

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19914

研究課題名(和文) FFPE組織の膵癌間質プロテオミクスによる新規転移因子の探索

研究課題名(英文) Novel metastatic factors identified by proteomics using formalin fixed paraffin embedded tissue of pancreatic adenocarcinoma stroma

研究代表者

高館 達之 (Takadate, Tatsuyuki)

東北大学・高度教養教育・学生支援機構・助教

研究者番号：50772216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：過去10年間に当科で切除した通常型膵癌症例から、リンパ節転移陽性例5例、陰性例5例を抽出した。FFPE組織からLMDを用いて間質のみを採取し、LC-MS/MS測定を行った。計490種類のタンパク質が同定され、2群間で発現に差を認めた14種類のタンパク質を選定した。免疫組織化学の染色性からHPX、FTL、FLNAの3種類のタンパク質に注目し、Large cohortとして165症例で免疫組織化学を行い、HPXがリンパ節転移、血管浸潤に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic ductal adenocarcinoma with lymph node metastasis (n=5) and without lymph node metastasis (n=5), resected in Tohoku University from 2005 to 2015, were analyzed. Stroma collected from FFPE tissue sections by laser microdissection were processed for LC-MS/MS. Fourteen candidate proteins were identified by semiquantitative comparison. To confirm the associations between candidate proteins and clinicopathological features, we immunohistochemically analyzed a cohort of 165 cases. It was suggested that HPX was associated with lymph node metastasis and vessel invasion.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵癌 プロテオミクス 間質 転移 質量分析

1. 研究開始当初の背景

**膵癌のホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織を用いたプロテオミクス**

膵癌は診断、治療ともに困難で、5年生存率が5%以下と非常に予後不良な癌である。長期生存を得る唯一の治療法は根治的外科切除だが、多くは切除不能な状態で発見され、手術可能症例は40%程度しかいない。さらに根治切除後の再発率も高く、国内有数の膵癌手術症例を有している当科においても、術後5年生存率は20%と非常に予後不良である。**膵癌の予後を改善するためには、早期診断のみならず、画期的な治療法の開発が急務である。**

近年の急速な質量分析装置(MS)の技術革新を基盤として、プロテオミクスは癌のバイオマーカー探索の分野で主要なツールとなった。FFPE組織は大量に保管されており、臨床情報が付加していることから**バイオマーカー探索には非常に優位性の高い臨床材料**である。近年FFPE組織からの質量分析を基盤としたタンパク質解析法が開発され、大規模なアーカイブ症例でのプロテオミクスが可能となった。

**膵癌の間質増生**

他の癌と比較して、膵癌は特に豊富な細胞外基質を伴う過剰な間質増生が病理学的な特徴である。近年、腫瘍細胞のみならず間質線維芽細胞や血管内皮細胞、炎症細胞などの様々な細胞間の相互作用や、細胞外基質-細胞間相互作用が浸潤、転移に関与していることが報告されている。膵癌細胞のみならず、間質におけるタンパク質発現を明らかにし、間質増生を制御することが、膵癌の治療成績向上に寄与する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

FFPE組織を用いたプロテオミクスの手法をにより、膵癌間質に発現しているタンパク質を網羅的に解析し、膵癌の新たな転移関連タンパク質を同定し、新規分子標的治療へと展開することで、膵癌の治療成績向上を実現することである。

3. 研究の方法

**Workflow**: 最初に discovery set を用いた Shotgun proteomics でタンパク質プロファイルを網羅的に検索し、この結果から半定量比較を行いリンパ節転移の有無により発現に差のある候補タンパク質を抽出する。次いでその候補タンパク質をターゲットとして全例の validation set を用いて免疫組織化学で検証を行う

**i) Shotgun proteomics**

過去10年間に当科で手術を施行し、組織学的に通常型膵癌と診断された症例の中から、リンパ節転移のあった症例5例、リンパ節転移のなかった症例5例を抽出する。レーザーマイクロダイセクションを用いて、膵癌細胞を含まない間質部分のみを採取する。採取した細胞は、プロテオーム解析前処理キッ

