

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10179

研究課題名(和文) 膵・消化管神経内分泌腫瘍の転移機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism in liver metastasis of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors

研究代表者

水間 正道 (Mizuma, Masamichi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：80578675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は膵神経内分泌腫瘍(PanNEN)の新規肝転移関連タンパク質を発見することを目的とした。PanNENの切除標本をサンプルとして、膵原発腫瘍と肝転移巣のタンパク質発現を同一症例間で網羅的に比較解析し、肝転移巣で発現が相対的に高いANXA6、CNPY2、RAB11B、TUBB3を転移関連タンパク質の候補タンパク質として選択した。PanNEN切除例70例の膵原発腫瘍において、これら4種類の候補タンパク質の発現を免疫組織化学で評価し、その発現と臨床病理学的因子との関連性を統計学的に解析したところ、CNPY2がPanNENの新規肝転移関連タンパク質であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to identify novel liver metastasis-correlated proteins of pancreatic neuroendocrine neoplasm (PanNEN). Proteomic analysis was performed in resected specimens of pancreatic tumor and paired liver metastasis. ANXA6, CNPY2, RAB11B, and TUBB3, which showed higher expression in liver metastasis than in pancreatic tumor, were selected as candidate proteins. Expression of these candidate proteins was examined in pancreatic tumors of 70 patients with PanNEN by immunohistochemistry. Correlation between clinicopathological factors and expression of the candidate proteins was statistically analyzed. It was revealed that CNPY2 is a novel liver metastasis correlated protein of PanNEN.

研究分野：消化器外科学

キーワード：神経内分泌腫瘍 肝転移 CNPY2

## 1. 研究開始当初の背景

神経内分泌腫瘍(neuroendocrine tumor: NET)は、比較的まれな腫瘍であるが、年々世界的に発症数が急速に増加してきている新生物である。2010年に提唱されたWHO分類により膵・消化管NET(gastroenteropancreatic NET:以下GEP-NETと略記)は、Ki67 indexあるいは細胞分裂数から、NET G1、G2、G3(neuroendocrine carcinoma: NEC)の3段階に悪性度分類されることとなった。しかし、GEP-NETではたとえ高分化であってもリンパ節転移や肝転移などの遠隔転移を伴う症例が存在し、現状ではGEP-NETの分子生物学的転帰機序や転移に関連するバイオマーカーはほとんど不明である。予後因子を検討した報告でも、トランスクリプトミクスによるmRNAレベルの網羅的解析や組織マイクロアレイ、免疫組織化学による手法を用いて切除標本の原発巣のみを対象とした研究がほとんどであり、最近注目されているプロテオミクスによる網羅的蛋白質発現解析や、原発巣と転移巣の蛋白質発現を同一症例間で比較解析した報告はこれまでのところみられない。以上から、GEP-NETの同一症例間の原発巣と転移巣の蛋白質発現をプロテオミクスにより網羅的に比較解析することは、GEP-NETの転移関連因子を効率よく同定することができると考えられる。

## 2. 研究の目的

膵神経内分泌腫瘍(WHO分類2017でpancreatic neuroendocrine neoplasmに呼称変更:以下PanNENと略記)の転移機構を解明することを目的とする。

PanNENの同一症例における原発巣と肝転移巣の蛋白質発現をプロテオミクスにより網羅的に比較解析し、原発巣と肝転移巣で発現量に差を認める蛋白質から、PanNENの転移関連因子を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) Discovery Stage

プロテオミクス解析における対象患者の選択

1994年から2016年までに東北大学病院で切除術を施行したPanNEN患者118例のうち、同時性または異時性肝転移が認められた20例から、膵原発腫瘍と転移性肝腫瘍のformalin-fixed paraffin-embedded (FFPE)サンプルが両方利用可能な7例をプロテオミクス解析の対象とした。膵原発腫瘍と肝転移巣における発現タンパク質をプロテオミクス解析で比較した。プロテオミクス対象症例におけるWHO分類2017の組織学的なGradeはNET G1が1例、NETG2が3例、NETG3が3例であり、NECG3の症例はなかった。

Laser capture microdissection (LMD)とタンパク質の抽出

LMDとタンパク質の抽出は以下に記す工程で行った。

まず、FFPEサンプルを10 $\mu$ mの厚さで薄切し、DIRECTORTM slidesに接着させる。キシレンで脱パラフィン処理を行った後に、エタノールで脱水処理を行い、ヘマトキシリン単染色を行った後に風乾させる。Leica LMD7000にて約30,000細胞(約8mm<sup>2</sup>)の腫瘍細胞を選択的に切除する。0.2ml polymerase chain reaction (PCR) tubeのキャップに回収する。採取したサンプルのタンパク質抽出は、Liquid Tissue<sup>TM</sup> MS Protein Kitを用いて行った。

