

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590408

研究課題名(和文) 浸潤性膵管癌の早期診断のためのプロテオーム解析を用いたバイオマーカー検索

研究課題名(英文) Proteomics of Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma using FFPE Sections

研究代表者

桑江 優子 (Yuko, Kuwae)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・病院講師

研究者番号：50597557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：浸潤性膵管癌について、入手しやすい手術材料のパラフィン切片10例の検討からQSTAR Elite LC-MS/MSによる網羅的プロテオーム解析を用いて早期診断のための特異的バイオマーカーの検索を試みた。幾つかのバイオマーカー候補について、その機能解析、免疫組織化学染色、臨床病理学的データとの統計解析を行った。PNMAL1という蛋白をバイオマーカー候補とし、50例の浸潤性膵管癌における発現の部位、強度と予後の関係について生存分析を施行した。この蛋白の発現はより長い生存期間に関連し(log-rank test; p=0.009)、この蛋白は予後に関わるバイオマーカーになりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to identify novel useful clinical biomarker at early stage and to elucidate the molecular background of carcinogenesis in human pancreatic ductal adenocarcinomas (PDACs). Proteomes of dissected PDACs and adjacent non-tumor pancreatic tissues from formalin-fixed and paraffin-embedded sections from 10 patients were analyzed using QSTAR Elite LC-MS/MS, ProteinPilot and Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Expression of potential biomarker candidates was validated immunohistochemically in 50 PDAC patients, following by survival analyses and statistical comparison of protein expression with clinicopathological variables. Paraneoplastic Ma antigen-like 1 (PNMAL1) was selected as a potential biomarker. Immunohistochemical evaluation in 50 PDAC patients revealed that its positive expression was significantly associated with the better overall survival (log-rank test; p=0.009). thus, PNMAL1 is suggested as a novel potential clinically useful prognostic biomarker of PDAC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：浸潤性膵管癌 バイオマーカー プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

膵癌は我が国において、癌の死因別では男女とも第5位であり、また年々増加傾向にある。初期には無症状のことが多く、早期発見が困難な腫瘍の一つであり、予後も極めて悪い。5年生存率は約4%で、この30年で殆ど改善されていない。昨今では人間ドック等の普及で、画像診断により比較的早期の膵癌が発見されるようになってきているが、全体としては例外的であり、治癒率、死亡率の低下には至っていない。また、膵臓は容易には到達できない後腹膜臓器であり、術前の生検組織診断もし難いのが実情である。また、化学療法の進歩にも拘らず、現時点での最大の予後因子は外科的切除可能かどうかである。そのため、膵癌に特異的で、早期に、かつ非侵襲的に検査ができ、感度に優れたバイオマーカーの発見が望まれる。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト膵臓がんの約90%を占める浸潤性膵管癌の早期発見に有用なバイオマーカーの発見と、発がんのメカニズムの解明を目的としている。使用検体は、当院にて外科切除された膵癌症例のホルマリン固定後手術組織検体であり、QSTAR-Elite LC-MS/MS(AB Sciex)を用いて網羅的プロテオーム解析を行う。試料の処理にはホルマリン固定後検体を使用するLiquid tissue MS protein prepキット(AMR社)及び大阪市立大学医学部分子病理学教室で開発された(新規 Zwittergent 試薬入り)緩衝液を使うことにより、未知の蛋白の同定が可能になると考えられる。

3. 研究の方法

(1)対象

2002年1月から2010年12月までに当院腫瘍外科で切除した浸潤性膵管癌症例123例のうち転帰の明らかな50例。平均年齢 67.6 ± 9.5 (35-85)歳、男性26例、女性24例である。術後経過観察期間の中央値は603日(94-2969日)、浸潤性膵管癌の病理組織診断用組織標本は10%ホルマリンに固定後(3日以内)パラフィン包埋した。病理診断は当院病理部所属の病理医により行われた。

(2)組織サンプルの採取方法

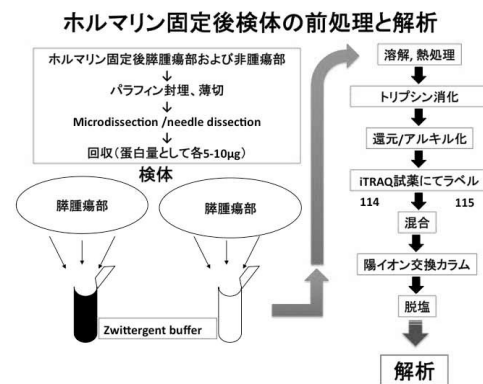
プロテオーム解析用切片は9 μ mに薄切後、ヘマトキシリンにて染色を行った。別に2 μ mに薄切後、ヘマトキシリン-エオジン(HE)染色を行った組織標本にて、切片の切り出し位置を確認し、ニードルダイセクション法を用いて、腫瘍部、非腫瘍部の組織を採取した。この方法では腫瘍細胞だけではなく腫瘍間質が採取される可能性があるが、腫瘍細胞を取り巻く微小環境を反映するメリットもあると考えられた。0.002% Zwittergent 入り pH 8、20 mM Tris-塩酸緩衝液を用いて熱処理(90、90分)を行った後、トリプシン処理(16-18時間)、12350 g、1分間の遠心処理を行った。蛋白質を抽出する。それぞれの蛋白濃度はBCA Protein Assay Kit (Pierce, IL, USA)により測定した。

10例の癌部、非癌部、それぞれ蛋白量20 μ gについてDiNa-AI nano LC System (KYA

Technologies, Tokyo, Japan) およびQSTAR Elite hybrid mass spectrometer (AB Sciex, Concord, ON, Canada)を用いて比較解析を行った。定量的比較のために各々のサンプルにiTRAQ 試薬によるラベリングを下記のごとく行った。PDAC癌部(iTRAQ 試薬114と116)および非癌部(115と117)においてそれぞれにラベリングを行った。

ラベリングされたサンプルは陽イオン交換カラムクロマトグラフィーにて精製し、塩酸カリウム溶液の6分画に溶出したのち、液体成分を遠心分離機で蒸発、上精を乾燥させた。Sep-Pak columns (WATO 23501 Light C18)にて脱塩し、20 μ l の0.1% (v/v) 蟻酸に溶解し、QSTAR Elite LC-MS/MS にアプライした。得られたデータは95%の信頼区間で使用された。

図1. ホルマリン固定検体処理過程



LC-MS/MS によって非腫瘍部に比して、腫瘍部で過剰発現が確認された蛋白から、Ingenuity Pathway Analysis (IPA)を用いてバイオマーカー候補蛋白を選出した。

IPA データベースは300,000に上る遺伝子や蛋白、分子細胞学的プロセスを提供しており、検出された蛋白の機能解析、発現部位の同定のみでなく、個々の臓器や腫瘍において重要な役割を果たすと考えられる蛋白同士の相互作用や機能的グループ、ネットワークの同定が可能であり、有用と考えられた。

4. 研究成果

(1) プロテオームおよびIPA 解析の結果

iTRAQ による定量解析と、非ラベリング解析により、それぞれ291個、602個の浸潤性膵管癌組織と非腫瘍組織で異なる発現を示す蛋白が検出された(99%信頼区域; $p < 0.05$). そのうち、それぞれ137個と247個(計384個)が腫瘍部で高発現を示していた。

Actin beta-like 2 (ACTBL2), fascin homolog 1, actin-bundling protein (FSCN1), transgelin (TAGLN), transgelin 2 (TAGLN2), ezrin (EZR), neurofibromin 1 (NF1), filamin A (FLNA), filamin C (FLNC), tropomyosin 1 (TPM1), tropomyosin 4 (TPM4) および dihydropyrimidinase-like 3 (DPYSL3)などの細胞骨格に関連する多数のアクチン系蛋白や、

anterior gradient homolog 2 (Xenopus laevis)

Protein (symbol)	(GI number/ Swiss-Prot Accession number)	Average fold change	No. of cases	Location	Function
actin, beta-like 2 (ACTBL2)	17244623	2.10	10	U	CO
dihydropyrimidinase-like 3 (DPYSL3)	3122050	?	?	Cy	CO
erinin (ER)	12598726	?	?	PM	CO
flamin A, alpha (FLNA)	11624185	2.14	10	C	CO
flamin C, gamma (FLNC)	254763419	?	?	C	CO
fascin homolog 1, actin-bundling protein (FSCN1)	2498357	?	?	C	CO
keratin 19 (KRT19)	P08727	2.26	9	C	CO
keratin 7 (KRT7)	P08729	?	?	C	CO
transgelin (TAGLN)	3123283	3.67	9	C	CO
transgelin 2 (TAGLN2)	280090	2.39	8	C	CO
tropomyosin 4(TPM4)	P67936	2.22	7	C	CO
biglycan (BGN)	266762	2.65	8	ES	EMO
collagen, type I, alpha 1 (COL1A1)	P02452	2.01	9	ES	EMO
collagen, type V, alpha 2 (COL5A2)	143811378	2.51	5	ES	EMO
fibulin 2 (FBLN2)	224471827	?	?	ES	EMO
fibulin 1 (FBLN1)	P35554	2.53	9	ES	EMO
lumican (LUM)	20141464	3.41	9	ES	EMO
serpin peptidase inhibitor, clade H, member 1 (SERPINH1)	20141241	2.18	6	ES	EMO
elastin microfibril interfacer 1 (EMILIN1)	205371751	?	?	ES	EMO, A
apolipoprotein A4 (APOA4)	113902	2.24	8	ES	ST
apolipoprotein E (APOE)	114039	?	?	ES	ST
cathelin B (CTSBB)	68867549	?	?	C	ST
neurofascin 1 (NF1)	548250	?	?	C	ST
olfactory receptor, family 12, subfamily D, member 2 (OR12D2)	28853820	?	?	PM	ST
S100 calcium binding protein A4 (S100A4)	115401	2.64	5	C	ST
S100 calcium binding protein A6 (S100A6)	116509	3.53	8	C	ST
Src homology 2 domain containing adaptor protein B (SHB)	110816415	?	?	U	ST
epidermal growth factor receptor (EGFR)	2811086	?	?	PM	A
mucin 5AC, oligomeric mucus/gel-forming (MUC5AC/MUC5B)	160370064	?	?	A	A
periostin, osteoblast specific factor (POSTN)	93138709	3.84	9	ES	A
tropomyosin 1 (alpha) (TPM1) (includes EG:22003)	136092	2.48	6	Cy	A
transforming growth factor, beta-induced, 68kDa (TGFB1)	2498193	?	?	ES	AGLEMO
annexin A3 (ANXA3)	113954	?	?	C	IR
immunoglobulin lambda constant 2 (Kern-Oz- marker) (IGLC2)	P0CC05	2.39	5	ES	IR
NLR family, apoptosis inhibitory protein 1 (LOC100510692/NAIP)	109949027	?	?	U	IR
chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1)	121622	?	?	ES	IR, ST
lactate dehydrogenase A (LDHA)	126047	2.28	9	C	M
serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial) (SHM1.2)	6226895	?	?	C	M, CP
proline/arginine-rich and leucine-rich repeat protein (PRELP)	1709586	2.67	6	ES	M, EMO
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5 (DDX5)	129383	?	?	N	MRP
anterior gradient homolog 2 (Xenopus laevis) (AGR2)	6742105	?	?	ES	MS
glutathione S-transferase pi 1 (GSTP1)	121746	?	?	Cy	M
major vault protein (MVP)	21542417	?	?	N	T
catenin (cadherin-associated protein), delta 2 (CTNND2)	8402193	?	?	PM	TR
enolase 1, (alpha) (ENO1)	119339	?	?	C	TR
LIM and cysteine-rich domains 1 (LMCD1)	20978521	?	?	C	TR
SRY (sex determining region Y)-box 11 (SOX11)	1351142	?	?	N	TR
signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa (STAT1)	2507413	?	?	N	TR, ST
fibronectin 1(FN1)	P02751	2.9	9	ES	AG
lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (LGALS1)	126155	2.07	6	ES	AP, CP
SLIT and NTRK-like family, member 6 (SLITRK6)	59853110	?	?	U	AX
bicaudal D homolog 1 (Drosophila) (BICD1)	299572739	?	?	C	H
tensin like C1 domain containing phosphatase (tensin 2) (TENC1)	150416153	?	?	PM	H
apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I) (APOH)	543826	?	?	ES	O
armadillo repeat containing 4 (ARM4)	74744660	?	?	U	U
autism susceptibility candidate 2(AUTS2)	23396464	?	?	U	U
BAH domain and coiled-coil containing 1 (BAHCC1)	205371795	?	?	U	U
PNMA-like 1 (PNMAL1)	7427259	?	?	U	U

1) Location C: cytoplasm; ES: extracellular space; N: nucleus; PM: plasma membrane; U: unknown;
 2) Function A: adhesion of cells; AA: anti-apoptosis; AG: angiogenesis; AP: apoptosis; AX: axonogenesis; CC: cell cycle control; CD: cell differentiation; CO: cytoskeleton organization; CP: cell proliferation; DR: DNA repair; EMO: extracellular matrix organization; H: cell redox homeostasis; IR: immune response; M: metabolism; MRP: mRNA processing and splicing; MS: mucus secretion; PP: protein folding; PL: proteolysis; R: DNA replication; RRP: rRNA processing; ST: signal transduction; T: intracellular transport; TC: transcription; TM: protein post-translational modification; TRA: translation.
 †: detected only in tumor tissues compared with non-tumor tissue by non-label analysis.

表 1 . P D A Cにおけるプロテオームの変化

(AGR2), transforming growth factor beta-induced (TGFB1)、lumican (LUM)、mucin 5AC, oligomeric mucus/gel-forming (MUC5AC/MUC5B)、biglycan (BGN)、periostin, osteoblast specific factor (POSTN)、elastin microfibril interfacer 1 (EMILIN1)、fibulin 2 (FBLN2)、collagen, type I, alpha 1 (COL1A1)、collagen, type 5 alpha 2 (COL5A2)、serpin peptidase inhibitor, clade H, member 1, apolipoprotein A-1 (APOA1)、apolipoprotein E (APOE) および apolipoprotein H (APOH)などの細胞外マトリックス蛋白が高発現を示しており、腫瘍間質が多い浸潤性膵管癌の特徴の一つと考えられた。

また、SRY (sex determining region Y)-box 11 (SOX11)、enolase 1 (ENO1)、catenin (cadherin-associated protein) delta 2 (neural plakophilin-related arm-repeat protein) (CTNND2)、signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1)、LIM and cysteine-rich domains 1 (LMCD1) の状流調節因子の活性化が観察され。さらに、有用な発がん関連蛋白(epidermal growth factor receptor (EGFR)および xenobiotic metabolism phase II enzyme glutathione S-transferase pi 1 (GSTP1) などの数々の転写因子や転写調節因子の過剰発現が示された。

(2) 蛋白の発現部位、機能解析、古典的経路と予測される上流調節因子

検出された多くの蛋白は腫瘍細胞の細胞質に存在するものであった(図 2A)。IPA による蛋白機能の比較解析では、ヒト浸潤性膵管癌では細

胞運動、移動、浸潤、細胞骨格構築、細胞外基質の構築、細胞同士のシグナリングや相互作用、細胞接着、免疫反応、細胞死抑制、血管新生などに関わる分子であった(図 2B)。

図 2A : IPA による蛋白の発現部位解析

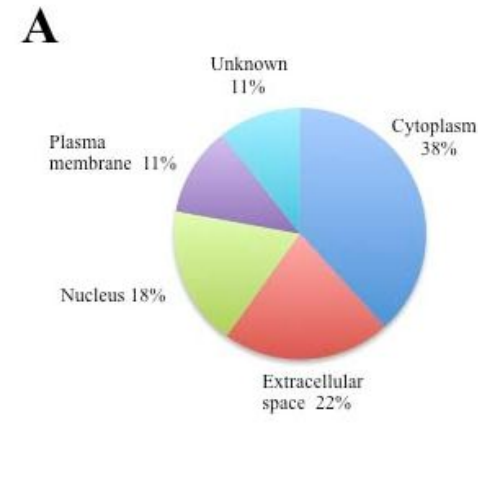
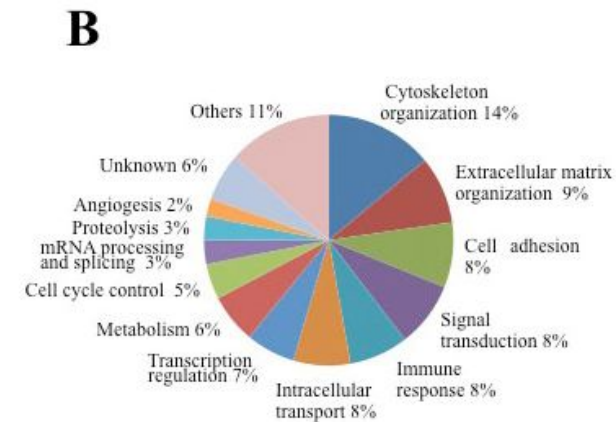


図 2B : IPA による蛋白の機能解析



IPA による上流調節因子の解析では nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NFE2L2 (Nrf2); z score 4.55)、SP1 transcriptional factor (SP1, z score 3.77)、β-catenin (cadherin-associated protein, beta 1) (CTNNB1; z score 3.40)、CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha (CEBPA; z score 3.35) および beta (CEBPB; z score 3.58)、CCAAT-binding transcription factor (CBF-B/NF-YA) subunit B (NFYA; (z score 2.21)、aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (ARNT2; z score 3.00)、SMAD family members 2 (SMAD2; z score 2.22)、SMAD 3 (SMAD3; z score 2.59) および SMAD 4 (SMAD4; z score 2.26)、hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor) (HIF-1; z score 2.78) および SWI/SNF-related, matrix associated, actin dependent regulator of

chromatin, subfamily a, member 4 (SMARCA4; z score 2.17) の活性化がみとめられた(表 2)。また、X-box binding protein 1 (XBP1; z score 2.93)、signal transducer and activator of transcription (STAT) 3(STAT3; z score 2.75)、STAT4 (z score 2.80) および STAT6 (z score 2.22)、hungtingin (HTT; z score 2.72)、jun B proto-oncogene (JUNB; z score 2.59)、estrogen receptor 1 (ESR1; z score 2.54)、serum response factor (c-fos serum response element-binding transcription factor) (SRF; z score 2.36)、FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS; z score 2.16)および myotrophin (MTPN)転写因子の活性化が予想された。さらに、SAM pointed domain-containing Ets transcription factor (SPDEF)、tripartite motif-containing 24 (TRIM24)、homeobox C8 (HOXC8)、T-box 5 (TBX5)および histone deacetylase 2 (HDAC2) の抑制が予想された。

表 2 . IPA により予測される上流調節因子

Table 2. List of predicted upstream regulators.

Upstream Regulator (symbol)	Molecule Type	Predicted Activation State	Activation z-score	p-value of overlap
SMAD3	transcription regulator	Activated	2.590	3.72E-13
CTNNB1	transcription regulator	Activated	3.396	2.55E-12
HTT	transcription regulator	Activated	2.720	2.48E-11
FOS	transcription regulator	Activated	2.161	1.50E-08
SMARCA4	transcription regulator	Activated	2.166	1.93E-08
NFE2L2	transcription regulator	Activated	4.548	2.15E-08
SRF	transcription regulator	Activated	2.357	1.13E-07
CEBPB	transcription regulator	Activated	3.584	2.20E-07
XBP1	transcription regulator	Activated	2.934	2.30E-06
CEBPA	transcription regulator	Activated	3.352	9.18E-06
FOXA2	transcription regulator	Activated	2.390	1.92E-05
SP1	transcription regulator	Activated	3.774	4.87E-05
MTPN	transcription regulator	Activated	2.828	1.09E-04
NFKB (complex)	complex	Activated	3.604	1.79E-04
SMAD2	transcription regulator	Activated	2.219	2.10E-04
NFYA	transcription regulator	Activated	2.213	6.17E-04
JUNB	transcription regulator	Activated	2.900	6.37E-04
SMAD4	transcription regulator	Activated	2.262	1.30E-03
EGR1	transcription regulator	Activated	2.771	1.85E-03
STAT3	transcription regulator	Activated	2.752	2.02E-03
HIF1A	transcription regulator	Activated	2.784	3.06E-03
ESR1	ligand-dependent nuclear receptor	Activated	2.545	5.36E-03
PPARGCIA	transcription regulator	Activated	2.065	5.66E-03
SKIL	transcription regulator	Activated	2.000	6.59E-03
EP300	transcription regulator	Activated	2.269	7.12E-03
HNF1A	transcription regulator	Activated	2.178	9.37E-03
CREB1	transcription regulator	Activated	2.219	9.72E-03
GLI1	transcription regulator	Activated	2.764	1.20E-02
ARNT2	transcription regulator	Activated	3.000	1.21E-02
SIM1	transcription regulator	Activated	3.000	1.44E-02
PGR	ligand-dependent nuclear receptor	Activated	2.423	1.46E-02
HNF4A	transcription regulator	Activated	2.173	2.35E-02
STAT6	transcription regulator	Activated	2.219	3.40E-02
Creb	group	Activated	2.200	3.48E-02
STAT4	transcription regulator	Activated	2.800	3.91E-02
SPDEF	transcription regulator	Inhibited	-3.413	1.99E-10
AHR	ligand-dependent nuclear receptor	Inhibited	-2.917	1.69E-09
TRIM24	transcription regulator	Inhibited	-3.162	9.34E-06
TBX5	transcription regulator	Inhibited	-2.000	4.60E-03
HDAC2	transcription regulator	Inhibited	-2.219	5.35E-03
HOXC8	transcription regulator	Inhibited	-2.000	1.91E-03
NUPR1	transcription regulator	Inhibited	-2.121	1.08E-03

SMAD3: Mothers against decapentaplegic homolog 3; CTNNB1: Catenin beta-1; HTT: hungtingin; FOS: FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog; SMARCA4: SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4; NFE2L2: nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2; SRF: serum response factor (c-fos serum response element-binding transcription factor); CEBPB: CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP); beta; ZBP1: X-box binding protein 1; CEBPA: CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP); alpha; FOXA2: (HNF3B) Hepatocyte nuclear factor 3-beta; SP1: Transcription factor Sp1; MTPN: myotrophin; NFKB: Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit; SMAD2: Mothers against decapentaplegic homolog 2; NFYA: CCAAT-binding transcription factor (CBF-B/NF-YA) subunit B; JUNB: jun B proto-oncogene; SMAD4: Mothers against decapentaplegic homolog 4; EGR1: Early growth response protein 1; STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3; HIF1A: Hypoxia-inducible factor 1-alpha; ESR1: estrogen receptor 1; PPARGCIA: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; SKIL: Ski-like protein; EP300: EP300 protein; HNF1A: Hepatocyte nuclear factor 1-alpha; CREB1: Cyclic AMP-responsive element-binding protein 1; GLI1: Zinc finger protein GLI1; ARNT2: Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2; SIM1: Single-minded homolog 1; PGR: Prostaglandin receptor; HNF4A: Hepatocyte nuclear factor 4-alpha; STAT6: Signal transducer and activator of transcription 6; Creb: cAMP response element-binding protein; STAT4: Signal transducer and activator of transcription 4; SPDEF: SAM pointed domain-containing Ets transcription factor; AHR: Aryl hydrocarbon receptor; TRIM24: Tripartite motif-containing factor 1-alpha; TBX5: T-box transcription factor TBX5; HDAC2: Histone deacetylase 2; HOXC8: Homeobox protein Hox-C8; NUPR1: Nuclear protein 1.

(3) バイオマーカー候補選定

我々はバイオマーカー候補として、高度(非腫瘍組織の2倍以上、 $p < 0.05$)かつ高頻度、すなわち50%以上の症例で陽性となる蛋白について注目した。全てのサンプルで高発現している(99% confidence cut-off limit, $p < 0.05$)、もしくは非ラベリング解析で腫瘍のみに発現していた蛋白を選んで、免疫組織化学染色による validation を施行した。特にバイオマーカーとなりやすい細胞質内、もしくは細胞外マトリッ

クスに発現があるものを中心に以下の蛋白を候補として選出した TGFBI, AGR2, EMILIN, APOH, DPYSL3, PNMAL1 について、免疫組織化学染色による発現の部位、パターン、強度を検索した。

免疫染色した検体は病理医により、胞体もしくは核が陽性を3段階に分類した。いくつかの臨床病理学的パラメータ、すなわち病期、TNM因子、組織学的分化度との関連について統計解析を施行した。

図 3 . PNMAL1 の免疫組織化学染色像

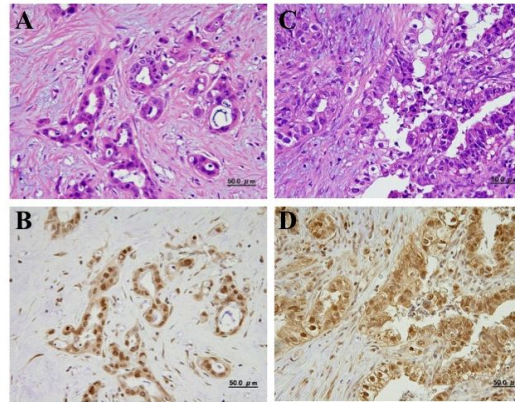
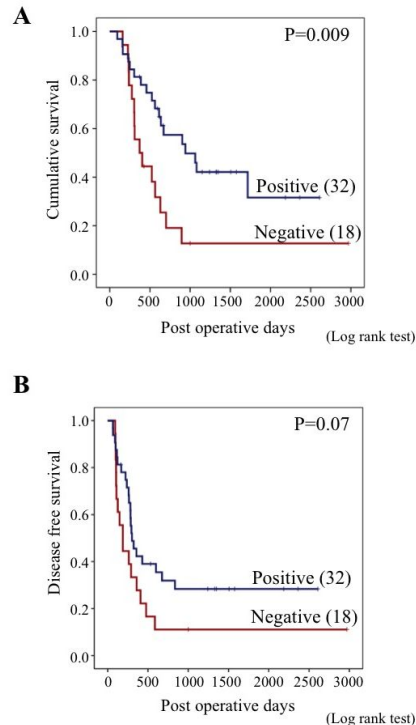


図 3 . PNMAL1 の PDAC 患者における生存解析



腫瘍症例 50 例で、PNMAL1 の細胞質陽性は 1 例が強陽性 (2%; score 3+), 中等度が 15 例 (30.0%; score 2+), 弱陽性 26 例 (52.0%; score 1+) 陰性 8 例 (16.0%; score 0). 核への PNMAL1 陽性は 高度が 4 例(8.0%; score 3+), 中等度が 17 例(34.0%; score 2+), 弱陽性

11 例 (22.0%: score 1+) 陰性 18 例 (36.0%: score 0)であった。

Kaplan-Meier 法による生存分析と log-rank test を施行し、その陽性例と陰性例との間に生存期間の有意差を認めた(図 3)。

今回の研究で、我々は PNMAL1 がヒト浸潤性膵管癌に高発現していることを発見した。また PNMAL1 の発現は発現のない例に比して予後が良好であるとの結果を得た。PNMAL1 遺伝子は染色体 19q13.32 に存在し、5,073 塩基で構成される。蛋白は 439 amino acids, 48161Da であり、その分子学的構造の類似から PNMA family に属すると考えられている。以前より、染色体 1p と 19q のヘテロ接合性の喪失 (LOH) が脳の乏突起神経膠腫における最もよく見られる遺伝子変異であり、化学・放射線療法に対する反応に関連があることが知られている。また、1p/19q 欠失を伴う glioma において PNMAL1 の発現は欠失を伴わない glioma に比して、著明に発現が減少していた。以上のことより PNMAL1 は腫瘍抑制因子として機能することが推測される。

PNMAL1 と相同性があり、腫瘍随伴性脳炎の抗原である Ma1, Ma2, Ma3 は PNMA family として認定され、mRNA 精製やアポトーシスの制御等の役割を担っているとされている。PNMA1 により引き起こされるアポトーシスは bcl 2 に抑制され、PNMA1 による細胞死は Bcl2 family の BH3 domain への結合に依存していると推測される。このように、少なくとも PNMA family のうちの一つは神経細胞においてアポトーシスを促進する役割を担っていると考えられ、その増加が腫瘍随伴性神経疾患の発症の一助となると考えられる。しかしながら、膵癌に関連した腫瘍随伴性神経疾患の報告は現在のところ殆ど見られない。

今回の研究で、ホルマリン固定後パラフィン切片を用いたプロテオーム解析と IPA 解析、免疫組織学的、臨床病理学的解析は新規のバイオマーカー検索において有力な手法であることが示された。また今回発見された PNMAL1 蛋白は、予後因子になりうると考えられた。さらなる研究により、この蛋白の浸潤性膵管癌における機能や特異性を明らかにすることが必要である。

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 6 件)

1) Yuko Kuwae, Anna Kakehashi, Kenichi Wakasa, Min Wei, Shotaro Yamano, MS, Naomi Ishii, Hideki Wanibuchi, Paraneoplastic Ma Antigen-like 1 as a Potential Prognostic Biomarker in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, Pancreas 投稿中(査読有)

2) Tago Y, Yamano S, Wei M, Kakehashi A.,

Kitano M., Fujioka M., Ishii N., Wanibuchi H. Novel medium-term carcinogenesis model for lung squamous cell carcinoma induced by N-nitroso-tris-chloroethylurea in mice. Cancer Sci. 104, 1560-1566, DOI: 10.1111/cas.12289, 2013. (査読有)

3) Yabushita S., Fukamachi K., Kikuchi F., Ozaki M., Miyata K., Sukata T., Deguchi Y., Tanaka H., Kakehashi A., Kawamura S., Uwagawa S., Wanibuchi H., Suzui M., David B. Alexander D.B., Tsuda H. Twenty-one proteins up-regulated in human H-ras oncogene transgenic rat pancreas cancers are up-regulated in human pancreas cancer. Pancreas, 42, 1034-1039, 2013. (査読有)

4) Komatsu H., Kakehashi A., Nishiyama N., Izumi N., Mizuguchi S., Yamano S., Inoue H., Hanada S., Chung K., Wei M., Suehiro S., Wanibuchi H. Complexin-2 (CPLX2) as a potential prognostic biomarker in human lung high grade neuroendocrine tumors. Cancer Biomarkers, 13, 171-80 2013. (査読有)

5) Hanada S., Nishiyama N., Mizuguchi S., Yamano S., Kakehashi A., Wei M., Inoue H., Komatsu H., Chung K., Suehiro S., Wanibuchi H. Proteome analysis based on clinicopathological significance of combined examination of CK19 and preoperative CYFRA21-1 in human lung squamous cell carcinoma. Osaka City Medical J., 59, 35-44, 2013. (査読有)

6) Hanada S., Kakehashi A., Nishiyama N., Wei M., Yamano S., Chung K., Komatsu H., Inoue H., Suehiro S., Wanibuchi H. Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate as a prognostic biomarker in human primary lung squamous cell carcinoma. Cancer Biomarkers, 13: 289-98, 2013. (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

梯アンナ, 桑江優子, 石井真美, 魏 民, 鰐淵英機. ヒト肝細胞癌における LC-MS/MS 及び in vitro 機能解析を用いた新規特異的候補分子ターゲットの検討. 103 回日本病理学会総会, 4 月 23 ~ 25 日, 広島, 2014.

梯アンナ, 石井真美, 藤岡正喜, 魏 民, 鰐淵英機. 肝発がんにおける LC-MS/MS 及び in vitro 機能解析を用いた新規特異的候補分子の検討. 第 30 回日本毒性病理解学会総会および学術集会, 1 月 30 ~ 31 日, 徳島, 2014.

桑江優子、梯アンナ、魏 民、若狭研一、鰐淵英機. Identification of novel protein markers for human pancreatic ductal adenocarcinoma 第 72 回日本癌学会学術総会, 10 月 3~5 日, (2013 年、横浜)

梯アンナ、桑江優子、加藤 実、山野荘太郎、神吉将之、魏 民、若狭研一、鰐淵英機. ヒト肝細胞癌における新規特異的候補分子ターゲットの機能解析. 第 72 回日本癌学会学術総会, 10 月 3~5 日, 横浜, 2013.

鰐淵英機、桑江優子、魏 民、若狭研一、梯アンナ: ヒト肝細胞癌における特異的候補分子の機能解析. 第 102 回日本病理学会総会, 6 月 6~8 日, 札幌, 2013.

A. Kakehashi, A. Hagiwara, N. Imai, Y. Doi, K. Nagano, M. Banton, F. Nishimaki, H.Wanibuchi and S. Fukushima. Ethyl tertiary-butyl ether induces oxidative stress and 8-OHdG formation in the liver of F344 rats via activation of CAR, PXR and PPAR nuclear receptors. Gonzales Conventional Center, Texas, San-Antonio, U.S.A., Mar 12, 2013

桑江優子、梯アンナ、魏 民、若狭研一、鰐淵英機. FFPE 標本を用いたヒト浸潤性膵管癌のプロテオーム解析. 第 71 回日本癌学会学術総会, 9 月 19~21 日, (2012 年、札幌)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑江 優子 (KUWAE Yuko)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師
研究者番号：50597557

(2) 研究分担者

梯 アンナ (KAKEHASHI Anna)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：60382222

(3) 研究分担者

若狭 研一 (WAKASA Kennichi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・登録医
研究者番号：60158574

(4) 連携研究者

鰐淵 英機 (WANIBUCHI Hideki)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：90220970