ト(Liquid Tissue™ MS Protein Prep Kit)を用いて、ホルマリンによるクロスリンクの解除と、トリプシンによるペプチド化を行い、LC-MS/MSで分析する。MSデータを蛋白質同定ソフトウェアである MASCOT search engine を用いて、アミノ酸配列データベース Swiss Prot から検索し、サンプルのタンパク質プロファイルを同定する。

**ii) 半定量比較**

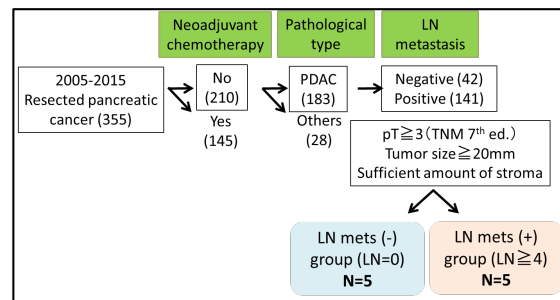
候補タンパク質の選択にはソフトウェア MaxQuant と、スペクトラルカウント法による半定量比較を行う。リンパ節転移を伴う膵癌間質と、リンパ節転移のない膵癌間質で発現に差のあるタンパク質を選択する。

**iii) 免疫組織化学**

判定量比較で選ばれた各タンパク質について、それぞれ全症例での免疫組織化学を行い、膵癌間質でのタンパク質の局在を確認し、また臨床データからタンパク質の発現と、転移の有無や予後との相関を確認する。リンパ節転移のある膵癌間質に高発現するタンパク質、もしくはリンパ節転移のある膵癌間質で発現が低下するタンパク質を同定する。

4. 研究成果

過去10年間に当科で切除した膵癌全355例のうち、術前化学療法および放射線療法を施行されず、組織学的に通常型膵癌(PDAC)であった症例は183症例(リンパ節転移陰性42例、リンパ節転移陽性141例)であった。早期症例ではなく浸潤傾向を示すもの(T因子3以上、腫瘍径20mm以上)かつ間質部分が十分に採取できる標本に限定し、転移陽性群(LN(+))群としてリンパ節転移数を多数認めたと症例5例、リンパ節転移陰性群(LN(-))群としてリンパ節転移を認めなかった症例5例を抽出した。



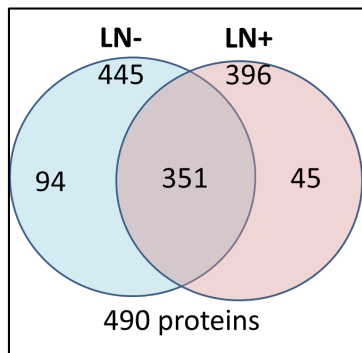
	LN-	LN+	p
Sex (Male : Female)	3 : 2	4 : 1	
Age (median ± SD)	61 ± 8.4	60 ± 8.2	0.79
Tumor site	Ph	3	3
	Pb	2	2
Tumor size (median)	25mm	37mm	0.089
pStage (TNM)	IIA	5	0
	IIB	0	2
	III	0	0
	IV	0	3
Histological grade	G1	1	0
	G2	4	5
Number of LN mets (average)	0	9.2	
OS months (median)	62	12	0.013
Status	Alive	5	0
	Dead	0	5

