

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21390372

研究課題名（和文） リン酸化蛋白をターゲットとした膵・胆道癌の早期診断および個別化治療への展開

研究課題名（英文） Increased circulating cell signaling phosphoproteins in sera are useful for early detection and the tailor-made therapy for pancreatic and biliary duct cancer patients.

研究代表者 宮崎 勝（MIYAZAKI MASARU）

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：70166156

研究成果の概要（和文）：膵・胆道癌の細胞内 signal 伝達経路の血清中リン酸化蛋白と癌切除標本での発現量を比較検討、診断マーカーおよび将来の分子標的治療を用いた個別化治療の臨床応用を目指した。膵癌患者と健常人の血清中リン酸化蛋白測定、階級別 cluster 解析によるリン酸化蛋白 profile、リン酸化蛋白の組織発現と血清中発現量の相関等を検討。ERK signal 経路の構成蛋白 p-MEK、p-ERK、p-P90RSK、p-CREB、さらに p-Akt と p-IKBa が膵癌患者で血清中存在量が有意に増加。血清に対応した切除標本での p-MEK、p-ERK 発現は血清値と有意な相関を認め、診断能では p-ERK の AUC は 0.94 であった。血清中 p-ERK の値は膵癌・膵炎・健常人の 3 群間で有意差を認め、膵癌と膵炎・健常人での AUC 値は CA19-9 より p-ERK の方がより優れており、新規血清膵癌バイオマーカーとして血清中リン酸化蛋白測定の有用性が示された。

研究成果の概要（英文）：Intracellular phosphoprotein activation significantly regulates cancer progression. We investigated the serum phosphoprotein profile involved in pancreatic cancer by a novel approach that comprehensively measured serum phosphoproteins levels, and clinically applied this method to the detection of pancreatic cancer. We analyzed the serum phosphoproteins that comprised cancer cellular signal pathways by comparing sera from pancreatic cancer patients and benign controls including healthy volunteers and pancreatitis patients. Hierarchical clustering analysis between pancreatic cancer patients and healthy volunteers revealed differential pathway-specific profiles. In particular, the components of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway were significantly increased in the sera from pancreatic cancer patients compared with healthy volunteers. The positive rate of p-ERK1/2 (82%) was found to be superior to that of CA19-9 (53%) for early stage pancreatic cancer. For the combination of these serum levels, the area under the receiver-operator-characteristics curves were showing significant ability to distinguish between the two populations in independent validation set, and between cancer and non-cancer populations in another validation set. The comprehensive measurement of serum cell signal phosphoproteins is useful for the detection of pancreatic cancer. Further investigations will lead to the implementation of tailor-made molecular-targeted therapeutics.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学 (7302)

キーワード：proteomics、膵癌、胆道癌、腫瘍マーカー、リン酸化蛋白、ERK

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌による死亡数は近年増加の一途を辿り、様々な悪性腫瘍の中でも最も予後不良の癌の1つである。その主な理由は画像診断能が向上した現在でも依然として早期発見が困難なことより手術切除率が低く、有効な補助療法が確立されていないためである。従って、膵癌を早期発見・診断し外科的切除および分子標的治療薬を含む化学療法等での集学的治療を早急に行うことは、治療成績の向上を図る上での最重要課題である。そこで本研究では、膵癌の増殖、進展等に深く関わる細胞内 signal 伝達経路のリン酸化蛋白に着目し、その血清中存在量を網羅的に測定・解析することで膵癌の新規血清診断マーカーを同定し、さらに患者個々のリン酸化蛋白存在量を予め把握することにより、そのリン酸化蛋白をターゲットとし特異的に抑制させる補助化学療法を行うことで治療効果を高める「個別化治療」を目指すことを目的とした。

現在、膵癌に対し最も汎用される既存の血清マーカーは CA19-9 であるが、その疾患に対する感度・特異度は未だ十分とは言えず、特に早期診断においてはほぼ検知不能である。近年、様々な手法により新規診断マーカー探索の試みが行われ (Koopmann J, Goggins M *et al.*, *Clin Cancer Res* 2006;12:442-6)、いくつかの膵癌に対する特異的蛋白が同定されてきたが再現性の確認されたものは僅かであり、トランスレーショナルリサーチとして実際に臨床応用されている蛋白がほとんどないのが現状である。