### Nano HPLC-MS/MS 解析

風乾したタンパク質抽出物に5% acetonitrile、0.1% trifluoroacetic acid (TFA)、超純水を混注し溶解させた(20 $\mu$ l)。そのうち10 $\mu$ lをEASY-Spray column (25 cm length x C18 ODS 75  $\mu$ m)に連結してあるEasyn LC-1000 systemに注入した。逆相クロマトカラムにて流速300-400 nl/minの0.1%ギ酸溶液の中を0.1%ギ酸を含むアセトニトリル溶液である溶媒の濃度勾配(4-25%)によって180分ほどでサンプル中のペプチドを分離した。分離したペプチドは、ナノスプレーを用いたエレクトロスプレーイオン化法によりイオン化され、トリブリット型質量分析装置(Fusion mass spectrometer)に注入された。高分解フルスキャンMSスペクトル(400-2000 m/z)は高分解能モード(オービトラップによる400 m/zの検出能を120,000に設定)にて検出され、lock mass機能は445.12003 m/zと391.28429 m/zで行った。次いで、35%の衝突誘起解離エネルギーによりリニアイオントラップ内で3秒間の最大強度のイオンのフラグメンテーションを行い、MS/MSスペクトルを検出した。データ依存性スキャンに対する除外時間は0秒で、アイソレーションウィンドウを10.0 m/zにセットした。MS/MSのデータは、MascotとSequestの2種類のタンパク質同定の解析アルゴリズムを介して、タンパク質データベース(Uniprot, <http://www.uniprot.org>)に照合することにより、各サンプルに含まれたタンパク質を決定した。タンパク質配列データベース検索の特別なパラメーターは、動的修飾として、メチオニンの酸化、グルタミンやアスパラギンの脱アミノ化、アミノ末端のアセチル化、グルタミン酸のポリリ化を含めた。また、静的修飾として、システインのカルバミドメチル化を含めた。データ解析に用いた他のパラメーターは、2個までのミスクリベージは許容した。プリカーサーイオンのマスマエラーは10 ppm、フラグメントイオンのマスマエラーは0.8 Daとした。2価から4価のイオン価数は親イオンと判断した。一つのペプチドに一つ以上のスペクトラムを認めた場合は、最も高いMascotスコアを呈したスペクトラムをマニュアルでひとつ選択した。Mascot>20、Sequest>0.8

のペプチドスコアで同定されたすべてのペプチドは既報に従って検討した(Chen Y, et al. J Proteome Res. 2005; 4:998-1005.)。

スペクトラルカウント法による半定量解析

ショットガン解析から得られたサンプル間における全タンパク質の発現をスペクトラルカウント法で半定量解析し比較した。タンパク質の相対変化量の群間比較は、protein ratio from spectral counting (Rsc) により評価した。同定したタンパク質の個々のサンプルにおける相対発現量の測定は、the normalized spectral abundance factor (NSAF) で評価した。候補タンパク質を絞り込むために、膵原発腫瘍と肝転移巣の発現タンパク質の比較を、spectral index (Spl) を用いて検討した。群間比較の統計学的検定は、スペクトラルカウント法の統計解析方法である G-test にて行った。候補タンパク質は、 $G < 0.05$ ,  $Rsc < -1$  あるいは  $1 < Rsc$  のものを選択し、Spl と NSAF で絞り込んだ。

免疫組織化学 (Immunohistochemistry: IHC)

厚さ  $4\mu\text{m}$  の FFPE 薄切スライドを作成した後、キシレンで脱パラフィンを行った。エタノール脱水し、クエン酸バッファー (10mM citric acid, pH 6.0) の入った容器に移動させ、121 5 分間のオートクレーブ処理、もしくは 15 分間マイクロウェーブ処理を抗原賦活処理として行った。一次抗体反応は 4 で over night で行った。0.3%過酸化水素含有メタノールで内因性ペルオキシダーゼブロッキングを行い、EnVision+ Sytem-HRP を用いて二次抗体反応を行った。色素原としては、3,3'-Diaminobenzidine, tetrahydrochloride (DAB) を用いて発色した。ヘマトキシリンにて核を対比染色した。領域として腫瘍細胞の 10%以上染色されたものを陽性群、10%未満を陰性群とした。Discovery stage においては、同一症例間における膵原発腫瘍と肝転移巣を IHC の対象とした。次項に記載した Clinicopathological analysis stage では PanNEN の膵原発腫瘍を IHC の対象とし、抽出した候補タンパク質の発現を IHC で検討した。

