

令和元年6月4日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16527

研究課題名(和文) 膵癌・胆管癌の鑑別診断精度を飛躍的に向上させるタンパク質バイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Novel biomarkers distinguishing pancreatic head Cancer from distal cholangiocarcinoma based on proteomic analysis

研究代表者

前田 晋平 (Maeda, Shimpei)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：90455824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：プロテオーム解析からバイオマーカーとして有望な5種類のタンパク質を同定した。次に膵頭部癌と遠位胆管癌を対象として、両疾患に対する診断精度を統計学的に解析した。その結果、膵頭部癌診断に最も精度が高かったタンパク質はKRT17で、遠位胆管癌の診断に最も精度が高かったタンパク質はPTMSだった。バイオマーカーパネルの診断精度を解析した所、膵頭癌の診断に最も有用なバイオマーカーパネルは、KRT17陽性/ANXA10陽性/TMEM109陽性を示す表現型であり、遠位胆管癌の診断に最も有用なバイオマーカーパネルはKRT17陰性/ANXA10陰性/ PTMS陽性を示す表現型であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質発現プロファイルを解析し、免疫組織化学的検証を経て、膵頭部癌と遠位胆管癌の診断を可能とする5種類のタンパク質を同定した。膵頭部癌の診断に有用なバイオマーカーは、単独ではKRT17であり、バイオマーカーパネルとしてはKRT17陽性/ANXA10陽性/TMEM109陽性を示す表現型であった。一方遠位胆管癌の診断に最も有用なバイオマーカーはPTMSであり、バイオマーカーパネルはKRT17陰性/ANXA10陰性/ PTMS陽性を示す表現型であった。これらのバイオマーカーは膵頭部癌と遠位胆管癌の新規鑑別診断マーカーとして有望であり、現状では鑑別困難な症例に臨床応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Ten PHC and 8 DCC specimens were analyzed by LC-MS/MS. Selected proteins were evaluated, using immunohistochemical analysis, to determine whether they would be appropriate biomarkers. Finally, we generated biomarker panels to improve diagnostic accuracy. 1820 proteins were detected using LC-MS/MS. Fifteen differentially expressed proteins were selected as candidates based on semi-quantitative comparison. We first performed immunohistochemical staining on samples from the small cohort group using 15 candidates. KRT17, ANXA10, TMEM109, PTMS, and ATP1B1 showed favorable performances and were tested in the next large cohort group. KRT17 performed best for the diagnosis of PHC as a single marker; additionally, PTMS exhibited good performance for the diagnosis of DCCs. Moreover, we indicated the KRT17+/ANXA10+/PTMS- staining pattern as a biomarker panel for the correct diagnosis of PHC.

研究分野：消化器外科学

キーワード：膵頭部癌 タンパク質バイオマーカー 遠位胆管癌 免疫組織化学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

米国および本邦において、膵癌は全悪性腫瘍の中で4番目に死亡数が多く、その5年生存率は約7%と極めて予後不良な癌として知られている。一方、胆管癌は欧米諸国においては稀であるが、日本を含めた東南アジアでは現在もその死亡数は増加の一途を辿っている。日本での胆管癌患者の年間死亡数は6番目に多く、その5年生存率は約22%で膵癌に次いで2番目に不良である。このように生物学的悪性度が高い膵癌と胆管癌であるため、確定診断の基に適切な治療戦略を立てることが重要である。両疾患の切除術式と術前、術後化学療法は異なっており、特に切除不能症例に対する化学療法の現在の第一選択レジメンは全く異なっている。1990年代後半に登場したゲムシタピンは、肝胆膵領域の悪性腫瘍患者の予後向上をもたらした。ゲムシタピンが切除不能膵癌患者の第一選択療法となり、切除不能胆管癌患者においては化学療法の選択肢の一つとなったが、その治療成績は満足するものではなかった。しかし、近年様々な抗がん剤が開発され、それらを用いた新規レジメンにより生存期間の延長を認めている。切除不能膵癌に対してはFOLFIRINOX療法やゲムシタピン・ナブパクリタキセル療法が選択され、切除不能胆管癌に対してはゲムシタピン・シスプラチン療法が現在標準治療として用いられている。このように両疾患のレジメンは全く異なっており、切除不能膵癌と切除不能胆管癌患者の治療において、治療前に確定診断を得ることが重要である。

肝胆膵領域の悪性腫瘍の治療開始前に、内視鏡的なアプローチで組織生検を行い病理学的な確定診断を得ることが一般的であるが、解剖学的な理由から膵癌と胆管癌の鑑別が困難となる場合がある。胆管癌は、癌の発生部位に基づいて肝内胆管癌、肝門部領域胆管癌、遠位胆管癌および胆嚢癌に分類され、遠位胆管癌は胆嚢管と肝管の合流部から十二指腸乳頭部までの胆管上皮細胞から生じた腫瘍と定義される。胆管は膵頭部領域で膵管と合流し十二指腸乳頭部に開口するため、膵頭部領域で生じた膵癌と膵内胆管上皮から発生した胆管癌の画像診断における鑑別は困難である。さらに病理組織型の観点からも、膵癌と胆管癌の典型的な組織型は管状腺癌であることが多いため、ヘマトキシリン・エオジン染色では鑑別診断が得られない場合もある。

これまでに当研究室では質量分析計を用いたプロテオーム解析により膵癌と胆管癌のタンパク質プロファイルを明らかにし、膵癌の予後予測マーカーや胆管癌の診断マーカーを同定してきた。本研究では、これらの膵癌と胆管癌のタンパク質発現プロファイルを用いて、膵頭部癌と遠位胆管癌を可能とするバイオマーカーの同定を試みた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は質量分析計を用いた網羅的プロテオーム解析を起点として、膵頭部癌と遠位胆管癌を免疫組織化学的に鑑別し得る新規タンパク質バイオマーカーを同定することである。

### 3. 研究の方法

タンパク質解析ソフトウェア MASCOT (version 2.3.02, Matrix Science, UK) を用いて、該当症例の LC-MS/MS から得られたスペクトルを解析し膵頭部癌と遠位胆管癌の発現タンパク質プロファイルを明らかにした。その後、2群間の発現量を比較し統計学的に有意差があるタンパク質を絞り込んだ。続いて候補タンパク質を免疫組織学的に検証した。最初に膵頭部癌12例と遠位胆管癌12例で構成された小規模検証群(検証1)を対象として、LC-MS/MSの解析結果から抽出した候補タンパク質の免疫組織化学染色を行なった。後述する免疫組織化学染色の評価判定基準を基に、バイオマーカーとして有望なタンパク質を絞り込んだ。次に、膵頭部癌72

例と遠位胆管癌 74 例による大規模検証群（検証 2）を用いて免疫組織化学染色を行なった。最後に、術前の画像診断と術後の病理組織診断が異なる症例（術前に遠位胆管癌と診断されたが最終病理診断が膵頭部癌であった 5 例、術前に膵頭部癌と診断されたが病理診断が遠位胆管癌であった 2 例）を鑑別診断困難群（検証 3）と定義して、最終的に選ばれた候補タンパク質の組み合わせ（バイオマーカーパネル）を適用した場合に正診が得られるかを検証した。

#### 4．研究成果

まず膵頭部癌 10 例と遠位胆管癌 8 例のプロテオーム解析から 1,820 種類のタンパク質を同定し、続いて半定量比較解析法と G 検定を用いて、遠位胆管癌と比較して膵頭部癌で有意に発現を認める 5 種類のタンパク質、同様に膵頭部癌と比較して遠位胆管癌で有意に発現を認める 10 種類のタンパク質を絞り込んだ。これらのタンパク質を検証するため、まず膵頭部癌 12 症例と遠位胆管癌 12 症例の検体を対象として 15 種類のタンパク質の免疫組織化学染色を行い、バイオマーカーとして有望な 5 種類のタンパク質、KRT17、ANXA10、TMEM109、PTMS、ATP1B1 を同定した。次に膵頭部癌 72 症例と遠位胆管癌 74 症例を対象として、これら 5 種類のタンパク質の免疫組織化学染色を行い、両疾患に対する診断精度を統計学的に解析した。その結果、膵頭部癌診断に最も精度が高かったタンパク質は KRT17（感度 76.4%、特異度 71.6%）で、遠位胆管癌の診断に最も精度が高かったタンパク質は PTMS（感度 60.8%、特異度 72.2%）だった。さらに、それらの表現型を組み合わせたバイオマーカーパネルの診断精度を同様に解析した。膵頭癌の診断に最も有用なバイオマーカーパネルは、KRT17 陽性/ANXA10 陽性/TMEM109 陽性を示す表現型であり、遠位胆管癌の診断に最も有用なバイオマーカーパネルは KRT17 陰性/ANXA10 陰性/ PTMS 陽性を示す表現型であった。最後に、それらのバイオマーカーパネルを用いて、術前臨床診断と病理診断が異なった症例を免疫組織化学的に検討したところ、7 例中 6 例で正診が可能であった。本研究では、網羅的プロテオーム解析を起点として、膵頭部癌と遠位胆管癌を免疫組織化学的に鑑別し得る 5 種類の新規タンパク質バイオマーカーと 2 つのバイオマーカーパネルを同定した。

#### 5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Novel biomarkers distinguishing pancreatic head Cancer from distal cholangiocarcinoma based on proteomic analysis.

Takenami T, Maeda S, Karasawa H, Suzuki T, Furukawa T, Morikawa T, Takadate T, Hayashi H, Nakagawa K, Motoi F, Naitoh T, Unno M. BMC Cancer. 2019 Apr 5;19(1):318

〔学会発表〕(計 1 件)

竹浪 努, 前田晋平, 唐澤秀明, 鈴木 貴, 高館達之, 水間正道, 大塚英郎, 森川孝則, 林洋毅, 中川 圭, 元井冬彦, 内藤 剛, 亀井 尚, 石田孝宣, 海野倫明

膵頭部癌・遠位胆管癌の鑑別診断を可能とするタンパク質バイオマーカーの同定

第 118 回日本外科学会定期学術集会 2018

〔図書〕(計 0 件)

〔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

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。