各症例の FFPE 切片を薄切し、LMD を用いて癌細胞より 2mm 以内に存在する癌周囲間質を選択的に採取した。

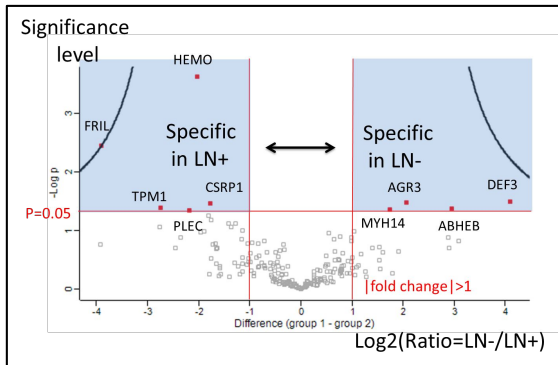


Liquid Tissue™ MS Protein Prep Kit を用いて前処理を施行したのち、LC-MS/MS 測定を行った。

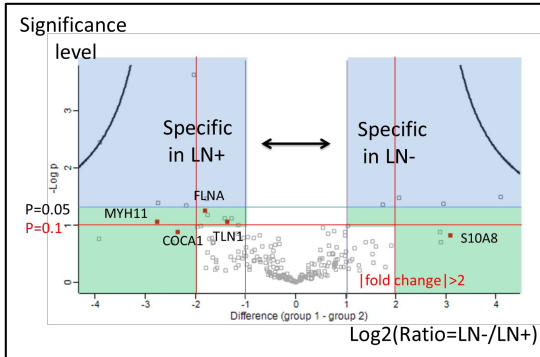
LC-MS/MS 測定結果をソフトウェア MaxQuant で解析を行った。LN(-)群で 445 種類、LN(+)群で 396 種類、合計で 490 種類のタンパク質を同定した。



同定されたタンパク質につき統計ソフトウェア Perseus を用いて、LN(-)群と LN(+)群の群間比較を行い、両群で有意に 2 倍以上差のあるタンパク質を 9 種類 (AGR3, DEF3, MYH14, ABHD14B, HPX, FTL, TPM1, CSRP1, PLEC) 特定した。



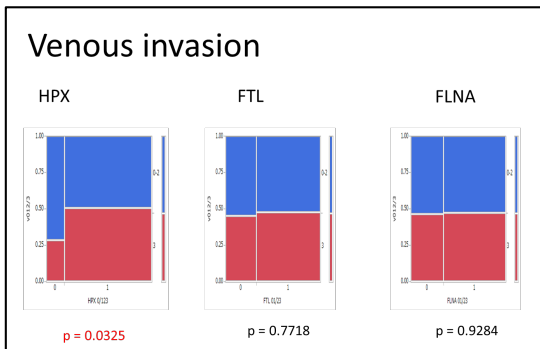
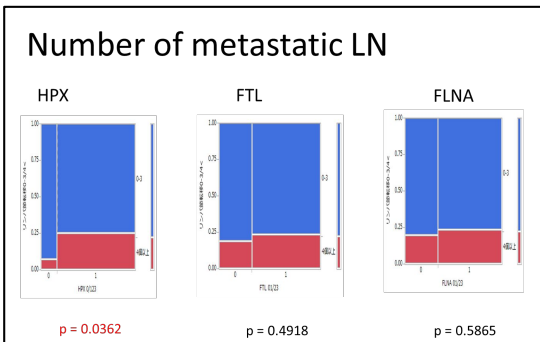
次点候補として閾値境界領域から、スペクトラルカウント法を併用して 5 種類 (S100A8, FLNA, MYH11, COL12A1, TLN1) のタンパク質を追加で選定した。



計 14 種類のタンパク質について、特異的抗体を用いてそれぞれ LC-MS/MS 測定症例 10 症例で免疫染色を行った。間質の染色性を 4 段階評価 (0:negative 1:weak 2:morderate 3:strong) で評価したところ、3 種類 (HPX, FTL, FLNA) のタンパク質において各群で間質の染色性に差を認めた。

3 種類の候補タンパク質について、Large cohort として術前治療未施行 PDAC 症例 165 症例で免疫染色を行い、染色結果とリンパ節転移の有無や予後などの臨床病理学的因子との関係を検証した。

その結果、HPX 陽性症例では有意にリンパ節転移個数 4 個以上の症例が多く、また血管浸潤 v3 症例が多かった。



今後この HPX というタンパク質の機能解析を行い、転移に関わるメカニズムを解明していく予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高舘 達之 (TAKADATE Tatsuyuki)  
東北大学 高度教養教育・学生支援機構  
助教  
研究者番号：50772216

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )