Center Cell Bank, Japan) を、ヒト胎児腎細胞由来細胞株は HEK293 の 1 種 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いた。各細胞株は 5%CO₂ 下、37.1℃ のインキュベーター内で培養を行った。細胞培地として、TFK-1, RBE, HuCCT-1, HuH28 には RPMI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を、TKKK と HEK293 には Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を使用し、それぞれにウシ胎児血清

10%, ペニシリンストレプトマイシン 1% を添加した。

抽出した蛋白で WB を行い、培養細胞からセルブロックを作製し、IHC 染色を行った。

1.2. Western blot

シャーレで培養した細胞株を Protease inhibitor (phenylmethanesulfonyl fluoride 2 μ l, aprotinin 2 μ l) を含む triple detergent buffer 2 ml で浸し、4°C で 20 分間の処理を行った。12,000 rpm, 20 分間の遠心分離を行い、得られた上清を -80°C で冷凍保存した。

細胞株からの上清は、蛋白 12 μ g/18 μ l で調整し、15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) で分離し、nitrocellulose membrane (Amersham, Aylesbury, UK) に転写した。DJ-1 に対する抗体は DJ-1 mouse monoclonal antibody (MBL, Nagoya, Japan) (以下 DJ-1A 抗体)、DJ-1 mouse monoclonal antibody (Invitrogen, Waltham, MA, USA) (以下 DJ-1B 抗体) を使用した (Table 2)。それぞれの希釈率は、DJ-1A 抗体を 1:1,000 dilution、DJ-1B 抗体を 1:20 dilution とし、control として Anti-beta Actin mouse monoclonal antibody (Millipore, Tokyo, Japan) を 1:1,000 で使用した。二次抗体は peroxidase-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) を 1:10,000 dilution で用い、反応はそれぞれ室温、60 分間で行った。結合の検出は ECL-Plus Western Blotting detection system (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) により化学発光法で行った。

Table 2. 一次抗体と希釈率

抗体略称	一次抗体	希釈率	
		WB	IHC 染色
DJ-1A	DJ-1 mouse monoclonal antibody (MBL, Nagoya, Japan)	1:1,000	1:20,000
DJ-1B	DJ-1 mouse monoclonal antibody (Invitrogen, Waltham, MA, USA)	1:20	1:5,000

1.3. セルブロックの作製

各細胞株の培養細胞をスクレイパーで機械的に回収し、3,000 rpm, 3 分間で遠心分離して得られたペレットをホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin fixed paraffin embedded tissue: FFPE) しセルブロックを作製した。4 μ m で薄切し、hematoxylin and eosin (HE) 染色と IHC 染色を行った。

1.4. Immunohistochemical staining

薄切した FFPE 切片をキシレンとエタノールで脱パラフィン処理した後、citrate buffer (pH 6.1) を用いた熱処理により抗原賦活処理を行い、自動免疫組織染色装置 Autostainer Link 48 (Dako, Santa Clara, CA, USA) にて免疫組織染色 (ポリマー法) を行った。抗体は Table2 に示すように、DJ1-A 抗体を 1:20,000 dilution, DJ1-B 抗体を 1:5,000 dilution で用い、WB とセルブロックによる IHC 染色を対応させて検討した

2. 浸潤性胆管癌組織と非腫瘍性上皮での DJ-1 蛋白発現についての検討

2.1. Tissue micro array (TMA) 対象症例

1995 - 2005 年に北海道大学病院消化器外科 II 教室で初回手術を受け、外科的切除された EHCC (浸潤癌) 症例を対象とし、FFPE 標本の状態が tissue micro array (TMA) 作製に適しない症例は除外した。96 例が対象症例となり、背景は男性 76 例、女性 20 例で、年齢は中央値 69 歳 (44 - 84 歳)、histopathological grade は G1; 16 例、G2-3; 80 例、pT stage は pT1; 32 例、pT2-4 ; 64 例、pN stage は pN0; 49 例、pN1-2 ;47 例、脈管侵襲はリンパ管で 67 例、静脈で 62 例に認めた。

Table 3. TMA 対象 EHCC 患者の背景

Sex	male	76
	female	20
Age (years)	44-84 (median 69)	
Histopathological grading	G1	28
	G2, G3	68
pT	T1	32
	T2	1
	T3	44
	T4	19
pN	N0	49
	N1	47
pM	M0	91
	M1	5
Lymphatic invasion	Absence	29
	Presence	67

Venous invasion	Absence	34
	presence	62

2.2. TMA の作製

対象症例の FFPE 標本の状態や HE 染色標本の所見を確認し、TMA 作製に適している部位を選定した。1 症例あたり腫瘍部分 (浸潤癌) を 4 か所選定し、非腫瘍性胆管上皮が含まれる症例では正常部分として 3 か所まで選定した。

manual tissue microarrayer (Tokyo Instruments, Tokyo, Japan) を用いて、HE 染色標本で選定した部位を、core として FFPE 標本のパラフィンブロックから径 0.6 mm、深さ 3 - 4 mm にて採取し、レシピエントパラフィンブロックに 0.5 mm 間隔で配列した。

作製したレシピエントブロックは、通常の FFPE 標本と同様、4 μ m で薄切し、HE 染色と免疫染色を行った。

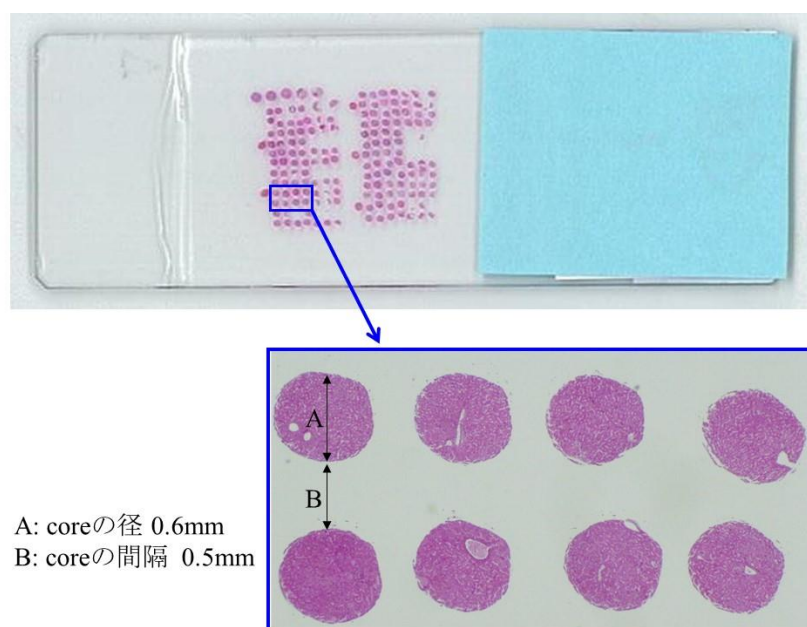


Figure 2. TMA の作製例 (HE 染色)

core として FFPE 標本のパラフィンブロックから径 0.6mm、深さ 3-4mm にて採取し、レシピエントパラフィンブロックに 0.5mm 間隔で配列した。A: core の径 0.6mm, B: core の間隔 0.5mm。