一方、癌細胞自身やその周囲の間質、さらにそれらに反応する宿主の免疫応答などにより生成される蛋白が、そのままの大きさ、あるいは蛋白分解酵素により細分化された fragment の form で、単体ないしはアルブミン等の輸送たんぱく質と結合し血液中に循環する微小蛋白として存在するという概念が提唱され (Liotta LA and Petricoin EF, Serum peptidome for cancer detection: spinning biologic trash into diagnostic gold. *J Clin Invest* 2006)、腫瘍マーカー探索の新たな局面の展開が期待されている。

膵癌治療薬では、ここ10年のめざましい化学療法の進歩により今まで薬剤抵抗性が非常に強かった膵癌に対し、現在の第1選択薬となった Gemcitabine が用いられて以来、生存率の有意な延長が認められてきている。今後の最大の注目は、さらなる治療成績向上を目指し、細胞の増殖・浸潤等に密接に関わ

りのある細胞内シグナル伝達経路のリン酸化蛋白および細胞膜に発現する受容体を効果的に抑制する分子標的薬の開発である。in vitro, in vivo の研究では関連のあるそれぞれのシグナル蛋白を抑制することにより膵癌細胞に対し細胞増殖を抑え、顕著な抗腫瘍効果を示した報告がいくつかなされてきた。

現在、分子標的治療薬単独 (Rinehart J *et al.*, Multicenter phase II study of the oral MEK inhibitor, CI-1040, in patients with advanced non-small-cell lung, breast, colon, and pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2004)、または Gemcitabine との combination chemotherapy (Moore MJ *et al.*, *J Clin Oncol* 2007) 等の臨床試験が全世界で盛んに行われている。

現在まで、我々は種々の Proteomics の手技を用い、膵癌に対する診断・予後および治療に関連する新規腫瘍関連因子の同定およびその機能解析を行い、国内外で報告し (Takano S, Miyazaki M *et al.*, Apolipoprotein C-1 maintains cell survival by preventing from apoptosis in pancreatic cancer cells. *Oncogene* 2008, Takano S, Miyazaki M *et al.*, Annexin II overexpression predicts rapid recurrence after surgery in pancreatic cancer patients undergoing gemcitabine-adjuvant chemotherapy. *Ann Surg Oncol* 2008 他)、それらの蛋白に対し新規膵癌マーカーとして特許出願および臨床応用を行ってきている。そこで、これまでの蛋白やペプチドの測定・解析技術の経験を生かし、Bio-Plex™ phosphoprotein suspension array system (Bio-rad 社) を用い血清中のリン酸化蛋白の存在量を網羅的に測定することで、新規血清膵癌マーカーの候補蛋白の同定を行い膵癌の早期血清診断マーカーとして臨床応用する。さらに、抑制すべきリン酸化蛋白の分子標的薬を選択することにより高い抗腫瘍効果を得た新しい膵癌の分子標的治療法および個別化治療を確立し、膵癌患者の予後改善に大きく寄与することを目標とした。

## 2. 研究の目的

本研究では、膵癌に対して標的となりうる血清中リン酸化蛋白を網羅的に解析し、その蛋白による早期血清診断マーカーとしての臨床応用への具現化とそのリン酸化蛋白抑制をターゲットとした分子標的治療薬を用いることで新しい個別化治療として応用することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究の方法は特異的リン酸化抗体を用いた血清中のリン酸化蛋白の存在量を網羅的に測定・解析することにより、癌特異的リン酸化蛋白を同定し、癌血清診断マーカー（特に早期診断に注目）として、さらに免疫染色等の検討結果も加味することにより、新しい分子標的治療薬の個別化治療の開発に応用することとした。