(2) Clinicopathological Analysis Stage  
候補タンパク質の発現と臨床病理学的因子との関係

PanNEN で切除された 118 例のうち FFPE 組織サンプルが利用可能であった 70 例を対象とした。膵原発腫瘍における候補タンパク質の発現を IHC で評価し、各臨床病理学的因子と候補タンパク質の発現との関係を検討した。ステージ分類は European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) に基づいて検討した。原発腫瘍切除後から原病死あるいは最終外来診察日までを追跡期間とした。肝転移無再発生存期間 (liver recurrence free

survival: liver RFS) は原発巣切除後から初回肝転移再発を認めずに生存した期間とした。全生存期間 (overall survival: OS) や liver RFS は同時性肝転移を認めた症例は除外して検討した。各臨床病理学的因子や候補タンパク質の発現において Cox 比例ハザードモデルによる単・多変量解析を行い、肝転移関連因子を検討した。

統計解析

統計解析は、JMP software version 13.0 を使用した。名義変数は Fisher の正確検定、Pearson の  $\chi^2$  検定で有意差を検定した。2 群間の連続変数は Mann-Whitney U 検定、3 群間の連続変数は Kruskal-Wallis 検定で有意差を検定した。OS と liver RFS は、Kaplan-Meier 法で算出し、log-rank test で有意差を検定した。Liver RFS のリスク因子は、Cox 比例ハザードモデルを用いた単・多変量解析で検討した。 $P < 0.05$  を統計学的に有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(1) Discovery stage

ショットガン解析でのタンパク質同定とスペクトラルカウント法を用いた半定量解析

ショットガン解析により、膵原発腫瘍で 2,622 種類、肝転移巣で 2,993 種類、合計 3,722 種類のタンパク質を同定した。729 種類 (19.6%) は膵原発腫瘍で特異的なタンパク質、1,100 種類 (29.6%) は肝転移巣で特異的なタンパク質、1,893 種類 (50.8%) は両者共通で発現するタンパク質であった。そこから、スペクトラルカウント法による半定量的解析により、膵原発腫瘍で高発現しているタンパク質 33 種類、肝転移巣で高発現しているタンパク質 76 種類を選択し、それらのタンパク質を、既報や Gene Oncology Annotation、KEGG pathway analysis などの Bioinformatics を利用し、悪性新生物に関連する可能性のあるものとして、膵原発腫瘍で高発現を認めた 3 種類 (Ras-related protein Rab-11A : RAB11A、tropomyosin alpha-1 chain : TPM1、Vesicle-associated membrane protein 3 : VAMP3) と肝転移巣で高発現を認めた 7 種類 (Annexin A6 : ANXA6、canopy FGF signaling regulator 2 : CNPY2、Histone H3.1 : HIST1H3A、microtubule-associated protein RP/EB family member 1 : MAPRE1、Ras-related protein Rab-11B : RAB11B、signal peptidase complex catalytic subunit : SEC11A、tubulin beta-3 chain : TUBB3) に候補タンパク質を絞り込んだ。

タンパク質発現の検証：免疫組織化学

プロテオミクス解析の結果を検証するために、プロテオミクスの対象となったサンプルにおける上記 10 種類の候補タンパク質の発現を IHC で検討した。TPM1 のみ染色が得ら

れなかった。他の9種では腫瘍細胞に染色性を認めた。膵原発腫瘍と肝転移巣における腫瘍細胞の染色性と背景の正常組織との染色性について検討したところ、ANXA6、CNPY2、RAB11B、TUBB3の4種のタンパク質がプロテオミクス解析と類似の結果を示していた。これらのタンパク質はすべて膵原発腫瘍に比べて肝転移巣で高発現を認めたタンパク質であった。これら4タンパク質を候補タンパク質として抽出し、次のClinicopathological analysis stageで、臨床病理学的因子とその候補タンパク質の発現との関係性を検討した。

## (2) Clinicopathological analysis stage 患者背景因子

1994年から2016年までに当施設で膵切除術を施行したPanNEN 118例のうち、FFPEサンプルが利用可能であった70例を対象とした。対象患者には多発性内分泌腫瘍症1型(MEN1)の患者が1名含まれていた。膵切除時に同時性肝転移を認めた症例が8例(11.4%)、膵切除後に異時性肝転移を認めた症例が12例であった(17.1%)。肝転移を認めなかった症例は50例(71.4%)であった。同時性肝転移、異時性肝転移、肝転移なしの3群間で比較すると、WHO 2017 grade ( $p=0.002$ )、Ki-67 labeling index ( $p=0.003$ )、mitotic count ( $p=0.017$ )、腫瘍径 ( $p=0.001$ )、血管浸潤 ( $p<0.001$ )、リンパ管浸潤 ( $p=0.002$ )、ENETS Stage ( $p<0.001$ )において有意差が認められた。