2.3. TMA 検体の IHC 染色および評価

セルブロックでの検証により選択した方法で IHC 染色を行った。コントロールにセルブロックを用いた。

評価は H score を用いた。染色強度を 4 段階 [grade 0, 1 (weak), 2 (moderate), 3 (strong)] とし、各 core の腫瘍細胞に占める割合を掛け合わせ score とした。各 core の平均値を症例の score とし、10 以上を陽性とした。例として染色強度 grade 0, +1, +2, +3 が、それぞれ 10%, 30%, 35%, 25% の core では、 $(0 \times 10 + 1 \times 30 + 2 \times 35 + 3 \times 25) = 175$ が score となる。

3. Enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) による血清 DJ-1 蛋白の発現についての検討

EHCC 患者と健常者の血清 DJ-1 蛋白濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) の手法を用いて比較した。対象として健常者 10 例、EHCC 患者 28 例の血清を用いた。EHCC 患者をさらに、手術時にリンパ節もしくは遠隔臓器に転移を伴う症例を転移陽性群 (n = 12)、いずれにも転移を認めない症例を転移陰性群 (n = 16) に亜分類した。EHCC 患者は 2015 - 2016 年に北海道大学病院消化器外科 II で外科的に切除された初回手術例のみであり、血清は手術室で執刀直前に採血し、-80℃ で凍結保存し、血清検体については、北海道大学治験審査委員会のガイドラインに従い、術前に患者の同意を得た方のみを使用した。

ELISA は CirculexTM Human DJ1/PARK7 ELISA kit (MBL, Nagano, Japan) を使用し、製造会社のプロトコールに準じて施行された。すなわち、希釈されたサンプルと段階的に希釈された Human DJ1/PARK7 standard solution を、ELISA plate 上の適切な well に加え、インキュベートした。次に、well 内で固定された一次抗体である anti-DJ1/PARK7 monoclonal antibody とサンプル中の DJ1 蛋白に結合させた。洗浄した後、horse radish peroxidase (HRP) -conjugated anti-DJ1/PARK7 antibody (二次抗体) を各 well に加えて静置し、一次反応で well 内に補足された DJ-1 蛋白と結合させた。洗浄した後、HRP に対する比色サブストレートを加えて反応させ、stop solution を添加し発色を停止させた。450 nm の吸光度を測定し、同時に定量した DJ1/PARK7 standard solution の吸光度を用いて血清検体の DJ-1 値を計算した。

4. 統計学的解析

臨床検体での IHC 染色と臨床病理学的因子との関連はカイ二乗検定と Mann-Whitney U 検定を用いた。生存解析は Kaplan-Meier 法を用い log-rank test にて検定を行った。血

清 DJ-1 蛋白による転移予測については receiver operating characteristic (ROC) 曲線を用いて血清 DJ-1 蛋白の cut off 値を設定し、Fisher's exact test で検証した。予後因子の単変量・多変量解析は Cox 比例ハザードモデルにて検討した。上記には JMP Pro for Mac version 12.0.1 software (SAS Institute, Cary, NC) を使用した。

実験結果

1. 細胞株の蛋白発現と抗 DJ-1 抗体の検出力についての検討

TFK-1, RBE, HuCCT-1, HuH28, TKKK のヒト胆道癌由来細胞株 5 種と、HEK293 のヒト胎児腎細胞由来細胞株 1 種での DJ-1 蛋白の発現について、2 種の抗 DJ-1 抗体を用いた WB と IHC 染色で比較した。

1.1. Western blot (WB)

WB では、DJ-1 はすべての細胞株で、28kDa に検出された。RBE での発現は乏しく、他の細胞株では明らかな陽性であった。陽性の細胞株の中でも TFK-1 と HEK293 でより強く陽性を示した。TFK-1 は DJ-1B 抗体でより強く検出していたが、2 種の抗 DJ-1 抗体は、おおむね同様の結果であった。

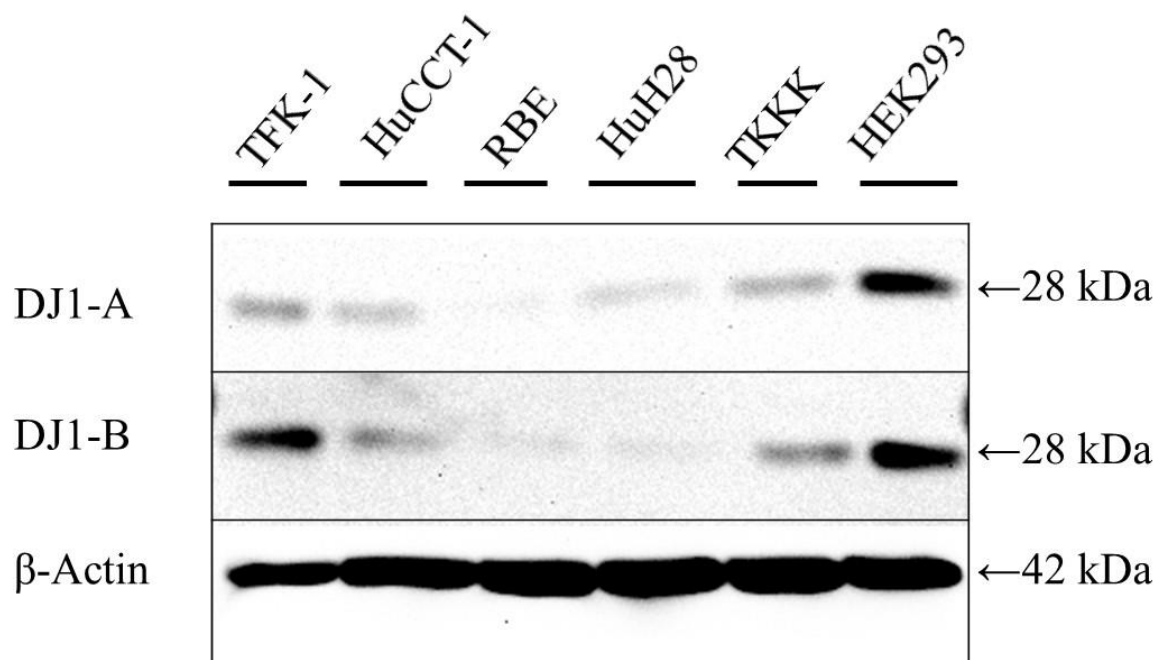


Figure 3. Western blot.

DJ-1A, DJ-1B の両抗体ともに、28 kDa で検出した。6 種の細胞株で発現していたが、RBE での発現は乏しく、HEK293 で特に強く発現していた。

1.2. 細胞株セルブロックでの IHC 染色

DJ-1A, B 両抗体とも TFK-1, HuCCT-1, HuH28 が陽性、RBE が陰性であり、染色パター

ンは大まかに一致していたが、HEK293 は DJ-1A 抗体の方がより強く陽性を示した。

細胞株での WB と IHC 染色の対応する結果に基づき、DJ-1A 抗体を臨床検体での IHC 染色検索に用いる抗体として選択した。

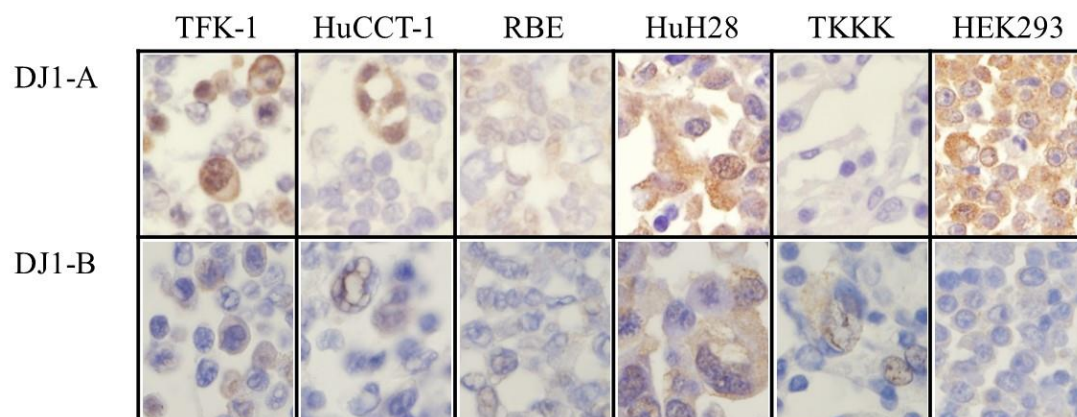


Figure 4. 細胞株セルブロックでの IHC 染色

DJ-1A, DJ-1B の両抗体でおおむね同様の染色態度であったが、HEK293 は DJ-1A 抗体でより強く陽性であった。WB と IHC 染色の結果がより一致していたことから、DJ-1A 抗体を臨床検体での IHC 染色に用いる抗体とした。

2. 浸潤性胆管癌組織と非腫瘍性上皮での DJ-1 蛋白発現

細胞株で検証した結果より選択した DJ-1A 抗体を用いて、臨床検体で作製した TMA での IHC 染色を行い、浸潤性胆管癌組織と非腫瘍性上皮での DJ-1 蛋白の発現頻度を調べ、臨床病理学的因子や予後との関連を検討した。

2.1. TMA での IHC 染色 (EHCC と非腫瘍性上皮の比較)

非腫瘍性上皮 66 検体での DJ-1 H score は、細胞質で中央値 0 (0-90)、核で中央値 0 (0-160) であった。EHCC 96 検体では、細胞質で中央値 0 (0-120)、核で中央値 4 (0-108) であった。この結果から、細胞質、核共に score 10 以上を陽性と定義した。

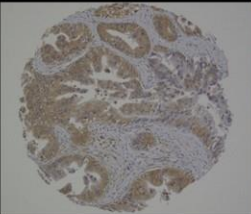
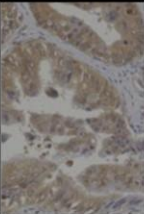
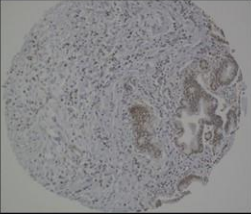
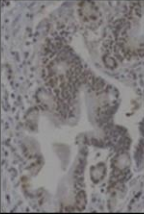
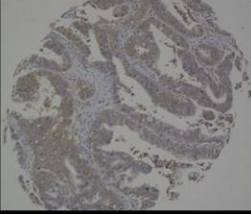
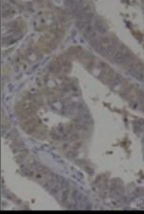
HE	DJ-1	high-power field	score
A			nucleus score: 10 (0: 90%, 1+: 10%, 2+: 0%, 3+: 0%)
			cytoplasm score: 70 (0: 30%, 1+: 70%, 2+: 0%, 3+: 0%)
B			nucleus score: 160 (0: 20%, 1+: 0%, 2+: 80%, 3+: 0%)
			cytoplasm score: 0 (0: 100%, 1+: 0%, 2+: 0%, 3+: 0%)
C			nucleus score: 0 (0: 100%, 1+: 0%, 2+: 0%, 3+: 0%)
			cytoplasm score: 100 (0: 0%, 1+: 100%, 2+: 0%, 3+: 0%)

Figure 5. TMA での IHC 染色による DJ-1 発現の検討

DJ-1 蛋白は核と細胞質に発現していた。評価には H score を用いた。例を 3 つの core で示す。左から、同一 core に対する HE 染色、DJ-1A 抗体での IHC 染色、IHC 染色の腫瘍細胞の強拡大、H score での評価を示す。

score 10 を cut off 値とすると、非腫瘍性胆管上皮細胞で IHC 染色は核で陽性が 18 例 (27.3%)、細胞質で陽性が 7 例 (10.6%) であった。一方、EHCC では核で陽性が 39 例 (40.6%)、細胞質で陽性が 28 例 (29.2%) だった。EHCC で非腫瘍性上皮細胞よりも核で陽性となる頻度が高かったが、有意な差ではなかった ($p=0.095$)。一方、細胞質における発現は、EHCC 細胞は非腫瘍性胆管上皮細胞と比較して有意に陽性頻度が高い結果であった ($p=0.006$)。