(1) まず、Training set として膵癌患者術前血清と健常人血清中のリン酸化蛋白存在量を Bio-Plex™ 200 system (Holland JD *et al.*, *Cancer Res* 2006; 66: 4117-24, Joslin E *et al.*, *J Cell Sci* 2007; 120: 3688-99) を用いて網羅的に測定・比較検討し、健常人血清より膵癌血清で有意に上昇しているリン酸化蛋白を候補蛋白として同定する。具体的にはまず、p-Akt, p-ERK1/2, p-MEK1, p-JNK, p-STAT2 等 18 種類の様々なシグナル伝達経路のリン酸化蛋白を標的蛋白とし、その測定結果を解析後それ以外のリン酸化蛋白も随時追加測定を行う予定である。Bio-Plex system の大きな利点は、一度の実験で同じサンプルから数十種類のリン酸化蛋白を同時に測定することが可能なことである。そもそもリン酸化蛋白は血中では mature type とした存在のみならず degradation を受けた fragment form として存在している可能性がある。そこで本当に血清中にリン酸化蛋白が存在しているかを確認するために、Crude な患者・健常人血清をカラム (Beckmann 社) に通すことで血清中蛋白の 99% に及ぶ 12 種類の major protein を取り除き、その抽出液の Western blot を行い、それぞれの血清中リン酸化蛋白発現量の有無を確認し、さらに Bio-Plex での測定値との同一性を確認する。

(2) 次に外科切除標本のパラフィン包埋切片を用い、候補蛋白として挙げられたリン酸化蛋白に対する特異的抗リン酸化蛋白抗体を用いて腫瘍組織の免疫染色を行う。なお、その際使用する抗体は Bio-Plex の測定で使用されたリン酸化 site に対する抗体と同じ部位 (epitope) に反応する抗体を用いる。それぞれのリン酸化蛋白の癌細胞や腫瘍周囲組織内の発現の頻度、染色性の強弱を評価し、Bio-Plex 測定による血清中の存在量と免疫染色における組織 (癌-間質を含む) 中での発現量との相関を検討する。これまでにリン酸化蛋白の免疫染色にて癌組織中の発現量と悪性度を検討した研究がいくつか報告されており (Yamamoto S *et al.*, Prognostic significance of activated Akt expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2004, Chadha KS *et al.*, Activated Akt and Erk expression and survival after surgery in pancreatic

carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2006)、本研究における詳細な解析によって、血清中と組織中のリン酸化蛋白の発現量を把握することで悪性度診断に応用できないかを検討した。最近、新規抗癌剤として脚光を浴びている分子標的治療薬の多くは、これらシグナル伝達経路中の活性型蛋白ないしは膜表面蛋白を抑制することにより抗腫瘍効果をあげている。

(3) 既に患者に同意のもと、採取し蓄積保存されている 150 例近い膵癌患者血清 (今後も継続的にサンプルを採取する) と、その患者群の数・年齢および性別を合わせた健常人サンプルを用いて症例数を増やした Validation study を行い、Training set で選ばれたいくつかの候補蛋白の測定結果に再現性が認められるかを確認する。その際に、活性化されたリン酸化蛋白のみならず、その不活性化型蛋白も同時に測定し、血清中の存在量でリン酸化される割合が健常人と比べ膵癌患者で高くなっていないかを確認、検討する。現在までに報告されている膵癌の新規マーカーの症例数としては最大級のものとなると思われる。これにより信頼性の高いデータを発信できることと期待される。

