

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15191

研究課題名(和文)膵癌の機能的診断を目標とした新規バイオマーカーの開発

研究課題名(英文)Development of functionally identified biomarker for pancreatic cancer

研究代表者

増井 俊彦(Masui, Toshihiko)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：20452352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌の早期発見を目指して、膵癌特異的なマーカーとしてオートファジーアダプター因子p62に着目し、その解析を行った。p62の発現は膵臓では少なく、膵癌細胞株で著明に増強。また蛋白レベルで培養上清と細胞内濃度とが相関、p62は細胞外にも分泌。ヒト担がん患者の術前と術後の血清におけるp62の発現は3例中2例で低下が認められず低い値でのばらつきがみられることから、ELISAの感度が十分でないことを示唆。免疫染色では膵癌組織では約半数でp62とLC3が増強していたが、臨床学的な悪性度との相関はなく、膵神経内分泌腫瘍6例にて全例強発現しておりp62は神経内分泌腫瘍のマーカーとなり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To identify the serological early detection marker for pancreatic cancer, we determined the autophagy adapter factor p62 as a promising target and conducted the analysis. p62 protein was most scarce in pancreas tissue and pancreatic cancer cell lines had markedly high expression comparing to the other cancer cell lines. The supernatant had p62 protein in correlation with the protein level in the cell itself. When we measured by ELISA the serum of the pancreatic cancer patients before and after resection, we found 14% decrease of the p62 in one out of 3 patients however, we could not find fixed results. We concluded that the sensitivity of ELISA was not enough for detection. Our immunohistochemical staining of p62 as well as LC3 on pancreatic cancer tissue showed no tendency between the malignancy and the staining intensity. However, all 6 pancreatic neuroendocrine tumors (NET) showed high expression level of both p62 and LC3, suggesting that p62 could be a potential biomarker for NET.

研究分野：膵臓

キーワード：膵癌 膵内分泌腫瘍 p62 オートファジー マーカー

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は依然として5年生存率が10%以下であり、罹患率と死亡率がほぼ同等の予後不良の癌である。一方、癌を引き起こす最初の変異から成熟した癌細胞形成までに10年以上の遅延期間が存在することが明らかとなり (Nature 467,1114,2010) また、膵癌といえども浸潤を来す手前の早期癌の状態を切除を行うと、早期胃癌と遜色ない良好な成績が得られることから早期診断の重要性が強調されてきている。これまでに行われてきたCT、MRI、USといった画像診断法は優れた診断装置であるが、これらの検査をルーチン化して健常人に頻回に行うことは現実的ではない。加えて、これらは正常部分と正常でない部分の画像化されたイメージの相違に基づく診断法であり、癌細胞の生物学的特性・機能を反映したものではなく、従って病変個々の進展様式、進展速度および治療への反応の予測などといった質的診断に関して、決して十分とはいえない。こうした事実は、現状の技術における画像診断の限界を示している。一方、膵癌の血中マーカーに関しても依然発展途上であり (Tumour Biol. 34:3279, 2013)、代表的なマーカーであるCEAであっても (日本膵臓学会資料)、STAGE I - IIでも確実に上昇するとは言えず、STAGE III - IVとの比較においても各ステージに応じた増加があるわけではない。このような状況下で、消化器系の腫瘍に注目して分子生物学的な検討を進めていたところ、膵臓癌に著明に増加し、さらに膵臓癌の生物学的な特徴をよく表わす可能性がある機能性蛋白としてp62を同定した。本蛋白は細胞内異常蛋白の処理およびエネルギー供給源として機能するオートファジーの一部を構成するタンパク質で、分解されるマーキングを行うとともに、細胞内の抗ストレス能 (特に抗酸化能) 生存能 (傷害抑制) の上流に位置するキーとなる分子である。研究者らはこの分子の細胞における生理的機能として、これまでに1)細胞攻撃因子の抑制、2)細胞防御因子の増強、3)細胞死 (傷害) の抑制、4)細胞分裂促進の作用を確認しており、p62が増加することの機能的意義が明らかになってきた。これらの成果を背景にp62の膵癌における抗ストレス能 (特に、低酸素、抗がん剤等に対する耐性)、生存能 (傷害抑制) および細胞増殖等における意義からp62が単なる膵癌の存在診断のみならず、膵癌の悪性度、治療効果などを予測する可能性を持ったマーカーとなりえる可能性があると考え、探索的研究を行った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、病理組織・細胞実験および担がんマウス実験にて、膵癌の生物学的特徴 (特に、生存能の亢進・細胞死に対する抵抗