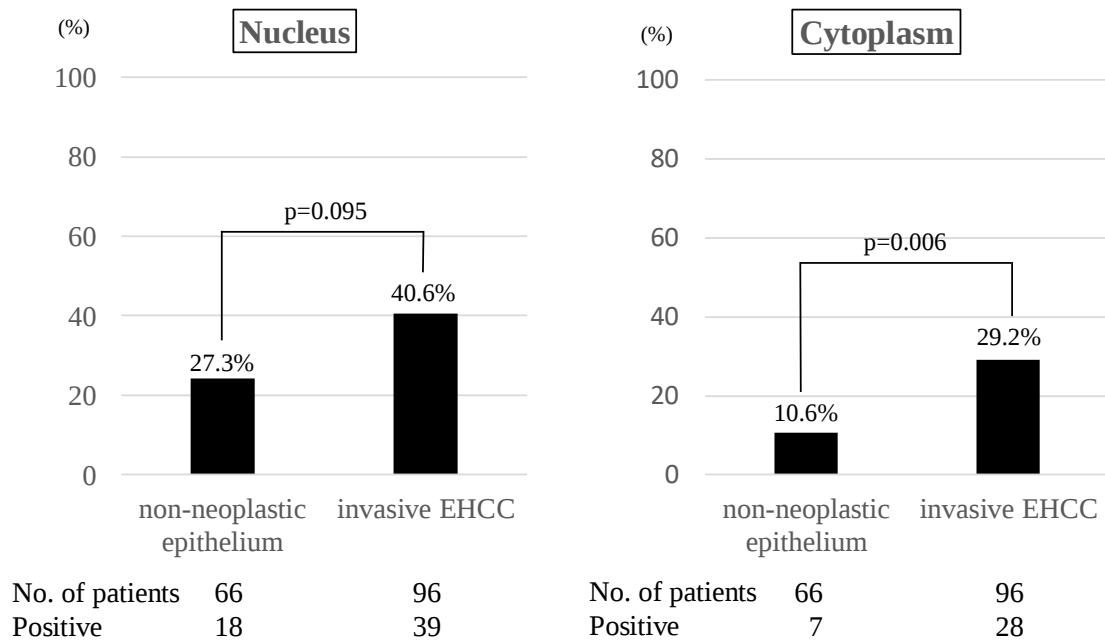


Figure 6. 浸潤性 EHCC と非腫瘍性上皮での DJ-1 蛋白発現頻度

Score 10 以上を陽性とした。核、細胞質ともに、EHCC で非腫瘍性上皮よりも発現頻度が高かった。

2.2. EHCC 症例における DJ-1 発現と臨床病理学的因子の関連性

EHCC 症例 96 例を、核と細胞質の DJ-1 の IHC 染色の発現強度を H score 10 以上を基準に、それぞれに陽性群・陰性群の 2 群に分けた。核での陽性群が 39 例、陰性群が 57 例であり、細胞質での陽性群が 28 例、陰性群が 68 例であった。

この核、細胞質における染色強度による 2 群間について、臨床病理学的因子との関連を検討した。核、細胞質ともに DJ-1 陽性群と陰性群の間に臨床病理学的因子の差はなかった。

Table 4. EHCC 96 例の DJ-1 蛋白発現と臨床病理学的因子との関連

IHC staining of DJ-1	Nucleus			Cytoplasm		
	Positive	Negative	p	Positive	Negative	p
	n=39	n=57		n=28	n=68	
Sex						
Male	32	44	0.618	21	55	0.584
Female	7	13		7	13	
Age (years)						
<70	21	29	0.837	14	36	0.825
≥70	18	28		14	32	
Histopathological grade						
G1	10	6	0.092	3	13	0.382
G2, G3	29	51		25	55	
pT						
pT1	14	18	0.666	9	23	>0.999
pT2-pT4	25	39		19	45	
pN						
pN0	16	33	0.146	13	36	0.655
pN1 or pN2	23	24		15	32	
Lymphatic invasion						
Absence	10	19	0.5	6	23	0.328
Presence	29	38		22	45	
Venous invasion						
Absence	14	20	>0.999	8	26	0.483
Presence	25	37		20	42	

2.3. EHCC 細胞における IHC 染色による DJ-1 発現と予後の関連

2.2 で分類された核、細胞質それぞれにおける IHC 染色による DJ-1 陽性・陰性群間の予後について Kaplan-Meier 法で比較した。細胞質では DJ-1 陽性群で全生存率が陰性群

よりも良好だった ($p=0.0257$)。核では DJ-1 陽性群と陰性群に差はなかった ($p=0.492$)。

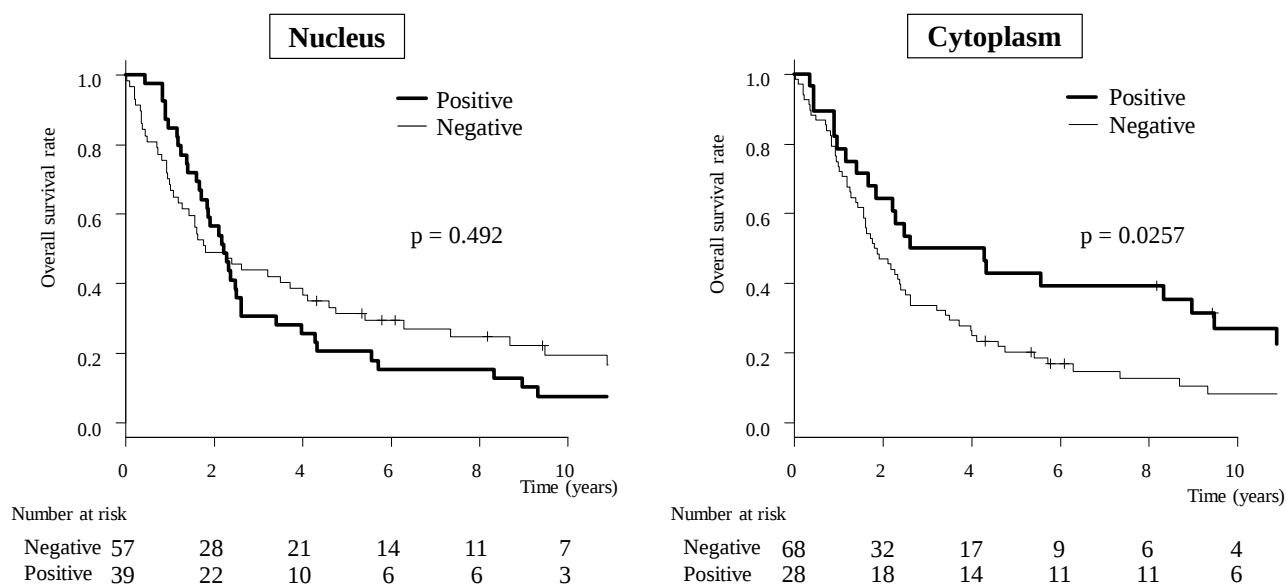


Figure 7. IHC 染色での DJ-1 発現と予後.

核染色における陽性群と陰性群に全生存率の差はなかったが、細胞質染色においては陰性群で陽性群よりも不良であった。

2.4. 予後因子の検討

予後と DJ-1 発現を含む各因子との関連を、cox 比例ハザードモデルで検討した。多変量解析で、リンパ節転移陽性、遠隔転移陽性、細胞質での DJ-1 陰性が独立した予後不良因子であった。

Table 5. EHCC 96 例の overall survival と各因子との関連性 (単変量、多変量解析)

MST, median survival time; HR, hazard ratio; CI, confidence interval; *pM, distant metastasis found by postoperative pathological examinations.

			Univariate			Multivariate		
MST			HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
n	(months)							
Sex								
Male	76	26.8	0.92	0.54-1.55	0.75			

3. 血清 DJ-1 蛋白の発現についての検討

健常者の血清と EHCC 患者から手術直前に採取された血清に含まれる DJ-1 蛋白について、ELISA 法で検討した。

3.1. 健常者と EHCC 患者での血清 DJ-1 蛋白発現

血清 DJ-1 値の中央値は、健常者 10 例では 27.0 (3.2-118.7) ng/ml、EHCC 患者 28 例では 28.7 (13.0-83.3) ng/ml であった。健常者と EHCC 患者の間で、血清 DJ-1 値に有意差はなかった ($p=0.353$)。

EHCC 患者 28 例のうち、転移陰性群 12 例では 27.6 (13.1-83.3) ng/ml、転移陽性群 16 例では 40.9 (17.6-75.4) ng/ml であり、転移陽性群で血清 DJ-1 が高い傾向にあった ($p=0.137$)。

Table 6. ELISA 対象症例 28 例の臨床病理学的背景と血清 DJ-1 値

* p: perihilar. d: distal. x: unknown

Patient	Age (years)	Sex	Predominant site*	G	pT	pN	pM	Serum DJ-1 (ng/ml)
1	80	M	d	2	1	0	0	34.6
2	75	F	d	2	3	0	0	13.1
3	74	M	d	3	3	0	0	19.6
4	70	M	d	3	3	0	0	17.7
5	71	M	p	2	2	0	0	27.2
6	68	M	p	2	2	0	0	28.9
7	66	M	p	2	2	0	0	28.0
8	74	M	p	3	2	0	0	22.5
9	73	M	p	3	2	0	0	28.5
10	52	M	p	3	2	0	0	83.3
11	73	M	p	3	2	0	0	60.7
12	72	M	p	3	2	0	0	17.2
13	64	M	p	3	2	0	1 (liver)	17.6
14	71	M	d	3	3	1	0	40.6

15	81	M	d	3	3	1	0	27.8
16	67	M	d	3	3	1	0	22.1
17	71	M	d	3	2	1	0	48.8
18	62	M	p	adenosquamous	2	1	0	45.3
19	66	M	p	2	2	1	0	27.9
20	62	F	p	2	3	1	0	42.1
21	70	M	p	2	2	1	0	28.3
22	79	F	p	2	2	1	0	18.9
23	67	M	p	3	3	1	0	43.5
24	63	F	p	3	2	1	0	41.2
25	65	M	p	3	2	1	0	75.4
26	65	F	p	3	2	1	0	30.2
27	78	M	p	x	x	1	x	50.3
28	63	F	p	x	x	x	1 (peritoneum)	47.4

3.2. EHCC 患者での血清 DJ-1 値による転移予測

EHCC 患者での転移予測について血清 DJ-1 値の最適な cut-off 値を検討した。ROC 曲線より、optimal cut off point は血清 DJ-1 値 40.6 ng/ml (area under the curve = 0.667) であった。cut off 値を 40 ng/ml に設定すると、感度 56.3%、特異度 77.3%であった。血清 DJ-1 >40.0 ng/ml の症例は、転移陰性例が 12 例中 2 例 (16.7%)、転移陽性例が 16 例中 9 例 (56.3%) であり、転移陽性の頻度が高い傾向にあった ($p=0.054$, Fisher's exact test)。

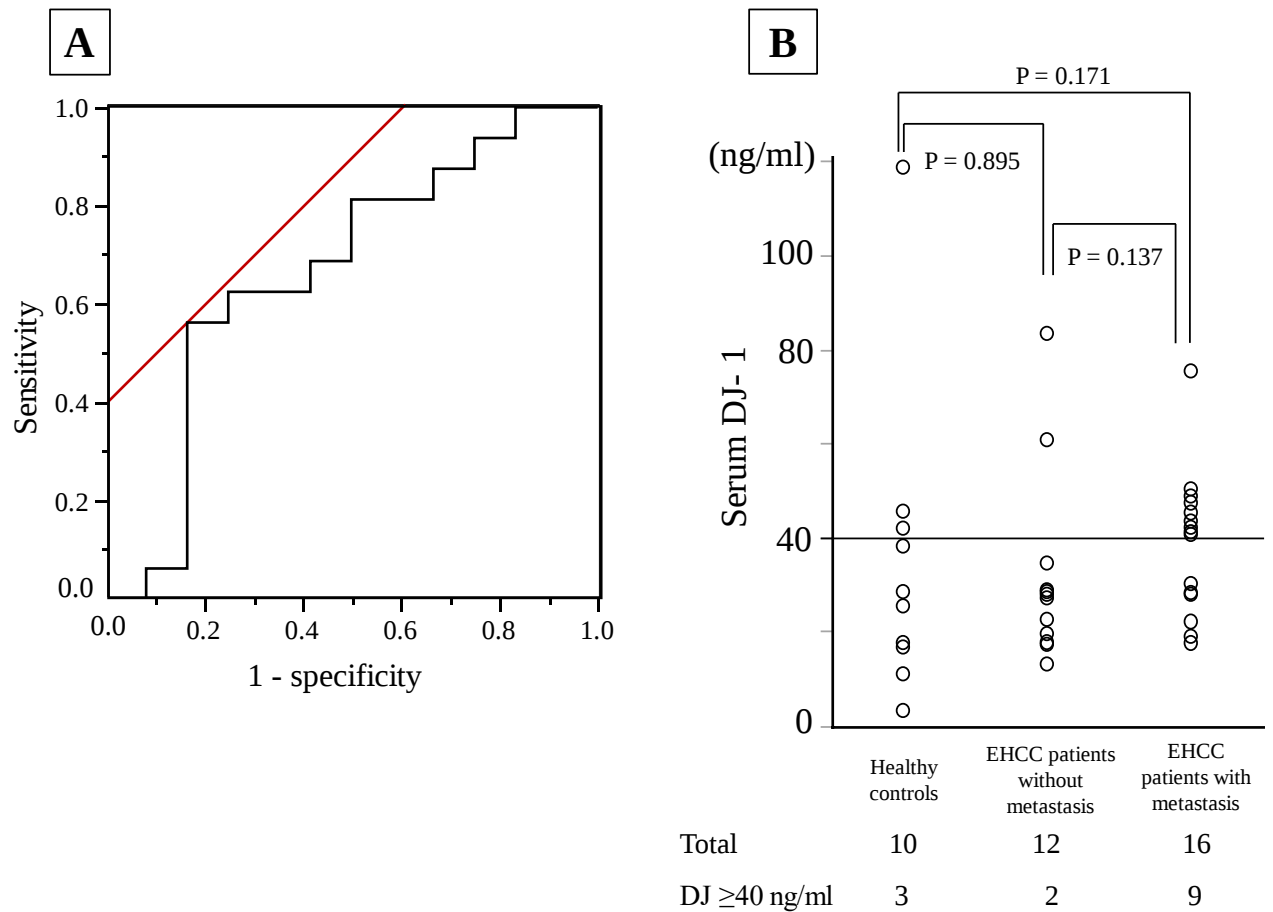


Figure 8. 血清 DJ-1 値の検討

A: 血清 DJ-1 値による転移予測についての ROC 曲線: optimal cut off point は血清 DJ-1 値 40.6 ng/ml であった。(area under the curve = 0.667).

B: 各群の血清 DJ-1 値: 血清 DJ-1 値が 40.0 ng/ml 以上の EHCC 患者は、転移陽性で多い傾向にあった ($p = 0.054$, Fisher's exact test).

考察

EHCC 細胞における DJ-1 蛋白の発現の有無や局在は明らかにされておらず、本研究では IHC 染色で浸潤性 EHCC と非腫瘍性胆管上皮での発現の頻度と局在を検討した。しかし、DJ-1 蛋白の IHC 染色の手法は確立されておらず、臨床検体での DJ-1 蛋白の発現をより正確に検出するために、はじめに細胞株を用いて IHC 染色の手法を検証した。同一の細胞株について、WB による DJ-1 蛋白発現の検出の有無とセルブロックでの IHC 染色による DJ-1 蛋白発現の検出の有無を比較し、より再現性の高い抗 DJ-1 抗体と染色条件を用いて臨床検体での IHC 染色を行った。さらに、臨床検体の IHC 染色を行う際に、はじめの検討で用いた細胞株のセルブロックを染色のコントロールとすることで、IHC 染色の精度をより高めた。また、すべての検体を同一条件で染色するため、TMA の手法を用いて多数の臨床検体を同一のパラフィンブロックに載せ、同一のプレパラートで IHC 染色を行った。

細胞株の検討で決定した IHC 染色の手法と TMA を用いて、96 症例の浸潤性胆管癌組織とそれらの症例に対応する非腫瘍性胆管上皮 66 検体における DJ-1 蛋白の発現頻度と局在について検討した。DJ-1 は核と細胞質に発現していたが、細胞膜での発現は認めなかった。EHCC では非腫瘍性胆管上皮と比較して細胞質で DJ-1 陽性となる頻度が高かったが、核では両者の発現頻度に有意な差はなかった。一方、細胞質での発現頻度に差はあったが、EHCC での陽性率は 29%であり、良悪性の判別に用いる診断マーカーとしての感度は高くなかった。

血清 DJ-1 蛋白の検討では、転移陰性群と健常者には差は認めなかったが、転移陽性群は転移陰性群よりも血清 DJ-1 値が高値となる傾向があった。乳癌、子宮体癌、膀胱癌など他臓器癌での報告には、健常者よりも胆癌患者で血清 DJ-1 値が高値となる報告が散見される (Chen et al., 2012; Di Cello et al., 2017; Kawate et al., 2015; Le Naour et al., 2001)が、本研究では EHCC 患者と健常者に差はなく異なる結果であった。一方で、転移の有無と血清 DJ-1 との関連については、Kawate ら (Kawate et al., 2015)が乳癌で血清 DJ-1 値がリンパ節もしくは遠隔転移のある患者で転移のない患者よりも高値であったと本研究と同様の報告をしており、転移陽性群のみ血清 DJ-1 が高値となった結果より、血清 DJ-1 蛋白は発癌よりも転移にとの関わりが強い因子であると推測した。血清 DJ-1 は転移の予測因子として期待され、さらに行った検討では EHCC において血清 DJ-1 値の cut-off 値を 40ng/ml と設定すると、術前に転移を予測できる可能性が示唆された。

IHC 染色での DJ-1 蛋白発現の有無と臨床病理学的因子との検討では、いずれの因子

とも関連は認めなかったが、生存解析では細胞質の DJ-1 陽性群は陰性群と比較して全生存率が良好であった。また、多変量解析でも細胞質での DJ-1 陰性が独立した予後不良因子であった。浸潤性乳管癌において本研究と同様に IHC 染色で DJ-1 陰性患者は陽性患者よりも有意に予後が不良との報告がある (Tsuchiya et al., 2012)。乳癌ではさらに Tsuchiya ら (Tsuchiya et al., 2012) が、IHC 染色にて腫瘍組織での DJ-1 蛋白低発現の患者では高発現の患者よりも平均血清 DJ-1 値が有意に高値であったと報告している。本研究では IHC 染色での細胞質陰性は独立した予後不良因子であり、転移の有無との相関は確認されなかったが、転移陽性の症例で血清 DJ-1 が高値であったことから、間接的に血清 DJ-1 高値と浸潤癌組織での DJ-1 蛋白低発現、予後不良の 3 因子に関連が推測された。具体的には、①EHCC 組織から DJ-1 蛋白が細胞外分泌されており、分泌を反映して IHC 染色で EHCC 組織に DJ-1 蛋白が低発現かつ血清 DJ-1 蛋白が高値となっている、②分泌された血清中の DJ-1 蛋白が転移や再発に関連している、と推測した。しかし、血清中の DJ-1 蛋白が浸潤性 EHCC 患者の転移にどのように影響しているかは不明であり、単純に転移がある患者の腫瘍量増加を反映して血清 DJ-1 値が高値となっているだけで、腫瘍の転移などの活動性とは関連がない可能性も否定はできず、EHCC における DJ-1 蛋白の動態や機能について、より詳しい検討が必要である。

また、EHCC 細胞から DJ-1 蛋白が細胞外分泌されているのであれば、胆汁にも DJ-1 蛋白が含まれている可能性がある。乳癌では乳汁中 DJ-1 蛋白発現についての検討がされており、良性、非浸潤癌 (ductal carcinoma in situ)、浸潤性乳管癌の順に、乳頭分泌の DJ-1 蛋白量が増加すると報告されている。また、IHC 染色で乳癌細胞での DJ-1 蛋白発現が少ない症例で乳汁中 DJ-1 蛋白が高値であり、乳癌細胞からの細胞外分泌により乳汁中 DJ-1 が高値になっている可能性が示唆され、有用なバイオマーカーとして期待されている (Oda et al., 2012; Tsuchiya et al., 2012)。胆汁は術前でも検体として得ることが可能であり、胆汁中 DJ-1 についても EHCC における新規バイオマーカーとして期待される。

今後、同一症例の EHCC 細胞と血清での DJ-1 蛋白発現の有無を対応させて検討することで、DJ-1 が EHCC 細胞からの分泌蛋白であると証明されれば、腫瘍組織での DJ-1 発現や血清 DJ-1 値が EHCC での予後予測や転移予測におけるバイオマーカーとして有用となる可能性が期待される。

総括および結論

本研究では、下記の事項が明らかになった。

- ① 浸潤性 EHCC 組織では非腫瘍性胆管上皮と比較して細胞質での DJ-1 蛋白陽性となる頻度が高い。
- ② 浸潤性 EHCC 組織の細胞質の IHC 染色での DJ-1 蛋白 陰性は、多変量解析で独立した予後不良因子である。
- ③ リンパ節もしくは遠隔臓器に転移のある浸潤性 EHCC 患者は転移のない患者よりも血清 DJ-1 値が高値となる傾向がある。

上記①より浸潤性 EHCC では非腫瘍胆管上皮より DJ-1 蛋白産生がより多いことが示唆される。一方②より、浸潤性 EHCC での細胞質における DJ-1 蛋白の発現は良好な予後の予測因子となり得ることが示され、また③より、術前血清 DJ-1 値はリンパ節もしくは遠隔臓器への転移の予測因子となり得ると考えられた。

今後の展開としては、浸潤性 EHCC 組織での DJ-1 発現や血清 DJ-1 値は、EHCC での予後予測や転移予測に有用なバイオマーカーとして臨床応用の可能性が挙げられる。しかし、本研究では症例数が少数かつ組織内 DJ-1 タンパク発現が TMA による検討であった。よって、浸潤性 EHCC に対する臨床応用のためには、大規模な浸潤性 EHCC 患者コホートによる whole section 検体、血清を使用した研究が必要と考える。

また、さらなる課題として、EHCC における DJ-1 蛋白が予後や転移に関連する機序については本研究では検討されなかった。本研究の結果ならびに乳癌に関する多施設からの研究結果より、DJ-1 蛋白が細胞外分泌された結果を反映して、IHC での細胞質陰性かつ血清 DJ-1 高値となっていると推測し、それに基づいて浸潤性 EHCC 細胞から DJ-1 蛋白が細胞外分泌され、血清中に存在する DJ-1 蛋白が転移に関わっているとの仮説を立てた。仮説の検証のためには、乳癌で検討されているように、細胞株と細胞培地内、さらには浸潤性 EHCC 患者の whole section と血清での DJ-1 蛋白発現の有無を対応させた検討が必要である。

謝辞

本研究の機会を与えていただき、御指導いただきました、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅱ 平野 聡 教授に感謝いたします。

又、多大な御指導をいただきました北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅱ 中西喜嗣 特任助教に深く感謝いたします。Tissue micro array 作製について協力をいただきました北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅱ 真木健裕 先生に深く感謝いたします。

さらに、病理組織学的診断や免疫組織化学染色の検討について御指導いただいた北海道大学病院臨床研究開発センター 畑中佳奈子 特任講師、北海道大学病院ゲノムコンパニオン診断研究部門 畑中豊 特任講師、北海道大学病理診断科 松野吉宏 教授および、血清蛋白の検討について御指導いただいた北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅱ 土川貴裕 講師に深く感謝いたします。

最後に、本研究にお力添えいただいた、北海道大学病院病理部の皆様、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅱ の皆様に感謝申し上げます。

引用文献

Aljiffry, M., Abdulalah, A., Walsh, M., Peltekian, K., Alwayn, I., and Molinari, M. (2009). Evidence-based approach to cholangiocarcinoma: a systematic review of the current literature. *J. Am. Coll. Surg.* 208, 134-147.

Ariga, H., Takahashi-Niki, K., Kato, I., Maita, H., Niki, T., and Iguchi-Ariga, S.M. (2013). Neuroprotective function of DJ-1 in Parkinson's disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013

Biosa, A., Sandrelli, F., Beltramini, M., Greggio, E., Bubacco, L., and Bisaglia, M. (2017). Recent findings on the physiological function of DJ-1: Beyond Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 108, 65-72.

Cao, J., Lou, S.Y., Ying, M.D., and Yang, B. (2015). DJ-1 as a human oncogene and potential therapeutic target. *Biochem. Pharmacol.* 93, 241-250.

Chen, Y., Kang, M., Lu, W., Guo, Q., Zhang, B., Xie, Q., and Wu, Y. (2012). DJ-1, a novel biomarker and a selected target gene for overcoming chemoresistance in pancreatic cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 138, 1463-1474.

Clements, C.M., McNally, R.S., Conti, B.J., Mak, T.W., and Ting, J.P. (2006). DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 15091-15096.

Di Cello, A., Di Sanzo, M., Perrone, F.M., Santamaria, G., Rania, E., Angotti, E., Venturella, R., Mancuso, S., Zullo, F., Cuda, G., et al. (2017). DJ-1 is a reliable serum biomarker for discriminating high-risk endometrial cancer. *Tumour Biol.* 39

Fan, J., Ren, H., Jia, N., Fei, E., Zhou, T., Jiang, P., Wu, M., and Wang, G. (2008). DJ-1 decreases Bax expression through repressing p53 transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 283, 4022-4030.

He, X., Zheng, Z., Li, J., Ben, Q., Liu, J., Zhang, J., Ji, J., Yu, B., Chen, X., Su, L., et al. (2012). DJ-1 promotes invasion and metastasis of pancreatic cancer cells by activating SRC/ERK/uPA.

Carcinogenesis 33, 555-562.

Junn, E., Taniguchi, H., Jeong, B.S., Zhao, X., Ichijo, H., and Mouradian, M.M. (2005). Interaction of DJ-1 with Daxx inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 activity and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9691-9696.

Kawase, H., Fujii, K., Miyamoto, M., Kubota, K.C., Hirano, S., Kondo, S., and Inagaki, F. (2009). Differential LC-MS-based proteomics of surgical human cholangiocarcinoma tissues. *J. Proteome Res.* 8, 4092-4103.

Kawate, T., Iwaya, K., Koshikawa, K., Moriya, T., Yamasaki, T., Hasegawa, S., Kaise, H., Fujita, T., Matsuo, H., Nakamura, T., et al. (2015). High levels of DJ-1 protein and isoelectric point 6.3 isoform in sera of breast cancer patients. *Cancer Sci.* 106, 938-943.

Khan, S.A., Davidson, B.R., Goldin, R., Pereira, S.P., Rosenberg, W.M., Taylor-Robinson, S.D., Thillainayagam, A.V., Thomas, H.C., Thursz, M.R., and Wasan, H. (2002). Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: consensus document. *Gut* 51 Suppl 6, Vi1-9.

Kim, J., Won, K.J., Jung, S.H., Lee, K.P., Shim, S.B., Kim, M.Y., Kim, J.H., Lee, J.U., and Kim, B. (2015). DJ-1 protects against undernutrition-induced atrophy through inhibition of the MAPK-ubiquitin ligase pathway in myoblasts. *Life Sci.* 143, 50-57.

Kim, R.H., Peters, M., Jang, Y., Shi, W., Pintilie, M., Fletcher, G.C., DeLuca, C., Liepa, J., Zhou, L., Snow, B., et al. (2005). DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell* 7, 263-273.

Kim, Y.C., Kitaura, H., Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M., and Ariga, H. (2009). Oxidation of DJ-1-dependent cell transformation through direct binding of DJ-1 to PTEN. *Int. J. Oncol.* 35, 1331-1341.

Kiriyama, M., Ebata, T., Aoba, T., Kaneoka, Y., Arai, T., Shimizu, Y., Nagino, M., and Nagoya Surgical Oncology, G. (2015). Prognostic impact of lymph node metastasis in distal cholangiocarcinoma. *Br. J. Surg.* 102, 399-406.

Le Naour, F., Misek, D.E., Krause, M.C., Deneux, L., Giordano, T.J., Scholl, S., and Hanash,

S.M. (2001). Proteomics-based identification of RS/DJ-1 as a novel circulating tumor antigen in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 7, 3328-3335.

Lim, C.S., Jang, J.Y., Lee, S.E., Kang, M.J., and Kim, S.W. (2012). Reappraisal of hepatopancreatoduodenectomy as a treatment modality for bile duct and gallbladder cancer. *J. Gastrointest. Surg.* 16, 1012-1018.

MacKeigan, J.P., Clements, C.M., Lich, J.D., Pope, R.M., Hod, Y., and Ting, J.P. (2003). Proteomic profiling drug-induced apoptosis in non-small cell lung carcinoma: identification of RS/DJ-1 and RhoGDIalpha. *Cancer Res.* 63, 6928-6934.

Miyazaki, M., Yoshitomi, H., Miyakawa, S., Uesaka, K., Unno, M., Endo, I., Ota, T., Ohtsuka, M., Kinoshita, H., Shimada, K., et al. (2015). Clinical practice guidelines for the management of biliary tract cancers 2015: the 2nd English edition. *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.* 22, 249-273.

Mo, J.S., Kim, M.Y., Ann, E.J., Hong, J.A., and Park, H.S. (2008). DJ-1 modulates UV-induced oxidative stress signaling through the suppression of MEKK1 and cell death. *Cell Death Differ.* 15, 1030-1041.

Nagino, M., Ebata, T., Yokoyama, Y., Igami, T., Sugawara, G., Takahashi, Y., and Nimura, Y. (2013). Evolution of surgical treatment for perihilar cholangiocarcinoma: a single-center 34-year review of 574 consecutive resections. *Ann. Surg.* 258, 129-140.

Nakanishi, Y., Tsuchikawa, T., Okamura, K., Nakamura, T., Tamoto, E., Noji, T., Asano, T., Amano, T., Shichinohe, T., and Hirano, S. (2016). Risk factors for a high Comprehensive Complication Index score after major hepatectomy for biliary cancer: a study of 229 patients at a single institution. *HPB (Oxford)* 18, 735-741.

Oda, M., Makita, M., Iwaya, K., Akiyama, F., Kohno, N., Tsuchiya, B., Iwase, T., and Matsubara, O. (2012). High levels of DJ-1 protein in nipple fluid of patients with breast cancer. *Cancer Sci.* 103, 1172-1176.

Pardo, M., Garcia, A., Thomas, B., Pineiro, A., Akoulitchiev, A., Dwek, R.A., and Zitzmann, N. (2006). The characterization of the invasion phenotype of uveal melanoma tumour cells shows the presence of MUC18 and HMG-1 metastasis markers and leads to the identification of DJ-1

as a potential serum biomarker. *Int. J. Cancer* 119, 1014-1022.

Saha, S.K., Zhu, A.X., Fuchs, C.S., and Brooks, G.A. (2016). Forty-Year Trends in Cholangiocarcinoma Incidence in the U.S.: Intrahepatic Disease on the Rise. *Oncologist* 21, 594-599.

Schimizzi, G.V., Jin, L.X., Davidson, J.T.t., Krasnick, B.A., Ethun, C.G., Pawlik, T.M., Poultides, G., Tran, T., Idrees, K., Isom, C.A., et al. (2018). Outcomes after vascular resection during curative-intent resection for hilar cholangiocarcinoma: a multi-institution study from the US extrahepatic biliary malignancy consortium. *HPB (Oxford)* 20, 332-339.

Selvaggi, S.M. (2004). Biliary brushing cytology. *Cytopathology* 15, 74-79.

Shen, Z., Ren, Y., Ye, D., Guo, J., Kang, C., and Ding, H. (2011). Significance and relationship between DJ-1 gene and surviving gene expression in laryngeal carcinoma. *Eur. J. Histochem.* 55, 50-54.

Shimwell, N.J., Ward, D.G., Mohri, Y., Mohri, T., Pallan, L., Teng, M., Miki, Y.C., Kusunoki, M., Tucker, O., Wei, W., et al. (2012). Macrophage migration inhibitory factor and DJ-1 in gastric cancer: differences between high-incidence and low-incidence areas. *Br. J. Cancer* 107, 1595-1601.

Tian, M., Cui, Y.Z., Song, G.H., Zong, M.J., Zhou, X.Y., Chen, Y., and Han, J.X. (2008). Proteomic analysis identifies MMP-9, DJ-1 and A1BG as overexpressed proteins in pancreatic juice from pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *BMC Cancer* 8, 241.

Tsuboi, Y., Munemoto, H., Ishikawa, S., Matsumoto, K., Iguchi-Ariga, S.M., and Ariga, H. (2008). DJ-1, a causative gene product of a familial form of Parkinson's disease, is secreted through microdomains. *FEBS Lett.* 582, 2643-2649.

Tsuchiya, B., Iwaya, K., Kohno, N., Kawate, T., Akahoshi, T., Matsubara, O., and Mukai, K. (2012). Clinical significance of DJ-1 as a secretory molecule: retrospective study of DJ-1 expression at mRNA and protein levels in ductal carcinoma of the breast. *Histopathology* 61, 69-77.

- Vasseur, S., Afzal, S., Tardivel-Lacombe, J., Park, D.S., Iovanna, J.L., and Mak, T.W. (2009). DJ-1/PARK7 is an important mediator of hypoxia-induced cellular responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 1111-1116.
- Wu, L.M., Jiang, X.X., Gu, H.Y., Xu, X., Zhang, W., Lin, L.H., Deng, X., Yin, Y., and Xu, J.R. (2011). Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy in the evaluation of bile duct strictures and gallbladder masses: a systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 23, 113-120.
- Yuen, H.F., Chan, Y.P., Law, S., Srivastava, G., El-Tanani, M., Mak, T.W., and Chan, K.W. (2008). DJ-1 could predict worse prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17, 3593-3602.
- Zeng, H.Z., Qu, Y.Q., Zhang, W.J., Xiu, B., Deng, A.M., and Liang, A.B. (2011). Proteomic analysis identified DJ-1 as a cisplatin resistant marker in non-small cell lung cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 3489-3499.