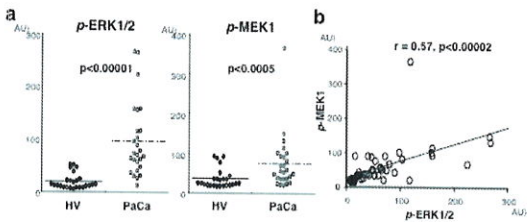
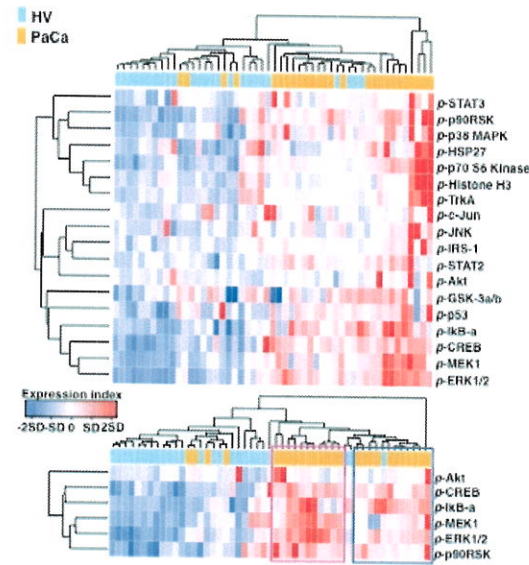
### 4. 研究成果

(1) リン酸化された細胞内シグナル蛋白 18 種類中、膵癌の重要な経路の 1 つである Ras/Raf/MEK/ERK signal 経路の構成蛋白である p-MEK, p-ERK, p-P90RSK, p-CREB、さらに p-Akt と p-IKBa の 6 種類のリン酸化蛋白において健常人血清と比較し膵癌血清で有意な発現量の増加が認められた。上記の 6 種類のリン酸化蛋白による cluster 解析にて得られた subclass 分類において術後患者の予後良好・不良群の 2 群に分けられることが判明した。さらに p-MEK とその下流 signal である p-ERK の発現量の有意な正の相関を認めた。これらの結果を踏まえ、今後、患者ごとの癌における血清中のリン酸化 signal の profile を決定する事により、予後予測因子として応用できる可能性が示唆された。

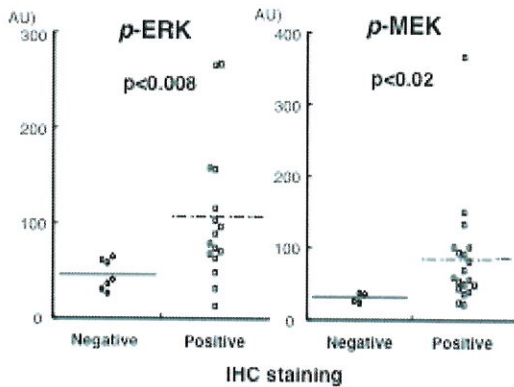
その中の一つである p-ERK1/2 について検討するため、実際に Bio-Plex で測定して高値を示した膵癌患者 3 名と低値であった健常人 3 名の血清サンプルを上記のように処理した後 Western blot にて比較したところ、p-ERK1/2 の血清中存在量の強弱が Bio-Plex の測定結果と一致し、健常人に比べ膵癌患者で p-ERK1/2 が強発現していることが判明し、Bio-Plex における血清中リン酸化蛋白存在量の測定系の正当性が示めされた。

さらに、血液採取時や血液の状態による影響も考慮し、血液中のビリルビン・溶血・乳糜の程度が Bio-Plex 測定系に関する影響について検討したところ、いずれの条件におい

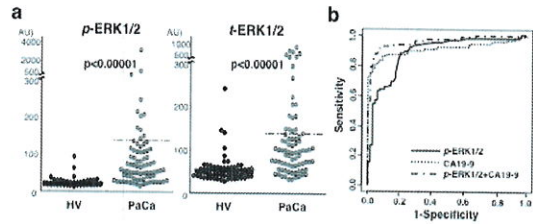
でも測定値には影響しないことを確認した。



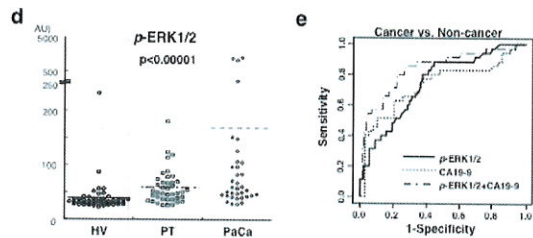
(2) Bio-Plex による測定の結果血清中の p-ERK1/2 存在量が高い浸潤性膵管癌患者の切除標本のパラフィン包埋切片の免疫染色を行ったところ、癌細胞に強い染色性が認められ(細胞質及び核内に発現を認める)、p-ERK1/2 の存在量が高い患者の癌組織では染色性が弱いという傾向が認められた。よって今回、Bio-Plex 測定値と免疫染色による検討の結果、発現の高かったリン酸化蛋白をそれらの分子標的治療薬を用い抑制することで、術後により効果的な補助化学療法を選択することが可能となると期待される。これらの研究結果を統合し、新たな膵癌に対する個別化治療の選択に応用できる可能性が示唆された。



