

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09187

研究課題名(和文) 膵・消化管神経内分泌腫瘍におけるCNPY2の肝転移関連機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of liver metastasis-related mechanisms in CNPY2 for gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor

研究代表者

水間 正道 (Mizuma, Masamichi)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：80578675

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)：膵・消化管神経内分泌腫瘍において肝転移は予後不良因子である。われわれは先行研究で膵神経内分泌腫瘍の肝転移にCanopy FGF signaling regulator 2 (CNPY2) が関連することを報告したが、CNPY2の機能は不明である。本研究は、膵・消化管神経内分泌腫瘍におけるCNPY2の増殖、浸潤、転移に関する機能を明らかにすることを目的とした。本研究によって膵・消化管神経内分泌腫瘍におけるCNPY2の増殖、浸潤、転移に関する機能は明らかにならなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究成果からは膵・消化管神経内分泌腫瘍におけるCNPY2の機能は明らかにならず依然不明なままである。しかし、われわれの先行研究からCNPY2は膵神経内分泌腫瘍切除後の肝転移再発に関わる因子であることは明らかであることから、CNPY2がどのように肝転移に関わるかを分子生物学的に解明していくことは新たな治療法やバイオマーカーの開発につながると考えられる点で学術的および社会的に意義を有すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Liver metastasis is a poor prognostic factor in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor (GEP-NET). We have previously reported that Canopy FGF signaling regulator 2 (CNPY2) is related to liver metastasis in pancreatic neuroendocrine neoplasms (PanNEN). However, a molecular biological role of CNPY2 in PanNEN remain unclear. The aim of this study was to elucidate molecular mechanisms of CNPY2 in GEP-NET. This study was not able to clarify a molecular biological role of CNPY2 in GEP-NET.

研究分野：消化器外科学

キーワード：膵・消化管神経内分泌腫瘍 CNPY2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経内分泌腫瘍 (NET) は比較的希少な腫瘍であるが、近年その罹患者数は本邦を含め全世界で増加している。NET の遠隔転移は予後不良因子であり、遠隔転移を伴う NET に対する治療成績の向上が望まれていることから、NET の遠隔転移における分子生物学的機序の解明と新規治療の開発は重要な課題となっているものの、これまで NET の転移機構や転移に関するバイオマーカーはほとんど明らかにされていないのが現状である。

最近われわれは、自施設における膵神経内分泌腫瘍 (PanNEN) 切除症例の臨床検体を用いた研究において、PanNEN の同一症例における膵原発腫瘍と転移性肝腫瘍の発現タンパク質をプロテオミクスで比較解析し Canopy FGF signaling regulator 2 (CNPY2) が PanNEN の新規肝転移関連因子であることを明らかにした (引用文献)。われわれは、CNPY2 は PanNEN の膵原発巣よりも肝転移巣で高発現していること、膵原発巣で CNPY2 陽性症例は陰性症例に比して術後肝転移無再発生存率が有意に低率であること、CNPY2 陽性は術後肝転移再発のリスク因子であること、以上 3 点を明らかにした。

CNPY2 は分泌タンパク質であり、平滑筋細胞の移動、増殖、血管新生などを促進する働きがあること、食道扁平上皮癌において予後不良因子となる可能性があること、非小細胞肺癌において上皮間葉転換 (EMT) を促進すること (引用文献)、大腸癌や腎臓癌では腫瘍増殖に促進的に関連することが報告されている。従って、CNPY2 が NET の増殖、浸潤、転移を促進する機能を有する可能性があると考えられる。また、最近、大腸癌患者の臨床血液サンプルで CNPY2 の血中濃度が健常人よりも有意に高値であり、大腸癌のバイオマーカーとして有用であるとの報告がなされている (引用文献)。従って、NET 患者の血中 CNPY2 を測定し、CNPY2 が血中バイオマーカーになりうるかを研究することは、臨床応用の可能性を秘めていると考えられる。

これまで CNPY2 と悪性腫瘍との関連は少ないながらも報告されてはいるが、NET に関してはわれわれの報告以外にはなく、CNPY2 の機能は未だ大部分が不明であるため、今後明らかにする必要があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、膵・消化管神経内分泌腫瘍 (GEP-NET) に対する新規薬物治療や血液バイオマーカーとしての臨床応用へ展開することを目指し、GEP-NET 細胞株を用いて CNPY2 の増殖、浸潤、転移に関する機能を *in vitro* および *in vivo* により明らかにすることを目的とした。また、GEP-NET 症例の臨床血液サンプルを対象として血中 CNPY2 濃度を測定することにより血中バイオマーカーとしての CNPY2 の有用性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CNPY2 の機能解析

GEP-NET 細胞株を用いて、CNPY2 の mRNA やタンパク発現レベルを定量 PCR や western blot で確認し、CNPY2 の過剰発現株や発現抑制株を siRNA やプラスミドベクターを用いて作製する。作製した CNPY2 の過剰発現株や発現抑制株を用いて MTS アッセイ、invasion assay、soft agar assay を行い、増殖能、浸潤能、足場非依存性増殖能の変化を検討する。

(2) PanNEN 患者を対象とした CNPY2 の血中濃度測定

PanNEN 患者の治療開始前の血液を採取し、CNPY2 の血中濃度を測定する。目標症例は 30 例とする。CNPY2 の血中濃度は ELISA を用いて測定する。CNPY2 の血中濃度と臨床病理学的因子との関連性を解析し、CNPY2 の血液バイオマーカーとして有用性を検討する。

(3) PanNEN 切除検体における CNPY2 および CNPY2 関連因子の解析

先行研究 (引用文献) では CNPY2 の発現は切除標本の免疫組織化学的評価でのみ行われており、切除検体における mRNA レベルでの CNPY2 の発現は評価されていなかった。また、NET において CNPY2 の遺伝子変異に関しては明らかにされていない。既存の PanNEN 切除検体の凍結腫瘍組織を対象として DNA および RNA を抽出し、CNPY2 や CNPY2 に関連する因子の異常を次世代シーケンス (NGS) 解析で検討する。

(4) 患者腫瘍移植マウスモデル (Patient-Derived Tumor Xenograft : PDX) の作製

NET 切除症例の切除標本から腫瘍片を一部採取し、免疫不全マウスの皮下に異種移植する。生着した腫瘍は次代、次々代へとマウス間で継代を行っていき、PDX モデルを作製する。作製した PDX モデルは薬剤感受性の検討や新たな NET 細胞株の樹立などへ展開する。

4. 研究成果

(1) CNPY2 の発現抑制株や過剰発現株の作製

膵・消化管神経内分泌腫瘍の細胞株において CNPY2 の発現を確認し、発現抑制株や過剰発現株

の作製を試みたが、樹立することができなかった。そのため、MTS アッセイ、invasion assay、soft agar assay へと展開して増殖能、浸潤能、足場非依存性増殖能の変化を評価することができなかった。

(2) GEP-NET 患者を対象とした CNPY2 の血中濃度測定

研究期間内に PanNEN 患者の治療開始前の血液サンプルを 14 例採取した (表 1)。目標症例の 30 例に達し次第、CNPY2 の血中濃度を ELISA で測定し、CNPY2 の血中濃度と臨床病理学的因子との関連性を検討する。

表 1

年齢 (平均)	62.9 歳	悪性度 (グレード) NET G1:NET G2	9:5
性別 (男性:女性)	6:8	Ki-67 標識率 (中央値 (範囲)%)	2.0(0-5.8)
腫瘍径 (中央値 (範囲)mm)	10 (2-91)	T 因子** (T1:T2:T3:T4)	11:2:0:1
機能性*:非機能性	4:10	N 因子** (N0:N1)	12:2
原発部位(膵臓:十二指腸)	12:2	M 因子** (M0:M1)	14:0
*インスリノーマ 2 例、ガストリノーマ 2 例		Stage** (I:II:III:IV)	10:2:2:0
** 国際対がん連合 (UICC) TNM 分類			

(3) PanNEN 切除検体における CNPY2 および CNPY2 関連因子の解析

PanNEN 切除検体から腫瘍組織を採取し凍結保存した 13 例 (表 2) において DNA、RNA を抽出した。現在、CNPY2 や CNPY2 関連因子の異常を検討するために次世代シーケンス (NGS) 解析を行っている。

表 2

年齢 (平均)	58.9 歳	悪性度 (グレード) NET G1:NET G2:NET G3	4:6:1 不明 2 例
性別 (男性:女性)	7:6	Ki-67 標識率 (中央値 (範囲)%)	6.5(1-30.5)
腫瘍径 (中央値 (範囲)mm)	21 (10-70)	T 因子** (T1:T2:T3:T4)	4:3:1:5
機能性*:非機能性	4:9	N 因子** (N0:N1)	9:4
局在 (頭部:体部:尾部)	8:2:3	M 因子** (M0:M1)	12:1
*インスリノーマ 4 例		Stage** (I:II:III:IV)	3:3:6:1
** 国際対がん連合 (UICC) TNM 分類			

(4) 患者腫瘍移植マウスモデル (Patient-Derived Tumor Xenograft: PDX) の作製

NET 切除症例 3 例において、PanNEN の腫瘍片を免疫不全マウスに異種移植した (表 3)。Case No3 の腫瘍片が生着したが、次代のマウスへは生着しなかった。PanNEN の臨床検体は免疫不全マウスに生着しにくいことが示唆された。

表 3

Case No.	病理組織	Ki-67 標識率
1	Mixed acinar-neuroendocrine carcinoma	約 60-70%
2	NET G2 肝転移	約 5%
3	PanNEN NET G1	1%

< 引用文献 >

Shimura M, Mizuma M, Takadate T, Katoh Y, Suzuki T, Iseki M, Hata T, Aoki S, Suzuki Y, Sakata N, Ohtsuka H, Hayashi H, Morikawa T, Nakagawa K, Motoi F, Naitoh T, Igarashi K, Sasano H, Unno M. A novel liver metastasis-correlated protein of pancreatic neuroendocrine neoplasm (PanNEN) discovered by proteomic analysis. *Oncotarget*. 2018;9(36):24291-24303.

Dou Y, Lei JQ, Guo SL, Zhao D, Yue HM, Yu Q. The CNPY2 enhances epithelial-mesenchymal transition via activating the AKT/GSK3β pathway in non-small cell lung cancer. *Cell Biol Int*. 2018 Aug;42(8):959-964.

Peng J, Ou Q, Pan Z, Zhang R, Zhao Y, Deng Y, Lu Z, Zhang L, Li C, Zhou Y, Guo J, Wan D, Fang Y. Serum CNPY2 isoform 2 represents a novel biomarker for early detection of colorectal cancer. *Aging (Albany NY)*. 2018;10(8):1921-1931.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	川口 桂 (Kawaguchi Kei) (10700164)	東北大学・高度教養教育・学生支援機構・助教 (11301)	
研究分担者	畠 達夫 (Hata Tatsuo) (30806237)	東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師 (11301)	
研究分担者	高館 達之 (Takadate Tatsuyuki) (50772216)	東北大学・高度教養教育・学生支援機構・助教 (11301)	

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