様　式　C－19、F－19－1、Z－19　(共通)

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　５ 月 １４ 日現在

機関番号：１６４０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：２０Ｋ０７８０６
研究課題名（和文）膵癌細胞の浸潤に関与する糖蛋白質の膵癌診断マーカーへの応用

研究課題名（英文）Application of glycoproteins involved in pancreatic cancer cell invasion as diagnostic markers for pancreatic cancer

研究代表者
吉岡　玲子（Yoshioka, Reiko）

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教

研究者番号：６０８６８９７５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,400,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者は、膵癌細胞の葉状仮足において局所翻訳されることにより浸潤・転移に関わる膜貫通蛋白質である糖蛋白質Aと分泌される糖蛋白質Bを同定した。前向き臨床試験において膵癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆管・胆嚢癌、大腸癌の患者血清中の糖蛋白質A, B濃度をELISA法により測定した。糖蛋白質A,Bは膵癌血清において有意に高値であった。ヒト膵癌オルガノイド移植マウスの血清中の糖蛋白質A, B濃度をELISA法により測定した結果、糖蛋白質A, B はヒト膵癌組織の小さい段階から膵癌の腫瘍マーカーであるCA19-9に比較して高値であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究を推進することにより、画像診断により進行癌として見つかることの多い膵癌に対する新たな診断方法の確立が期待できる。採血によって検査が可能であり、将来は集団検診への利用が可能であると考えている。感度・特異度の高い診断マーカーにより、予後の最も悪い癌である膵癌を高い精度でかつ集団検診でも利用できる効率的な検診方法の開発は急務であり、本研究の成果はこれらのことを実現できる可能性がある。診断の難しい膵癌を正確に簡便な方法で診断することは、膵癌の新しい治療体系を確立できる可能性もあり、日本の医療水準を高めることに貢献できると考えている。

研究成果の概要（英文）：The principal investigator identified a transmembrane protein (glycoprotein A) and a secreted glycoprotein B, which are involved in cell invasion and metastasis through local translation in the lamellipodia of pancreatic cancer cells. In a prospective clinical study, glycoprotein A and B concentrations in serum from patients with pancreatic cancer, esophageal cancer, gastric cancer, hepatic cancer, bile duct/gallbladder cancer, and colon cancer were measured by ELISA. Glycoproteins A and B were significantly elevated in pancreatic cancer serum. As a result of measuring the concentration of glycoproteins A and B in serum of human pancreatic cancer organoid-implanted mice by ELISA method, glycoproteins A and B are higher than CA19-9, a pancreatic cancer tumor marker, from the small stage of human pancreatic cancer tissue.

研究分野：消化器内科　膵癌

キーワード：膵癌　診断マーカー

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

膵癌により年間３万 9000 人が死亡しており、膵癌の５年生存率は 5～10%と極めて低い数値である。膵癌は早期発見が困難であり、感度よく特異的に診断することのできる新たな診断マーカーの同定とその詳細な生化学的解析が必須である。研究代表者らは、葉状仮足において局所翻訳されることにより膵癌細胞の浸潤・転移に関与する膜貫通蛋白質である糖蛋白質Ａを同定した。糖蛋白質Ａが膵癌患者の血清に検出されるかを検討する後ろ向き臨床試験を行った。主に進行した膵癌 23 症例（UICC TNM stage 0：１例, IIA ２例, IIB ４例, III ６例, IV 10 例）の血清を用いて市販の ELISA キットにより定量測定を行った。コントロールとして、慢性膵炎 10 症例、および膵疾患を認めない疾患群（脂肪肝など）51 症例の血清を用いた。その結果、糖蛋白質Ａは、臨床で用いられている膵癌診断マーカーである CA19-9 と同等以上の膵癌診断性能を有することが示唆された。慢性膵炎では軽度の上昇を示す症例はあったが、CA19-9 に比べ頻度は低かった。これらの結果から、糖蛋白質Ａは新規の膵癌診断マーカーに成り得る。

２．研究の目的

本研究は、糖蛋白質Ａの膵癌診断性能を前向き臨床試験により検証することを目標とする。ステージが比較的早期の手術適応である膵癌症例を対象にした前向き臨床試験（UMIN000021938）を実施している。本研究では、UMIN000021938 試験の血清を用いて糖蛋白質Ａの濃度を測定し、膵癌腫瘍マーカーである CA19-9 との診断性能を比較する。さらに、分担研究者らが樹立したヒト膵癌オルガノイド・モデルマウスを用いて、糖蛋白質Ａの診断マーカーとしての詳細な生化学的解析を実施する。

３．研究の方法

①　体外診断薬として認可を目指した ELISA システムを用いて膵癌患者血清中に存在する糖蛋白質Ａを測定する

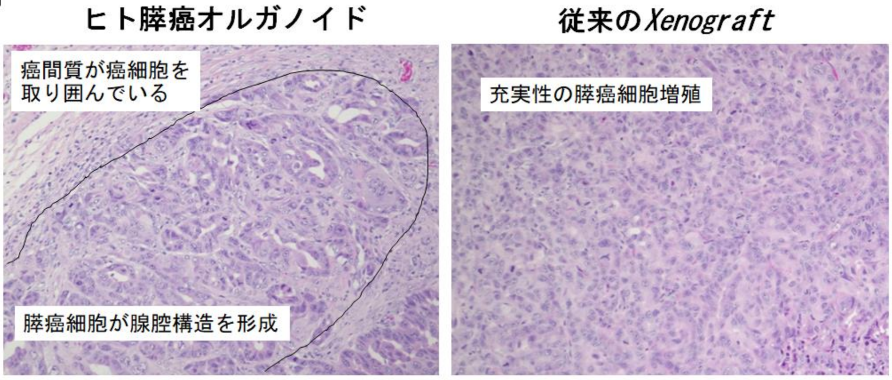
糖蛋白質Ａの膵癌診断性能を UMIN000021938 試験により検証を行った。UMIN000021938 試験では、糖蛋白質Ａが CA19-9 に比較してステージ IIA までの切除可能膵癌の診断性能が勝るかを検証した。日本膵臓学会「膵癌取扱い規約第７版増補版」に則って病期分類を行った。Stage IA １例、Stage IIA 26 例および膵臓疾患と悪性疾患の既往のない正常コントロール 11 例の血清を用いた。認可申請を目指した ELISA システム構築を産学連携研究により進めており、臨床現場での膵癌診断および検診における利用を目指している。特異抗体作製を順調に終了し、試作段階の ELISA キットを用いて臨床試験の血清検体中の糖蛋白質Ａ濃度を測定して、統計解析を行った。

②　ヒト膵癌オルガノイド・モデルマウスを用いた *in vivo* 実験

基礎研究としてモデルマウスの血清を用いた研究を進めた。分担研究者らはヒト膵癌細胞株を用いたオルガノイド培養技術を開発し、ヒト膵癌オルガノイドをマウス背部皮

下に移植したヒト膵癌オルガノイド・モデルマウスを樹立した。マウス背部皮下に形成されたヒト膵癌組織は 4 週で最大径 1cm、6 週で最大径 1.5cm ほどになり、臨床的な膵癌組織と組織構築が極めて類似している（**図１**）。ヒト膵癌由来の癌間質と癌細胞の腺管構造を認め、血清 CA19-9 が移植の 4 週後から経時的に上昇することを確認できている。従来のゼノグラフトモデルでは、膵癌細胞の腺管構造と癌間質の所見がなく臨床的な膵癌の組織構造を認めなかった。本研究では、移植後 4 週目と 8 週目にヒト膵癌オルガノイド・モデルマウスの血清を採取して糖蛋白質 A の血清中の濃度を測定した。糖蛋白質 A がヒト膵癌組織の小さい段階から CA19-9 に比較して膵癌を診断できるかを明確にする。

図1



- 膵癌オルガノイド：腺腔構造・微小乳頭状構造を呈する。癌間質を伴った浸潤像が見られる。組織構築がヒト膵癌組織に類似している。
- 従来のXenograft：充実性の部分がほとんどであり、腺腔構造と癌間質に乏しく、腺癌の組織とは言えない。

4.　研究成果

①　膵癌患者血清中に存在する糖蛋白質 A の測定結果

切除可能膵癌 27 症例（Stage IA 1 例、Stage IIA 26 例）の術前血清を用いて糖蛋白質 A の濃度を ELISA 法により測定した。Stage IA＋Stage IIA の膵癌に対する診断性能を CA19-9 と比較した。本試験では病理組織診断された症例を対象とした。コントロールとして、膵臓疾患と悪性疾患を認めない疾患群 11 症例の血清を用いた。

膵癌症例の血清における糖蛋白質 A 濃度はコントロール症例に比較して中央値は有意に上昇していた（P=0.0093）。糖蛋白質 A の Stage IA＋Stage IIA 膵癌を診断する性能を比較するために、ROC 曲線による解析を行った。糖蛋白質 A の AUC は 0.856 であり、CA19-9 の AUC 0.868 と同等であった。「研究開始当初の背景」にて述べた後ろ向き試験の結果と同様の結果を得ることができた。糖蛋白質 A と CA19-9 の相関分析を行った結果、それぞれ相関性はなかったことから糖蛋白質 A と CA19-9 を組み合わせた診断性能の解析を実施する予定である。