(3) 上記の Training set で得られた結果をもとに、Validation set として健常人 (HV) 68 人と膵癌患者 80 人の血清 p-ERK1/2 と t-ERK1/2 の値を比較したところ、training set と同様に膵癌患者血清中で有意に上昇していることが確認できた。さらに、診断能について検討すると、CA19-9 単独と比べ CA19-9 と p-ERK1/2 のコンビネーションはより優れた診断能である事が示された (AUC; 0.96)。



続いて、健常人、膵炎、膵癌患者間の血清中 p-ERK1/2 の値を比較検討すると、血清中 p-ERK の値は膵癌・膵炎・健常人の 3 群間で有意な差が認められ (P<0.00001)、膵癌と膵炎・健常人 (非担癌) での AUC 値は CA19-9 (AUC:0.70) より p-ERK (AUC:0.75) の方がより優れており、コンビネーションでは AUC が 0.84 と良好な結果を得た。



新規血清膵癌バイオマーカーとして血清中リン酸化蛋白測定の有用性が示された。我々はこれらの内容について論文発表をおこなった。 (*Br J Cancer*. 2010 Jul 13;103(2):223-31.)

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 19 件)

1. Yoshidome H, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Takeuchi D, Takayashiki T, Suda K, Takano S, Miyazaki M.  
Usefulness of Preoperative Partial Splenic Embolization in Hepatocellular carcinoma and Hypersplenic Thrombocytopenia Hepato-Gastroenterology. 2011;58:2062-2066. 査読有.
2. Ohtsuka M, Kimura M, Shimizu H, Yoshidome H, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Takeuchi D, Takayashiki T, Suda K, Takino S, Kondo Y, Miyazaki M.  
Similarities and Differences Between Intraductal Papillary Tumors of the Bile Duct With and Without Macroscopically Visible Mucin Secretion.  
Am J Surg Pathol 2011;35(4)512-521. 査読有.
3. Yoshidome H, Takeuchi D, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Kato A, Furukawa K, Yoshitomi H, Miyazaki M.  
Treatment Strategy for Hepatocellular Carcinoma with Major Portal Vein or Inferior Vena Cava Invasion: A Single Institution. Experience.  
J Am Coll Surg 2011;212(5):796-803. 査読有.
4. Suzuki T, Yoshidome H, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Takeuchi D, Kato A, Furukawa K, Yoshitomi H, Iida A, Dochi T, Miyazaki M.  
Hepatocyte apoptosis is enhanced after ischemia/reperfusion in the steatotic liver.  
J. Clin. 2011;48(2):142-148. 査読有.
5. Miyazaki M, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Takeuchi D, Takayashiki T, Suda K, Takano S.  
One hundred seven consecutive surgical resections for hilar cholangiocarcinoma of Bismuth types II, III, IV between 2001 and 2008 J Hepatobiliary Pancreat. Sci2010;17:470-475. 査読有.

6. Iida A, Yoshidome H, Shida T, Takano S, Takeuchi D, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka, Miyazaki M.

Hepatocyte nuclear factor-kappa  $\beta$  (NF- $\kappa$ B) activation is protective but is decreased in the cholestatic liver with endotoxemia. Surgery2010;148(3):477-489. 査読有.

7. Okuno A, Kimura F, Nakagawa K, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Fukuda T, Miyazaki M.

Effects of Partial Hepatic Venous Congestion on Hepatic.  
Hepato-Gastroenterology 2010;57:127-133. 査読有.

