

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15391

研究課題名（和文）膵神経内分泌腫瘍における細胞接着分子Necl-4の発現と機能の解析

研究課題名（英文）Clinicopathological significance of Necl-4 expression in pancreatic neuroendocrine tumor

研究代表者

川西 彩（Kawanishi, Aya）

東海大学・医学部・講師

研究者番号：40773114

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）：本研究では、膵神経内分泌腫瘍（PNEN）におけるNecl-4の発現と機能について検討した。ヒトPNEN組織標本を用いて、Necl-4の免疫組織化学を施行し、臨床病理学的意義の検討を行った。また、ホルマリン固定パラフィン包埋切片（FFPE切片）よりtotal RNAを抽出し、miRNAマイクロアレイによりNecl-4の発現制御に関わるmiRNAを網羅的に探索した。マイクロアレイで同定したNecl-4陰性細胞で有意に発現が亢進しているmiRNAを対象として、PI3K/Akt/mTOR関連遺伝子を標的とするmiRNAの検索を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ヒトPNEN組織標本を用いて、Necl-4の免疫組織化学を施行し、その臨床病理学的意義の検討を行った。更に、ヒトPNEN切除検体のFFPE切片よりtotal RNAを抽出し、miRNAマイクロアレイによりNecl-4の発現制御に関わるmiRNAを網羅的に探索した。マイクロアレイで同定したNecl-4陰性細胞で、有意に発現が亢進しているmiRNAを対象として、PI3K/Akt/mTOR関連遺伝子を標的とするmiRNAの検索を行った。本研究の成果は、Necl-4に関連した独自の・創造的な新規バイオマーカーや治療法の開発への発展が期待され、学術的・社会的に意義があるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）： In this study, We examined the expression and function of miRNAs of Necl-4 with pancreatic neuroendocrine neoplasms (PNEN). Immunohistochemical analysis of Necl-4 expression was performed using tissue microarray blocks constructed from PNETs.

We searched for miRNAs that target PI3K/Akt/mTOR-related genes, targeting miRNAs whose expression is significantly elevated in Necl-4-negative cells identified by microarray.

研究分野：人体病理学

キーワード：膵臓 膵神経内分泌腫瘍 Necl-4 miRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞間接着分子の一つである Necl-4 は、細胞間接着のみならずヘミデスモソームの崩壊を抑制することにより癌抑制因子として機能する¹。いくつかの腫瘍では Necl-4 の発現低下が予後や悪性度に関連することが報告されている。我々は膵管癌における Necl-4 の発現と臨床病理学的因子との関連について検討を行ってきた。その結果、Necl-4 発現消失膵管癌は、Necl-4 発現膵管癌と比較し極めて予後不良であることを先駆けて明らかにした²。

PNEN は膵腫瘍全体の 1-2%を占める腫瘍であり、synaptophysin や chromogranin といった神経内分泌マーカーを発現する。PNEN は大きく neuroendocrine tumor:NET と neuroendocrine carcinoma:NEC に分類される。PNEN における人口 10 万あたりの年間新規発症者数は、2005 年は 1.01 人であったが、2010 年では 1.27 人と増加し、年間受療者数と有病患者数にも増加している。NEC は PNEN 全体の 7.5%を占めるが、急速に増大し、約半数に遠隔転移を伴うため、予後不良であるが、未だ有効な治療法は確立していない。一方、NET は NEC に比較すると予後良好であるが、悪性度(転移、再発、予後)の予測が困難な腫瘍である。現在までに様々な悪性度予測因子が検討されているが、十分にコンセンサスが得られたものが無い。我々の研究成果からは、Necl-4 は膵管癌の高悪性化に関わる重要な分子と考えられる。PNEN は近年増加傾向にあるものの、悪性度(転移、再発、予後)の予測が困難であり、悪性度に関わるメカニズムが十分解明されていない。そこで本研究では、PNEN における Necl-4 の発現と機能を明らかにすることを計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は Necl-4 の発現と機能を解析することにより、PNEN の高悪性化機構を明らかにすることである。さらにその結果を発展・応用させ、Necl-4 を制御する miRNA を明らかにし、Necl-4 に関連した、新規バイオマーカーや治療法の開発への発展を目指す。

3. 研究の方法

(1)PNEN における Necl-4 の発現と臨床病理学的因子の検討

60 例のヒト PanNEN 組織標本を用いて、Necl-4 の免疫組織化学を施行し、その臨床病理学的意義の検討を行った。Necl-4 は腫瘍細胞の細胞質に染色され、腫瘍細胞の染色強度(0-3)に陽性細胞の分布割合(0-100%)を掛け合わせた H score を用いてスコアリングした。スコア 120 未満を陰性、120 以上を陽性として、Necl-4 スコアと臨床病理学的因子との関連について解析した。

(2) miRNA マイクロアレイによる網羅的解析

2022 年度では、Necl-4 は悪性度の高い PNEN で高発現となるという仮説をもとに、ヒト PNEN 切除検体のホルマリン固定パラフィン包埋切片(FFPE 切片)より total RNA を抽出し、miRNA マイクロアレイにより Necl-4 の発現制御に関わる miRNA を網羅的に探索した。Necl-4 陽性検体と Necl-4 陰性検体の miRNA 発現量を比較し検討を行った。

(3) Necl-4 関連 miRNA の確認検証

マイクロアレイで同定した Necl-4 陰性細胞で有意に発現が亢進している miRNA を対象として、PI3K/Akt/mTOR 関連遺伝子を標的とする miRNA の検索を行った。

4. 研究成果

(1)PNEN における Necl-4 の発現と臨床病理学的因子の検討

結果は、ヒト PNEN 組織標本のうち、23.3%(n=14)が Necl-4 陽性、76.7%(n=46)が Necl-4 陰性であった。Necl-4 スコアは、Ki-67 指数(≥ 3 ; p=0.035)、組織学的悪性度(G1:G2/3)1/13:22/24 例(G2/3;p=0.006)で優位に関連を認めた。これらの結果より、Necl-4 は悪性度の高い PNEN で高発現となることが予測された。

(2) miRNA マイクロアレイによる網羅的解析

Necl-4 陽性検体と比較し Necl-4 陰性検体では 3 個の miRNA で 2 倍以上の発現亢進および 7 個で 2 倍以上の発現低下がみられた。統計学的解析の結果、発現亢進 miRNA の 2 個、発現低下 miRNA の 3 個が Necl-4 陽性細胞よりも Necl-4 陰性細胞で有意な発現亢進または発現低下をしていることを同定した。

(3) Necl-4 関連 miRNA の確認検証

スクリーニングは TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_72/)miRBase

(<https://www.mirbase.org/>) を用い、PI3K/Akt/mTOR 関連遺伝子を標的とすると推定される miRNA を抽出した。その結果、対象とする 1 個の miRNA の発現を、FFPE 切片を用いて RT-qPCR 法で検討した。今後は、RT-qPCR 法の結果を解析し、より詳細な解明を行っていく予定である。

<引用文献>

1. Sugiyama H, Mizutani K, Kurita S, et al. Interaction of Necl-4/CADM4 with ErbB3 and integrin $\alpha 6 \beta 4$ and inhibition of ErbB2/ErbB3 signaling and hemidesmosome disassembly. *Genes cells*. 2013 ;18:519-28.
2. Kawanishi A, Hirabayashi K, Yamada M, et al. Clinicopathological significance of Necl-4 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2017 ;70:619-624.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Aya Kawanishi, Toshiki Kodama, Masashi Morimachi, Yumi Takanashi, Kenichi Hirabayashi, Toshio Nakagohri, Naoya Nakamura, and Tatehiro Kagawa
2. 発表標題 Clinicopathological significance of Necl-4 expression in pancreatic neuroendocrine tumor
3. 学会等名 Asian Pacific Digestive Week 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------