IHCによる候補タンパク質の発現と臨床病理学的因子との関係

候補タンパク質の発現をIHCで検討すると、CNPY2の陽性率は、同時性肝転移群が87.5%、異時性肝転移群が83.3%、肝転移なしが38.0%であり、肝転移を認めた群で有意に高率であった( $p=0.001$ )。WHO2017 gradeにおいては、CNPY2 (NET G1:45.2%、NET G2:48.5%、NET G3:100.0%、 $p=0.044$ )とRAB11B (NET G1:35.5%、NET G2:45.5%、NET G3:100.0%、 $p=0.010$ )がWHO2017 gradeと相関していた。RAB11B陽性群はKi-67 labeling indexが陰性群に比べて有意に高値であった( $p=0.005$ )。すべての候補タンパク質において腫瘍径との関連性を認めなかった。

## Liver RFSに関する単・多変量解析

膵切除時に同時性肝転移を認めた8例を除き、膵切除後のOSとLiver RFSを解析した。4種の候補タンパク質において陽性群と陰性群の2群に分けてOSとLiver RFSについてそれぞれ比較検討した。OSに関しては、すべての候補タンパク質で陽性群と陰性群で有意差を認めなかった。Liver RFSにおいては、CNPY2陽性群は陰性群に比べて、肝転移無再発生存期間が有意に不良であった(術後10年肝転移無再発率; 陽性群 39.8%、

陰性群 92.3%、 $p=0.012$ )。ANXA6においては、陽性群は陰性群に比べて肝転移無再発生存期間が不良な傾向にあった(術後10年肝転移無再発率; 陽性群 51.4%、陰性群 95.0%、 $p=0.099$ )。RAB11BとTUBB3では、その発現とLiver RFSにおいて明らかな相関を認めなかった。

Liver RFSのリスク因子をCox比例ハザードモデルで検討した。Liver RFSに対するKi-67 labeling indexと腫瘍径のカットオフ値をreceiver operating characteristic (ROC)曲線を用いて求め、それぞれ8.2% (area under the curve (AUC)=0.7075、 $p=0.005$ )、42mm (AUC=0.6708、 $p=0.010$ )と算出された。単変量解析では、Ki-67>8.2% ( $p=0.009$ )、腫瘍径>42mm ( $p=0.007$ )、血管浸潤陽性 ( $p=0.009$ )、リンパ管浸潤陽性 ( $p=0.012$ )、CNPY2陽性 ( $p=0.010$ )が有意であった。ANXA6は肝転移のリスク因子となる傾向を認めた( $p=0.056$ )。多変量解析では、CNPY2陽性 (ハザード比(HR): 5.16、95%信頼区間(95%CI); 1.33-33.92、 $p=0.016$ )、腫瘍径>42mm (HR: 4.38、95%CI: 1.26-14.22、 $p=0.022$ )、リンパ管浸潤 (HR: 3.25、95%CI: 1.01-11.29、 $p=0.048$ )が独立した肝転移リスク因子であった。

## (3) 考察

NETの肝転移は原発の臓器にかかわらず予後不良因子であり、小腸、膵臓、大腸から原発するNETでは、40-45%で初診時に肝転移を認めるとの報告もある。PanNENの肝転移症例における予後向上には、薬物治療の発展が必要であるが、現状では肝転移のメカニズムはほとんど不明であり、新規薬剤の開発に応用できる肝転移関連因子の発見や肝転移の分子生物学的機序の解明が重要である。本研究では、同一症例間で膵原発腫瘍と肝転移巣の発現タンパクをプロテオミクス解析で網羅的に比較検討することで、新規肝転移関連因子としてCNPY2を同定することができた。また、ANXA6の肝転移への関連性を示唆する結果も示された。同一症例間の原発巣と転移巣のタンパク質発現をプロテオミクスで解析した研究は本研究と大腸癌における研究のみであるが、本研究でPanNENの新規肝転移関連因子の同定に成功したことから、このプロテオミクスの手法は新規肝転移関連因子の発見に有用であると考えられる。

組織学的Grade、Ki-67 labeling index、腫瘍径、血管浸潤、リンパ管浸潤は再発や予後に関連すると報告されている。本研究では、CNPY2陽性、腫瘍径、リンパ管浸潤が肝転移再発と関連していた。CNPY2の発現はOSとの相関を認めなかったが、サンプルサイズが小さいことが影響していると考えられる。また、ANXA6はLiver RFSや単変量解析の結果から肝転移に関係している可能性が示唆されるが、さらに症例が集積され大きなサンプルサイズで検討すればANXA6の肝転移への関与が

明らかになると考えられる。

CNPY2 は、以前には MIR-interacting saposin-like protein (MSAP) や putative secreted protein Zsig9 (ZSIG9)、あるいは transmembrane protein 4 (TMEM4) とも呼称されていた。CNPY2 の機能に言及した論文は非常に少なく、その機能についてはほとんど不明であるが、CNPY2 は分泌タンパク質であり、p53 の制御を介して平滑筋細胞の移動、増殖、組織中の血管新生などを促進する働きがあるとの報告がなされている。悪性新生物に関連したものは、食道扁平上皮癌や大腸癌、腎癌で CNPY2 が関与しているとする報告がある。NET を含めそれ以外の悪性新生物に関する報告はみられていない。食道扁平上皮癌では、CNPY2 を高発現している症例は低発現の症例と比較して予後が不良の傾向にあったと報告されている。大腸癌や腎臓癌においては、CNPY2 は p53 を介した腫瘍増殖を促進するとの報告がなされている。大腸癌細胞株 HCT116 を用いた基礎研究で CNPY2 は p53 経路を抑制的に制御し、細胞増殖、移動能、血管新生を促進させ、アポトーシスを抑制すると報告されている。PanNEN における CNPY2 の機能は全く分かっておらず、その機能解析は今後の検討課題である。CNPY2 は分泌タンパク質であり、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によりマウスの血漿で同定可能であったとの報告もみられることから、CNPY2 は PanNEN の肝転移における新規血中バイオマーカーとなる可能性もある。

ANXA6 は細胞膜や細胞骨格の構成、膜輸送、細胞接着などに関与している カルシウム依存性膜/リン脂質結合タンパク質である。ANXA6 は、悪性黒色腫、乳癌、胃癌において腫瘍抑制因子としての役割を担っている一方、子宮頸癌、膵癌では腫瘍増殖因子として機能しているとされる。しかし、これまでのところ、ANXA6 の NET における発現を検討した報告はみられず、本研究が最初の報告である。本研究により、ANXA6 の高発現は PanNEN の肝転移再発に関連する可能性が示唆される。

本研究では RAB11B と肝転移との関連は認められなかったが、RAB11B は WHO 2017 grade と関連していた。Rab は Ras スーパーファミリーに属する低分子量 GTP 結合タンパク質であり、小胞輸送を制御する分子スイッチとして機能している。RAB11B は Ras-related protein Rab-11A (RAB11A) と Rab25 とともに Rab11 サブファミリーに属する。Rab25 は乳癌、大腸癌、食道癌、卵巣癌との関連が報告されているが、RAB11A や Rab11B においては、NET を含め悪性疾患との関連は報告されておらず、PanNEN における RAB11B の発現を報告したものは本研究が初となる。

#### (4) 結論

PanNEN において同一症例間の膵原発腫瘍と肝転移巢のタンパク質発現をプロテオミ

クスで網羅的に比較解析することにより、PanNEN 新規肝転移関連因子として CNPY2 を発見した。

#### 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1件)

Shimura M, Mizuma M, Takadate T, et al. A novel liver metastasis-correlated protein of pancreatic neuroendocrine neoplasm (PanNEN) discovered by proteomic analysis Oncotarget, in press 査読有

〔学会発表〕(計1件)

志村充広、水間正道、加藤恭丈、ほか  
プロテオミクス解析により発見した膵神経内分泌腫瘍の新規肝転移関連因子  
第49回日本膵臓学会大会 平成30年6月29日 和歌山

〔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〕特記事項なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

水間 正道 (MIZUMA, Masamichi)  
東北大学・大学病院・助教  
研究者番号: 80578675

##### (2) 研究分担者

藪内 伸一 (YABUUCHI, Shinichi)  
東北大学・大学病院・助教  
研究者番号: 50700184

##### (3) 連携研究者

立川 正憲 (TACHIKAWA, Masanori)  
東北大学・薬学研究科(研究院)・准教授  
研究者番号: 00401810

##### (4) 研究協力者

高舘 達之 (TAKADATE, Tatsuyuki)  
伊関 雅裕 (ISEKI, Masahiro)  
畠 達夫 (HATA, Tatsuo)  
青木 修一 (AOKI, Shuichi)  
志村 充広 (SHIMURA, Mitsuhiro)  
加藤 恭丈 (KATOH, Yasutake)、  
鈴木 貴 (SUZUKI, Takashi)、