8. Takano S, Sogawa K, Yoshitomi H, Shida T, Mogushi K, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Ishihara T, Tanaka H, Yokosuka O, Nomura F, Miyazaki M.

Increased circulating cell signalling phosphoproteins in sera are useful for the detection of pancreatic cancer.  
British Journal of Cancer  
2010;103:223-231. 査読有.

9. Suzuki D, Furukawa K, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Miyazaki M.

Effects of perioperative immunonutrition on cell-mediated immunity, T helper type 1(Th1)/Th2 differentiation, and Th17 response after pancreaticoduodenectomy.  
Surgery 2010;148(3):573-581. 査読有.

10. Okuno A, Kimura F, Nakamura K, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Fukuda T, Miyazaki M.

Effects of Partial Hepatic Venous Congestion on Hepatic Hemodynamics and Histology.  
hepato-Gastroenterology2010;57:127-133. 査読有.

11. Georgios C. Sotiropoulos, Miyazaki M, Manousos M. Konstadoulakis, Andreas Paul, Ernest P. Molmenti, Ilias P. Gomas, Arnold Raadtke, Hideo A. Baba, Susanne Beckebaum, Erini I. Brokalaki, Ohtsuka M, Myron E. Schwartz, Christoph E. Broelsh and George Sgourakis.

Multicentric evaluation of a clinical and prognostic scoring system predictive of survival after resection of intrahepatic cholangiocarcinomas.  
Liver International 2010;30:996-1002. 査読有.

12. Shida T, Kishimoto T, Furuya M, Nikaido T, Koda K, Takano S, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Tanizawa T, Nakatani Y, Miyazaki M.

Expression of an activated mammalian target of rapamycin (mTOR) in gastropancreatic neuroendocrine tumors.

Cancer Chemother Pharmacol

2010;65:889-893. 査読有.

13. Shimizu H, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Miyazaki M.

Aggressive Surgical Resection for Hilar Cholangiocarcinoma of the Left-side Predominance.

Ann Surg 2010;251:281-286. 査読有.

14. Shimizu H, Nukui Y, Mitsuhashi N, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Miyazaki M. Induction of Antitumor Response by In Vivo Allogeneic Major Histocompatibility

Complex Gene Transfer Using Electroporation.

J Surg Res 2009;154:60-67. 査読有.

15. Suda K, Ohtsuka M, Ambiru S, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Miyazaki M.

Risk Factors of liver dysfunction after extended hepatic resection in biliary tract malignancies.

J Am Coll Surg. 2009;197:752-758. 査読有.

16. Kusashio K, Shimizu H, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Fukada T, Miyazaki M.

Effect of Excessive Acute-phase Response on Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Rats.

Hepato-Gastroenterol 2009;56:824-828.

査読有.

17. Shimizu H, Kataoka M, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Miyazaki M.

Role of Kupffer Cells in Tolerance Induction after Portal Venous Administration of Alloantigen.

Hepato-Gastroenterol 2009;56:783-787.

査読有.

18. Koda K, Saito N, Ochiai T, Miyazaki M, Sarashina H, Nakajima N.

Randomized, Controlled Study of Continuous 5-FU Infusion Starting Immediately after Curative Surgery for Advanced Colorectal Cancer.

Hepato-Gastroenterol 2009;56:116-119.

査読有.

19. Yoshidome H, Fumio Kimura, Shimizu H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Mitsuhashi N, Takeuchi D, Iida A, Miyazaki M.

Interval Period Tumor Progression: Delayed Hepatectomy Detect Occult Metastases in Synchronous Colorectal Liver Metastases?

J Gastrointest Surg 2008;12:1391-1398.

査読有.

[その他]

ホームページ等

<http://www.ho.chiba-u.ac.jp/5/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮崎 勝 (MIYAZAKI MASARU)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：70166156

### (2) 研究分担者

木村 文夫 (KIMURA FUMIO)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：70334208

清水 宏明 (SHIMIZU HIROAKI)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：80272318

吉留 博之 (YOSHIDOME HIROYUKI)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：10312935

加藤 厚 (KATO ATUSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：70344984

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：