② ヒト膵癌オルガノイド・モデルマウスを用いた *in vivo* 実験結果

ヒト膵癌オルガノイド・モデルマウスの血清を用いて CA19-9 濃度の測定を経時的に実施して論文報告を行った（引用文献 1）。ヌードマウスの背部皮下へヒト膵癌オルガノイドを移植後 4 週目と 8 週目の測定を行った。コントロールとして、ヌードマウスの背部皮下へヒト膵癌細胞株のみを局所注射した従来のゼノグラフトモデルを用いた。ヒト膵癌オルガノイド・モデルマウスの血清 CA19-9 濃度は経時的に上昇したが、従来のゼノグラフトモデルでは局所注射後 8 週目の CA19-9 濃度が 4 週目の CA19-9 濃度よりも低い結果であった。従来のゼノグラフトモデルの腫瘍組織の中心部は一部が壊死しており、相対的に膵癌細胞数が減少しており CA19-9 濃度を用いた評価が困難であった。

本研究では、糖蛋白質 A がヒト膵癌組織の小さい段階から CA19-9 に比較して膵癌を診断できるかを明確にするために、ヒト膵癌オルガノイド・モデルマウスの血清における糖蛋白質 A 濃度の測定を行った。8 匹のマウスを用いて実施し、移植後 4 週の時点で糖蛋白質 A の濃度は上昇した。これらの結果から、糖蛋白質 A は CA19-9 と組み合わせることにより早期段階の膵癌を診断できるマーカーに成り得ることが示唆された。

新たに作製した糖蛋白質 A に対する抗体を用いてヒト膵癌オルガノイド組織における糖蛋白質 A の発現解析を免疫組織染色により実施している。膵癌細胞が局所浸潤する前後で発現の程度を解析して、糖蛋白質 A が早期膵癌の診断マーカーに成り得ることの基盤となる *in vivo* 実験データを得る予定である。

＜引用文献＞

1. Tanaka C, Furihata K, Naganuma S, Ogasawara M, Yoshioka R, Taniguchi H, Furihata M, Taniuchi K. Establishment of a mouse model of pancreatic cancer using human pancreatic cancer cell line S2-013-derived organoid. Hum Cell 35:735-744, 2022.

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計4件（うち査読付論文　3件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　3件）

1．著者名 Tanaka C, Furihata K, Naganuma S, Ogasawara M, Yoshioka R, Taniguchi H, Furihata M, Taniuchi K.	4．巻 35
2．論文標題 Establishment of a mouse model of pancreatic cancer using human pancreatic cancer cell line S2-013-derived organoid.	5．発行年 2022年
3．雑誌名 Human Cell	6．最初と最後の頁 735-744
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13577-022-00684-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Taniuchi K, Ueno M, Yokose T, Sakaguchi M, Yoshioka R, Ogasawara M, Kosaki T, Naganuma S, Furihata M.	4．巻 17
2．論文標題 Upregulation of PODXL and ITGB1 in pancreatic cancer tissues preoperatively obtained by EUS-FNAB correlates with unfavorable prognosis of postoperative pancreatic cancer patients.	5．発行年 2022年
3．雑誌名 PLoS One	6．最初と最後の頁 e0265172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0265172.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Taniuchi K, Ogasawara M.	4．巻 11
2．論文標題 KHSRP-bound small nucleolar RNAs associate with promotion of cell invasiveness and metastasis of pancreatic cancer.	5．発行年 2020年
3．雑誌名 Oncotarget	6．最初と最後の頁 131-147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.27413	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 谷内恵介.	4．巻 41
2．論文標題 10mm以下膵癌診断における膵癌細胞エクソソーム由来RNA検索の可能性.	5．発行年 2020年
3．雑誌名 胆と膵	6．最初と最後の頁 401-407
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

1．発表者名 10.谷内恵介、田中千遥、長沼誠二、常風友梨、内田一茂、降幡睦夫、谷口英樹.
2．発表標題 ヒト膵癌オルガノイド移植マウスの病理組織学的検討.
3．学会等名 第38回日本ヒト細胞学会.
4．発表年 2020年

〔図書〕　計0件

〔出願〕　計2件

産業財産権の名称	発明者	権利者
膵がん及び膵管内乳頭粘液性腫瘍のマーカー	谷内恵介	同左
産業財産権の種類、番号	出願年	国内・外国の別
特許、特願2021-115619	2021年	国内

産業財産権の名称	発明者	権利者
ヒト膵癌オルガノイドを用いたマウスモデルの樹立	谷内恵介	高知大学
産業財産権の種類、番号	出願年	国内・外国の別
特許、特願2020-078771	2020年	国内

〔取得〕　計1件

産業財産権の名称	発明者	権利者
Marker for pancreatic cancer and intraductal papillary mucinous neoplasms	谷内恵介	同左
産業財産権の種類、番号	取得年	国内・外国の別
特許、2016367349 (Australia)	2021年	外国

〔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	谷内　恵介 (Taniuchi Keisuke) (50626869)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・准教授 (16401)	

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