性、抗ストレス能)・予後と、この分子の発現のより正確な関係を解析し、機能的な意義を明らかにするとともに血液中のバイオマーカーとなり得るかどうかを検討する。また、既存のバイオマーカーと比較検討し、早期発見と膵癌特異性における優越性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

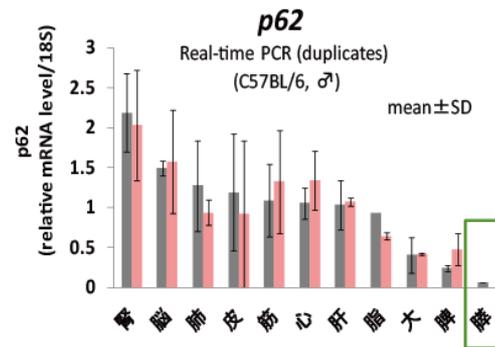
マウス正常組織におけるp62の発現と癌細胞における発現を検討し、癌組織における発現の増強を確認する。

細胞内タンパク質であるp62がELISAにて血清レベルで同定できるかどうか、細胞株およびヒト担がん患者で確認を行う。

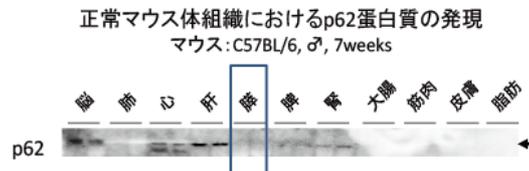
切除標本を用いてp62と膵癌の悪性度との検討を行う。染色およびWestern Blotによる定量にて検討を行う。すでに膵癌組織での強発現の報告は見られるものの詳細な検討は全くされていない (Cancer Cell. 2012 Jan 17;21(1):105-20)。また、もともとp62は前述の細胞死抑制作用を示すごくストレス障害に対応するために細胞内に増加するため、化学療法耐性の原因遺伝子となっている可能性がある。従って、臨床病理学的検討以外に化学療法の効果を含めた検討を行う。

4. 研究成果

マウス正常組織における発現をRT-PCRにてRNAレベルで確認したところ、他の臓器に比べて膵での発現は殆ど確認できなかった。(RT-PCR, 下図)

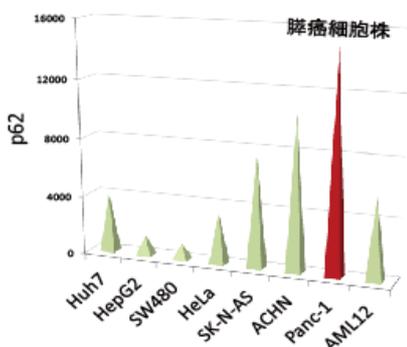


同様に蛋白レベルでも発現はごく少量であった。(Western blot, 下図)



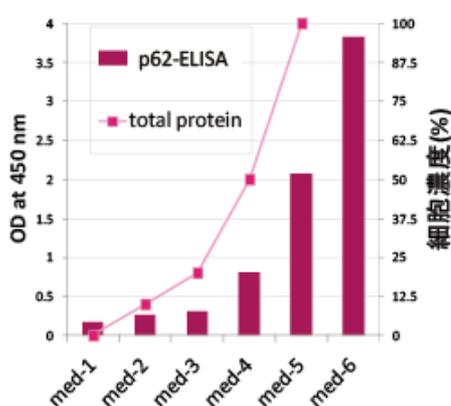
一方、ヒト膵癌株での発現を検討すると同物質の発現は他の細胞株と比べて著明に多く発現していることがRT-PCRで確認され、膵癌細胞特有の発現が見られることが明らかとなった。(次項、上図)

ヒト腫瘍細胞におけるp62タンパクの発現



細胞株における培養液中の濃度をELISAで確認したところ、細胞内濃度と培養上清中の濃度の正の相関が確認された。(下図)

培養液中のp62濃度



次いでヒトがん患者において同意を得た後に術前後での血清レベルをパイロットスタディとして三症例、同ELISAにてp62の発現を解析したところ、2例のうち1例で14%の低下が認められたものの、低い値でのばらつきが大きく、有意な差は認められなかった。その原因として感度の問題が考えられた。今回、血清におけるELISAでの測定系は確立したものの、現時点で手に入るELISAの感度は5-10ng/mlであり、実際には、100pg/ml程度まで感度を上げる必要があると考えられた。本研究の目的である血中のp62を検出するためには新たな検出キットを開発する必要があることが明らかとなった。一方、Western blotはELISAより感度が低いことからWestern blotでの検出は困難と考えられた。

当初の目的であるヒト膵癌の血清レベルでの同定が困難であることから、p62の膵腫瘍における意義を追求するため、研究p62の発現およびオートファジーの関与を病理組織を用いて検討することとし、膵癌、および膵内分泌腫瘍におけるp62およびオートファジーの構成因子の一つであるLC3の発現解析を行った。膵癌切除症例34症例において、p62の発現とLC3の発現を免疫染色にて検討したところ、p62の強発現は14例、41%に認められ、LC3は26例、76%に認められたものの、悪性度、無再発生存率、生存率との相関

は認められなかった。一方、膵内分泌腫瘍(高分化型)で検討したところ、p62およびLC3は100%の腫瘍で強発現しており、膵内分泌腫瘍へのマーカーとしての展開が可能であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計12件)全て査読有り

Masui T, Doi R, Kawaguchi Y, Sato A, Nakano K, Ito T, Anazawa T, Takaori K, Uemoto S. Concurrent gencitabine+S-1 neoadjuvant chemotherapy contributes to the improved survival of patients with small borderline-resectable pancreatic cancer tumors. *Surg Today*. 2016 Nov;46(11):1282-9. doi: 10.1007/s00595-016-1310-z. Epub 2016 Feb 9.

Kodama S, Nakano Y, Hirata K, Furuyama K, Horiguchi M, Kuhara T, Masui T, Kawaguchi M, Gannon M, Wright CV, Uemoto S, Kawaguchi Y. Diabetes Caused by Elastase-Cre-Mediated Pdx1 Inactivation in Mice. *Sci Rep*. 2016 Feb 18;6:21211. doi: 10.1038/srep21211

Nishino H, Hatano E, Seo S, Shibuya S, Anazawa T, Iida T, Masui T, Taura K, Haga H, Uemoto S. Histological features of mixed neuroendocrine carcinoma and hepatocellular carcinoma in the liver: a case report and literature review. *Clin J Gastroenterol*. 2016 Aug;9(4):272-9. doi: 10.1007/s12328-016-0669-0.

Ito T, Hijioka S, Masui T, Kasajima A, Nakamoto Y, Kobayashi N, Komoto I, Hijioka M, Lee L, Igarashi H, Jensen RT, Imamura M. Advances in the diagnosis and treatment of pancreatic neuroendocrine neoplasms in Japan. *J Gastroenterol*. 2017 Jan;52(1):9-18. doi: 10.1007/s00535-016-1250-9.

Masui T, Takaori K, Anazawa T, Sato A, Nakano K, Uchida Y, Yogo A, Goto Y, Matsumoto S, Kodama Y, Kanai M, Isoda H, Mizumoto M, Kawaguchi Y, Shibuya K, Itasaka S and Uemoto S. A prospective study of intensity-modified radiation therapy in comparison with conventional 3D-RT for BR pancreatic cancer patients with arterial involvement. *Anticancer Res*. 2017 Dec;37(12):7023-7030.

Sato A, Masui T, Nakano K, Sankoda N, Anazawa T, Takaori K, Kawaguchi Y, Uemoto S. Abdominal contamination with *Candida albicans* after pancreaticoduodenectomy is related to hemorrhage associated with pancreatic

fistulas. *Pancreatology*. 2017 May - Jun;17(3):484-489. doi: 10.1016/j.pan.2017.03.007.

Sato A, Masui T, Sankoda N, Nakano K, Uchida Y, Anazawa T, Takaori K, Kawaguchi Y, Uemoto S. A case of successful conversion from everolimus to surgical resection of a giant pancreatic neuroendocrine tumor. *Surg Case Rep*. 2017 Dec;3(1):82. doi: 10.1186/s40792-017-0361-8.

Goto T, Elbahrawy A, Furuyama K, Horiguchi M, Hosokawa S, Aoyama Y, Tsuboi K, Sakikubo M, Hirata K, Masui T, Kubo H, Sakai Y, Uemoto S, Kawaguchi Y. Liver-specific Prox1 inactivation causes hepatic injury and glucose intolerance in mice. *FEBS Lett*. 2017 Feb;591(4):624-635. doi: 10.1002/1873-3468.12570.

Eso Y, Uza N, Yamagishi H, Imada K, Kimura Y, Masui T, Kodama Y, Seno H. Utility of KRAS mutational analysis in the preoperative diagnosis of synchronous pancreatic cancer and intrahepatic cholangiocarcinoma: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Dec;96(50):e9217. doi: 10.1097/MD.0000000000009217.

Masui T, Anazawa T, Sato A, Nakano K, Uchida Y, Yogo A, Nagai K, Kawaguchi Y, Takaori K, and Uemoto S Comparison of Recurrence Between Pancreatic and Duodenal Neuroendocrine Neoplasms After Curative Resection: A Single-Institution Analysis. *Ann Surg Oncol*. 2018 Feb;25(2):528-534. doi: 10.1245/s10434-017-6260-1.

Uchida Y, Masui T, Sato A, Nagai K, Anazawa T, Takaori K, Uemoto S. Computer tomographic assessment of postoperative peripancreatic collections after distal pancreatectomy. *Langenbecks Arch Surg*. 2018 Mar 27. doi: 10.1007/s00423-018-1668-z. [Epub ahead of print]

Kondo T, Kanai M, Kou T, Sakuma T, Mochizuki H, Kamada M, Nakatsui M, Uza N, Kodama Y, Masui T, Takaori K, Matsumoto S, Miyake H, Okuno Y, Muto M. Association between homologous recombination repair gene mutations and response to oxaliplatin in pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2018 Apr 13;9(28):19817-19825. doi: 10.18632/oncotarget.24865. eCollection 2018 Apr 13.

〔学会発表〕(計7件)

増井俊彦、佐藤朝日、仲野健三、伊藤達雄、高折恭一、上本伸二 早期

P-NET の外科的治療戦略 第3回 日本神経内分泌腫瘍研究会学術集会 2015年9月12日、仙台市、宮城

T. Masui, A. Sato, K. Takaori, S. Uemoto Pathological factors affecting recurrence of the non-functioning pancreatic NET ENETS 13th annual conference, 2016/3/11-13, Barcelona, Spain

増井俊彦、佐藤朝日、仲野健三、伊藤達雄、穴澤貴行、高折恭一、上本伸二 BR-A 膵癌における強度変調補放射線治療(IMRT)を使用した術前放射線化学療法の効果 第47回膵臓学会大会 2016年8月4-6日、仙台市、宮城

増井俊彦、上本伸二、今村正之 公的組織による神経内分泌腫瘍の登録事業とエビデンス構築 第14回日本臨床腫瘍学会学術集会 2016/7/27-29 神戸市、兵庫

増井俊彦 NET 肝転移に対する TACE の適応と治療成績/新規 modality: DOTATOC PET/CT の有用性と導入への課題 JDDW2016 2016/11/3-6 神戸市、兵庫

T. Masui, A. Sato, K. Takaori, S. Uemoto Establishment of Japan NeuroEndocrine Tumor Society and its registration system ENETS 14th annual conference, 2017/3/11-13, Barcelona, Spain

増井俊彦、仲野健三、佐藤朝日、伊藤達雄、穴澤貴行、高折恭一、上本伸二 The appropriate target and timing of salvage surgery for locally advanced unresectable pancreatic cancer 第72回消化器外科学会総会 2017年7月20-22日、金沢市、金沢

〔図書〕(計4件)

増井俊彦、高折恭一、上本伸二 NAC/NACRT 治療後の画像診断：膵癌血管浸潤の診断能と限界 雑誌：胆と膵 Vol 37(7) 613-622

増井俊彦 膵癌の疫学 新世代の膵癌診療・治療バイブル メディカ出版

増井俊彦、穴澤貴行、高折恭一、上本伸二 癌腫別 Conversion Surgery の戦略 消化器 NET 臨床外科 2017 Oct. vol 72 (10) 1235-1240

増井俊彦、高折恭一、岡島英明、穴澤貴行、上本伸二 外科診療における遺伝学的検査の意義 7. 肝胆膵 日本外科学会雑誌 第119巻 第2号 180-185

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増井 俊彦 (MASUI TOSHIHIKO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号： 20452352

(2) 研究分担者

上本 伸二 (UEMOTO SHINJI)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号： 40252449

芳賀 早苗 (HAGA SANAE)

北海道大学・医学研究科・助教
研究者番号： 60706505

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし