

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08423

研究課題名(和文) プロテオーム解析に基づくエクソソームを用いたIPMN良悪性診断法の開発

研究課題名(英文) A novel diagnostic method for malignant IPMN based on the results of proteomics

研究代表者

堤 康一郎 (Tsutsumi, Koichiro)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：40610910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：分枝型IPMNの切除標本40例を用いたプロテオーム解析と免疫組織化学的検討により、Protein Aが悪性病変で高発現しており、悪性マーカーとなりうることが示唆された。また、術前膵液が得られた分枝型IPMN10例の膵液中Protein Aの定量化では、最終診断IPMAよりIPMCにて有意に高値であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、術前良悪性診断が困難な分枝型IPMNのプロテオーム解析により、悪性マーカーとなりうるProtein Aを同定した。さらに臨床応用を目指して、術前膵液中のProtein Aの定量化により、術前の悪性化予測が比較的高精度に可能なことが示唆された。以上から、術前膵液採取によるProtein A測定により、IPMNの良悪性鑑別診断能向上が得られることが明らかとなり、適切な手術のタイミングや不要な手術を回避するといった、適格な手術適応判断の一助として有望な診断法となりうる成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Proteomics revealed that the Protein A was the most frequently detected protein in high grade dysplasia (HGD), and was not detected in low grade dysplasia (LGD), using 9 FFPE tissues of resected branched-type IPMN. As the verification, the immunohistochemistry confirmed that the expression scores of Protein A were significantly higher in HGD lesions than in LGD lesions, in total 40 tissues. Furthermore, the expression levels in pancreatic juice (PJ) were higher in the lesions with IPMC than in them with IPMA. This is the first study to expect the Protein A may be a useful biomarker for distinguishing malignant IPMN with benign IPMN, using preoperative collected PJs.

研究分野：消化器内科

キーワード：IPMN プロテオミクス 膵液診断マーカー 良悪性診断

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、極めて予後不良な膵癌の前がん病変の一つとして、膵管内乳頭粘液性腫瘍 (intraductal papillary mucinous neoplasm: IPMN) が注目されており、非侵襲的画像診断モダリティの発達により、その発見数は増加している。IPMN は膵管上皮に発生する嚢胞性膵腫瘍で、IPMN/MCN 国際コンセンサスガイドライン (国際膵臓学会刊行) において、IPMN の悪性化、併存する通常型膵癌、の2つに留意した慎重な経過観察が推奨されている。また組織学的特徴として、良性である low-grade dysplasia から、悪性である浸潤癌までさまざまな異型度を示すこと、同一病変内にそれら良悪性病変が混在する場合があること、があげられる。しかし膵嚢胞内の生検は、胃や大腸における内視鏡的生検と異なり、技術的に極めて困難である。そのため、画像検査による壁在結節の有無や主膵管径などの形態学的評価を主体とした良悪性診断が標準的に行われているが、ガイドラインに基づき当院で切除を行った IPMN 約 70 例の悪性診断精度は 6 割程度であり、切除後に悪性ではなかった、またすでに予後不良な浸潤癌であったと判明することも少なくないのが現状である。

そこで、IPMN の良悪性診断をいかに高精度に行うか、が早急に解決の必要な重要課題である。我々は以前から IPMN 切除標本を用いたプロテオーム解析による良悪性鑑別に有用なマーカー探索を行っており、膵液中での発現評価による術前良悪性診断への臨床応用を目指して、本研究を行うこととした。

2. 研究の目的

分枝型 IPMN の FFPE 組織を用いたプロテオーム解析により、良悪性鑑別に有用なタンパク質を抽出し、さらに免疫組織染色 (IHC) での検証後、術前に回収した膵液中での発現を定量評価し、術前良悪性診断に有用なバイオマーカーとして臨床応用可能かを明らかにする。

3. 研究の方法

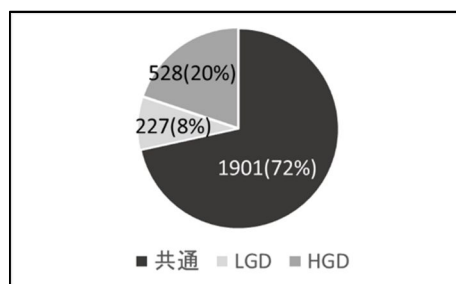
(1) 分枝型 IPMN の FFPE 組織を用いた網羅的プロテオーム解析による IPMN 良悪性診断に有用なマーカー候補の探索: IPMN 症例の FFPE 組織をレーザーマイクロダイセクションにて、良性 (= low-grade dysplasia [LGD]) と悪性 (= high-grade dysplasia [HGD]) に精密分類、回収し、ショットガン・プロテオミクスにより悪性マーカー候補を抽出した。

(2) 定量的質量分析と免疫組織化学染色による悪性 IPMN マーカー候補の検証と絞り込み: ショットガン・プロテオミクスの結果から得られた、悪性 IPMN マーカー候補に関して、ターゲット・プロテオミクスによる定量的評価、また免疫組織化学染色による発現評価を行い、マーカー候補を絞り込む。

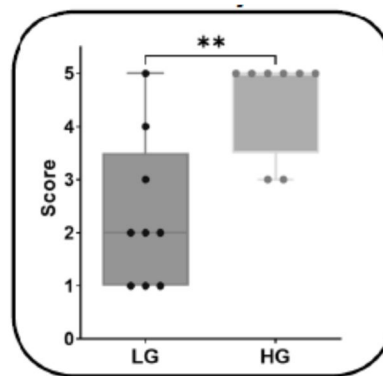
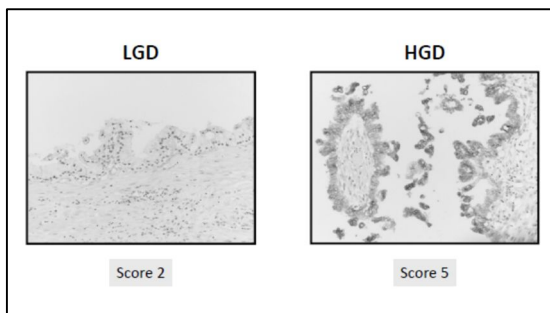
(3) 膵液や膵液中細胞外小胞 (EV) を用いた、悪性 IPMN マーカー候補の発現量評価による臨床応用への検討: 膵疾患精査目的に行った ERCP (内視鏡的逆行性膵胆管造影) にて回収した膵液を用いて、マーカー候補の発現量を ELISA にて評価し、術前膵液を用いた悪性 IPMN 診断への臨床応用の可能性を検討した。また、より高精度な診断法探索のため、膵液中 EV を用いた同様な評価を行うことを計画した。

4. 研究成果

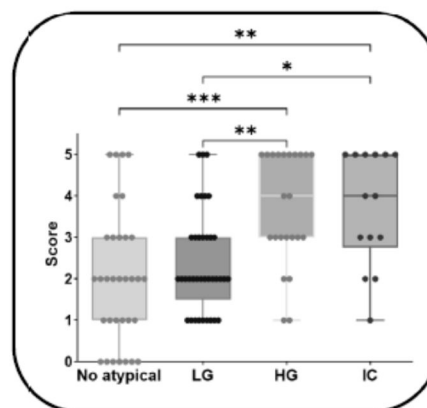
(1) IPMN 切除検体 9 例の FFPE をプロテオーム解析に使用した。HGD9 病変と LGD9 病変の計 18 病変をおのおの解析し、比較した。その結果、全体で HGD 特異的 528 種、LGD 特異的 227 種、共通 1901 種のタンパク質が同定された。最も高頻度に発現する HGD 特異的タンパク質として、細胞増殖、浸潤、生存に関わるシグナルに關与するとの報告がある Protein A が同定され、悪性 IPMN マーカー候補として抽出し、さらなる検討を行った。



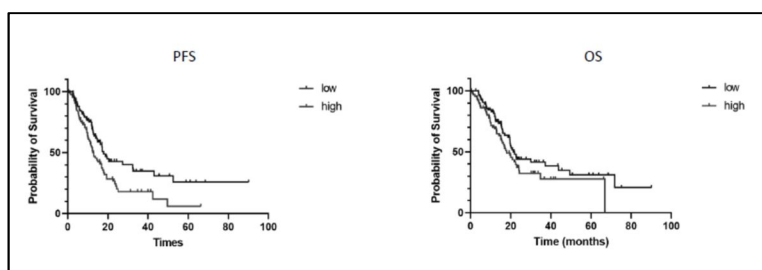
(2) 当初予定していたターゲット・プロテオミクスを施行するための試薬が入手困難となり、IHC での検証を行った。発現評価は、Protein A 発現率を 6 段階にスコア化 (0: 0%, 1: 1-5%, 2: 5-25%, 3: 26-50%, 4: 51-75%, 5: >76%) し、異型度別に行った。その結果、まず上記と同一 9 例での評価では、LGD (IQR: 1-3) HGD (3.5-5) と有意に HGD で高スコアであり (P<0.001) プロテオーム解析での結果と矛盾のないものであった。



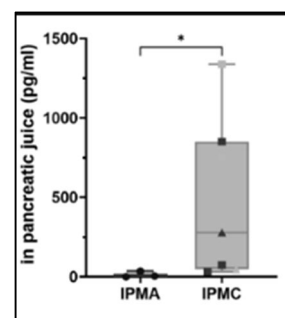
さらに 31 症例を追加した IHC での検証でも、非異型（正常）、LGD、HGD、浸潤癌（IC）の各異型度における Protein A 発現スコア値の中央値は、1(2-3)、2(1.5-3)、4(3-5)、4(3-5)であり、有意に悪性病変（HGD、浸潤癌）で高スコアであった。以上から、分枝型 IPMN の HGD、IC 部では、Protein A が高発現しており、悪性マーカーとなりうることが示唆された。



この Protein A は膜タンパク質であり、細胞増殖や浸潤、生存に関するシグナルに関与すると報告がある。また膵癌組織中の Protein A 高発現は予後不良との報告があり、TCGA のデータベースにおいても、高発現では PFS は有意に不良で、全生存期間は不良の傾向があった。



3)分枝型 IPMN 術前の膵液中の Protein A 値は、最終診断 IPMA (LGD)3 例において中央値 5(0-36)pg/ml、最終診断 IPMC(HG、浸潤癌)7 例において 279(33-1338)pg/ml であり、有意に IPMC で高値であった ($P < 0.05$)。少数例での検討であるが、膵液中の Protein A 量を術前に測定することにより、IPMN の良悪性鑑別診断に有用である可能性があり、適格な手術適応判断の一助として有望であることが示唆された。



なお、膵液中 EV の抽出の最適化に関する検討を行ったが (Tsutsumi et al. Dig Dis Sci; 2022) 本研究では、膵液中での Protein A 発現を十分に検出でき評価できたため、追加検討しなかった。一方、膵癌細胞株を使用した in vitro 実験にて、Protein A 高発現の細胞株から上清中に分泌された EV の解析では、細胞数依存的 (腫瘍量) に Protein A 発現が上昇すること、が確認できたため、膵液中での Protein A 検出は、腫瘍片や腫瘍から分泌された EV 由来の発現を反映していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Tsutsumi K, Ueta E, Kato H, Matsumoto K, Horiguchi S, Okada H. | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Optimization of Isolation Method for Extracellular Vesicles from Pancreatic Juice and Impact of Protease Activity. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Dig Dis Sci. | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10620-021-07339-x. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 堤康一郎、加藤博也、松下浩志、松本和幸、堀口繁、藤澤真義、田中顕之、植木亨、重西邦浩、服部晋也、貞森裕、八木孝仁、岡田裕之 |
| 2. 発表標題 IPMN切除組織のプロテオーム解析による悪性化マーカーの探索、検証と臨床応用の可能性 |
| 3. 学会等名 第52回日本膵臓学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 上田英次郎、堤康一郎、松本和幸、堀口繁、加藤博也、岡田裕之 |
| 2. 発表標題 膵液中エクソソーム（EV）解析のための最適な膵液採取法、EV回収法の検討 |
| 3. 学会等名 第52回日本膵臓学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|-------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 白羽 英則 (Shiraha Hidenori) (40379748) | 岡山大学・大学病院・講師 (15301) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 加藤 博也 (Kato Hironari) (60619039) | 岡山大学・大学病院・准教授 (15301) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |