

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293299

研究課題名(和文) 網羅的蛋白質解析を利用した膵胆道癌早期診断法の確立とその分子機構解明に向けた挑戦

研究課題名(英文) Identification of novel biomarkers for pancreato-biliary cancer by comprehensive protein profiling analysis

研究代表者

宮崎 勝 (Miyazaki, Masaru)

国際医療福祉大学・大学病院・教授

研究者番号：70166156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌組織の癌部、非癌部を2次元電気泳動により比較、癌高発現蛋白として5種類を同定。Cofilin-1は9 sample全てで高発現であった。組織免疫染色ではCofilin-1発現は59例の膵癌中44例に高発現を認め、有意に血行性転移が多かった。

血中Cofilin-1に対する抗原抗体複合体: Immune-complex(IC)を検出するELISAの系を確立した。血中のCofilin-1 ICの血中マーカーとしての検定を行うと、膵癌では健常人、膵炎と比較し有意に高値であり、膵癌の進行度が進むにつれて、血清IC値は上昇し、Kaplan-Meier解析で高値群では予後不良であった(p=0.039)。

研究成果の概要(英文)：We aimed to elucidate the key molecules involved in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) progression using proteomics approaches. First, we performed two-dimensional electrophoresis to identify the proteins overexpressed in PDAC tissues. Cofilin-1 were identified and verified as a candidate protein commonly upregulated in PDAC tissues. In immunohistochemistry, samples were divided into two groups based on the level of cofilin-1 expression, the High expression group showed significantly higher incidence of hematogenous dissemination in relapse forms of patients than did the Low expression group. After we established a detection system for immune-complex (IC) of cofilin-1 in sera, we observed that cofilin-1 IC levels in PDAC patients were significantly higher than those in healthy volunteers and patients with pancreatitis. Notably, those levels showed a stepwise increase during PDAC progression. These results suggest that cofilin-1 IC in sera is a potential serum biomarker for PDAC.

研究分野：消化器外科

キーワード：癌 外科 プロテオーム

## 1. 研究開始当初の背景

膵・胆道癌による死亡数は近年増加の一途を辿り、様々な悪性腫瘍の中でも最も予後不良の癌となっている。その主な理由は画像診断能が向上した現在でも依然として早期発見が困難なことより手術切除率が低く、診断時および術後早期に転移・再発を来してしまうためである。従って、早期診断および外科的根治切除を目指すと同時に、術後の再発・転移制御が治療成績の向上を図る上での最重要課題である。

そこで本研究では、Primary tumor で高発現している蛋白の中から転移形式に深く関わる蛋白を見出し、その蛋白発現を組織、血清中の両方で確認することにより、実際に臨床における再発・転移形式との相関があるかを検証、さらにその血清中の蛋白存在量に臨床的意義があるかどうかの関連を模索する。

近年、癌における転移のメカニズムが様々な観点から詳細に示され、徐々に解明されつつある(Thompson WE, Haviv I, The social aspect of EMT-MET plasticity. Nat Med 2011)。一方、Cancer stem cell や niche の概念の出現により、primary tumor の集団に少数の割合で self-renewal capacity を有する細胞があり、さらにこのような細胞が転移巣での腫瘍の定着、増殖に関与するとの考えが示されはじめている。さらに、そこには様々な特異的蛋白の関与が示唆され、それらの蛋白により遠隔巣での転移の進展が惹起されていると考えられている(Oskarsson T *et al.*, Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. Nat Med 2011)。我々は、現在、このような研究を行い、細胞外マトリックスである Tenascin C と Fibronectin が強調して癌細胞の細胞遊走浸潤に関わり、また、細胞の幹細胞化を引き起こしているとのデータも得ている(投稿準備中)。そして、上皮間葉系移行により変化した細胞が原発巣からはなれ、やがて circulating tumor cells (CTC)として血中に移行し、転移巣に辿り着くという一連の経緯をたどると考えられており、このことは、癌患者の原発巣および血液中に転移に深く関わる蛋白が存在することを示唆している。また、遺伝子改変モデルを用いた実験では、極早期の膵臓前癌病変が発生した段階ですら血中に悪性細胞が流入していることも示されている(Rhim AD *et al.* Cell 2012)。しかし、このような血中の膵癌細胞を人にて癌早期の段階から検出する方法は以前開発されていない。

現在まで、我々は種々の Proteomics の手技を用い、組織、血清中の蛋白発現を比較解析し、膵癌に対する診断・予後および治療に関連する新規腫瘍関連因子の同定を行ってきた(Kagawa S, Takano S, Miyazaki M *et al.* Akt/mTOR signaling pathway is crucial for gemcitabine resistance induced by Annexin II in pancreatic cancer cells. J Surg Res 2012, Takano S, Miyazaki M *et al.*, Apolipoprotein C-1 maintains cell survival by preventing from apoptosis in pancreatic cancer cells. Oncogene 2008, Takano S, Miyazaki M *et al.*, AnnexinII

rapid recurrence after surgery in pancreatic cancer patients undergoing gemcitabine adjuvant chemotherapy. Ann Surg Oncol 2008)。さらに、血清中のリン酸化蛋白の存在量を網羅的に測定することで、新規血清膵癌マーカーの候補蛋白の同定を行ってきた。(Takano S, Miyazaki M *et al.*, Increased circulating cell signalling phosphoproteins in sera are useful for the detection of pancreatic cancer. Br J Cancer 2010)。高感度の Luminex 測定系を用いることにより血清中にリン酸化蛋白が存在することが確認でき、それが多くの膵癌増殖関連蛋白であることが判明した。さらに興味深いことに、早期癌患者においてもある種の血清中リン酸化蛋白の値が健常人より高かった。このような蛋白は増殖活性が盛んな癌細胞からの逸脱によって血中濃度が高まっていると考えられ、膵癌においては early stage にも関わらず血中に腫瘍細胞が認められる可能性がある。

そこで、本研究では、これまで我々が培ってきたプロテオミクス研究技術を生かし、このような転移増殖に関わる蛋白の発見に努め、これらの蛋白を種々の方法で測定することで、膵癌の早期診断に生かすことを目指す。

## 2. 研究の目的

膵・胆道癌は消化器癌の中でも特に予後不良の疾患で、診断された時点ですでに遠隔転移を有することが多い。たとえ早期診断の後、根治手術が可能でも術後早期に再発・転移を来することが最大の原因である。近年、上皮・間葉系移行概念の進歩、さらに CTC, Niche 等に関わる転移のメカニズムも様々な視点より解明されつつあるが、治療にまで結びついていないのが現状である。

そこで本研究では、まず正常組織および癌部との蛋白発現を比較、膵・胆道癌に対して標的となりうる蛋白をプロテオーム技術により同定し、候補蛋白に対し、血中にて蛋白自身(抗原)、その蛋白に対する抗体さらにその抗原抗体複合体を sandwich ELISA 系により測定することで血中診断マーカーとしての臨床応用を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) アガロース 2次元電気泳動法による候補蛋白の同定。

まず、3人の膵癌切除標本より得られたそれぞれの癌部・非癌部の蛋白発現を 2-DE の手法(Seimiya M, Miyazaki M *et al.* Identification of novel immunohistochemical tumor markers for primary hepatocellular carcinoma; clathrin heavy chain and formiminotransferase cyclodeaminase. Hepatology 2008)にて比較検討し、癌部で高発現している蛋白の内、3症例において共通しているものを取り上げ、候補蛋白とする。候補蛋白の gel を切り出し、ゲル内消化を行い、精製同定する。Preliminary に既に 36 蛋白の同定がなされている。次に、2-DE で得られた結果の再現性を他の症例の癌部・非癌部蛋白

において Western blot で確認する。

(2) 切除膵癌組織に対する候補蛋白の免疫組織学的検討および発現強度と臨床病理学的因子、転移形式、予後との関連についての検討。

続いて、候補蛋白の癌組織における局在と発現の強度を免疫組織学的に検討する。今回の検体は間質も含んだ膵組織全体での比較であるため、局在についてはその蛋白が癌上皮由来か間質由来かも検討が必要になる。Preliminary data として、Cofilin の組織免疫染色では癌細胞の細胞質に発現を認め、正常膵管細胞および腺房細胞にはほとんど染まらないという所見が得られた。

これらの候補蛋白と臨床病理学的因子との相関を解析し、また転移形式における蛋白の発現差異(局在・強度)があるかの検討、さらには Kaplan-Meier、単変量・多変量解析を用いた予後因子としての統計解析を行うことで、候補蛋白が臨床上的どのような意義があるかを検討する。

(3) 患者血液中の候補蛋白値測定のための ELISA 系の確立。

2-DE によって見出された癌高発現候補蛋白の血中への逸脱および Circulating tumor cell (CTC) の概念に基づき、血管内に循環する抗原(候補蛋白)、その抗原に対する自己免疫反応により生成される自己抗体、さらにはそれらの複合体(抗原抗体複合体)を detect する sandwich ELISA の系を作製し、その測定値が再現性のあるものかを確認する。元来、血中に逸脱する蛋白および CTC の存在量は微量であると考えられる。しかし、それに対し免疫反応によって産生される抗体、および抗原抗体複合物質に対しても同様に測定を試みることで血中の候補蛋白関連物質によりアプローチできる機会が増えると考えられる。

(4) 血中の候補蛋白関連物質の存在量測定および血中マーカーとしての感度・特異度の検定。

まず候補蛋白関連物質の膵癌と健常人においての測定値の違いを検討する。さらに、膵炎患者検体を含めた 3 群間においての検討も行い、膵癌特異的なマーカーとして感度のみならず、特異度についても注目して確認していく。

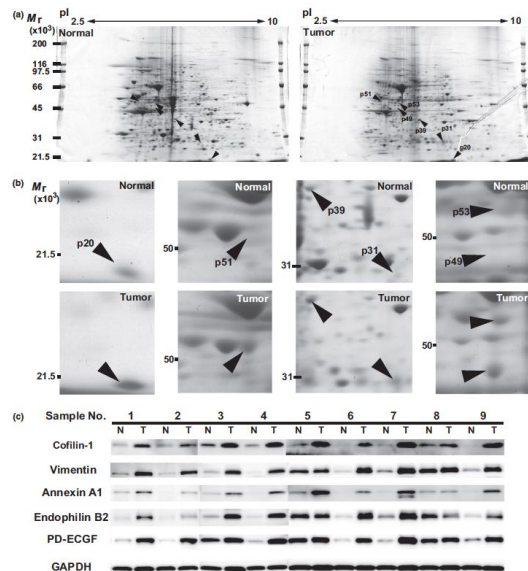
(5) 血中の候補蛋白関連物質測定値と臨床病理学的因子、転移形式、予後との関連についての検討。

研究内容に引き続き、それぞれ候補蛋白の測定値と臨床病理学的因子、転移形式および予後との関連を調べ、さらに平行して行われる原発巣の免疫組織学的検討と血中の測定値の相関が認められるかの検討を行う。

#### 4. 研究成果

(1) 膵癌患者組織サンプルの癌部、非癌部の protein profiling を 2 次元電気泳動 (2-DE)

によって比較し、2 倍以上の癌高発現候補蛋白として 11 の蛋白が同定された。その内 5 種類の蛋白 (Vimentin, Annexin A1, Endophilin B2, PD-ECGF, Cofilin-1) が western blot で癌での高発現が確認され、Cofilin-1 は 9 sample 全てで高発現であった。

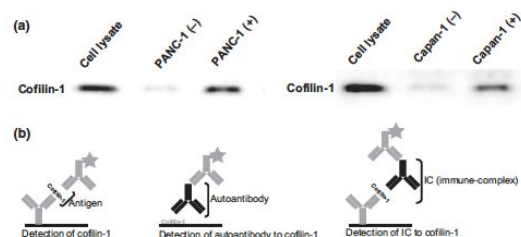


(2) 組織免疫染色では Cofilin-1 発現は 59 例の膵癌中 44 例 (75%) に高発現を認め、有意に血行性転移が高かった (P=0.0083)。

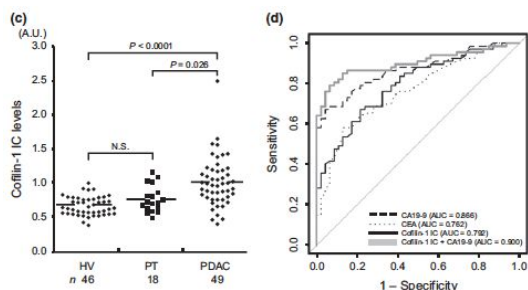
| Recurrence form                 | Cofilin-1 IHC staining |                |                 |
|---------------------------------|------------------------|----------------|-----------------|
|                                 | Total                  | Low expression | High expression |
|                                 | 50                     | 14             | 36              |
| Local recurrence                | 15                     | 7              | 8               |
| Lymph node                      | 4                      | 1              | 3               |
| Peritoneum                      | 9                      | 4              | 5               |
| Distant metastasis (liver/lung) | 22                     | 2              | 20              |

(3) 2 種類の膵癌細胞株で培養上清中の Cofilin-1 の発現を確認した。

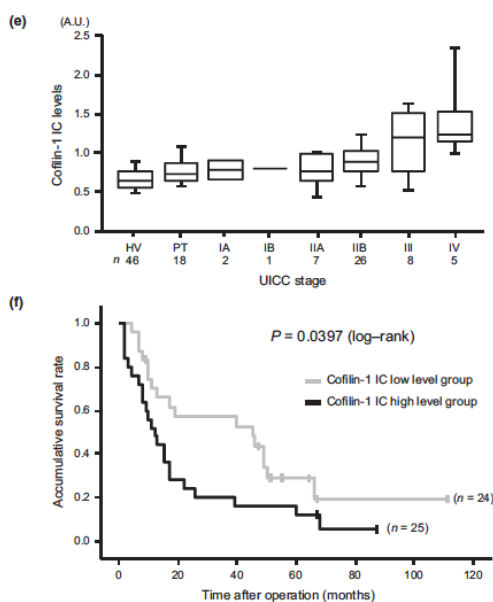
そこで、Cofilin-1 の血中への逸脱による血管内に循環する抗原(候補蛋白)、その抗原に対する自己抗体、さらにはそれらの複合体(抗原抗体複合体:Immune-complex(IC))を検出する sandwich ELISA の系をそれぞれ作製し、その測定値が再現性のあるものかを検討した。最初に試みた抗原に対する ELISA 測定系では、再現性の得られる測定系は確立出来ず、自己抗体に対する測定系でも安定した値は得られなかった。それに対し IC に対する ELISA では、安定した再現性が得られ実験系を確立した。



(4) 臨床応用に重要な膵癌の血清 biomarker の確立として、血中の Cofilin-1 IC の存在量測定および血中マーカーとしての感度・特異度の検定を行った。まず cofilin-1 の膵癌と非癌サンプル(健常人および膵炎)における測定値の違いを検討した。すると、膵炎患者検体を含めた3群間において、膵癌では健常人、膵炎と比較し、cofilin-1 の血清中 IC 値は有意に高値であった。



(5) さらに、膵癌の進行度が進むにつれて、血清 IC 値は上昇し、Kaplan-Meier 解析では中央値で高低値群の2群に分けると、高値群では有意に予後不良であった(p=0.039)。



## 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7件)

Satoh M, Takano S, Sogawa K, Noda K, Yoshitomi H, Ishibashi M, Mogushi K, Takizawa H, Otsuka M, Shimizu H, Miyazaki M, Nomura F., Immune-complex level of cofilin-1 in sera is associated with cancer progression and poor prognosis in pancreatic cancer., *Cancer Sci.*, 査読有、108 巻、2017、795-803、DOI: 10.1111/cas.13181.

Sogawa K, Takano S, Iida F, Satoh M, Tsuchida S, Kawashima Y, Yoshitomi H, Sanda A, Kodera Y, Takizawa H, Mikata R, Ohtsuka M, Shimizu H, Miyazaki M, Yokosuka O, Nomura F., Identification of a novel serum biomarker for pancreatic cancer, C4b-binding protein  $\gamma$ -chain (C4BPA) by quantitative proteomic analysis using tandem mass tags., *Br J Cancer.*, 査読有、115 巻、2016、949-956、DOI: 10.1038/bjc.2016.295.

Miyazaki M, Yoshitomi H, Takano S, Shimizu H, Kato A, Yoshidome H, Furukawa K, Takayashiki T, Kuboki S, Suzuki D, Sakai N, Ohtuka M., Combined hepatic arterial resection in pancreatic resections for locally advanced pancreatic cancer., *Langenbecks Arch Surg.*, 査読有、402 巻、2017、447-456、DOI: 10.1007/s00423-017-1578-5.

Miyazaki M, Shimizu H, Ohtuka M, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Takayashiki T, Kuboki S, Takano S, Suzuki D, Higashihara T., Portal vein thrombosis after reconstruction in 270 consecutive patients with portal vein resections in hepatopancreatobiliary (HPB) surgery., *Am J Surg.*, 査読有、2016、DOI: 10.1016/j.amjsurg.2016.12.008. [Epub ahead of print]

Takano S, Reichert M, Bakir B, Das KK, Nishida T, Miyazaki M, Heeg S, Collins MA, Marchand B, Hicks PD, Maitra A, Rustgi AK., Prx1 isoform switching regulates pancreatic cancer invasion and metastatic colonization., *Genes Dev.*, 査読有、30 巻、2016、233-47、DOI: 10.1101/gad.263327.115.

Nishida T, Yoshitomi H, Takano S, Kagawa S, Shimizu H, Ohtsuka M, Kato A, Furukawa K, Miyazaki M., Low Stromal Area and High Stromal Microvessel Density Predict Poor Prognosis in Pancreatic Cancer., *Pancreas.*, 査読有、45 巻、2016、593-600、DOI: 10.1097/MPA.0000000000000499.

Akiyama T, Shida T, Yoshitomi H, Takano S, Kagawa S, Shimizu H, Ohtsuka M, Kato A, Furukawa K, Miyazaki M., Expression of Sex Determining Region Y-Box 2 and Pancreatic and Duodenal Homeobox 1 in Pancreatic Neuroendocrine Tumors., *Pancreas.*, 査読有、45 巻、2016、522-7、DOI: 10.1097/MPA.0000000000000504.

〔学会発表〕(計4件)

高野重紹、吉富秀幸、賀川真吾、清水宏明、大塚将之、加藤 厚、古川勝規、高屋敷 吏、久保木 知、鈴木大亮、酒井 望、野島広之、宮崎 勝、Annexin II 発現における膵癌バイオマーカーの臨床学的意義、第116回日本外科学会定期学術集会、2016年4月14日~4

月 16 日、大阪国際会議場（大阪府大阪市）  
S. Takano, H. Yoshitomi, S. Kagawa, H. Shimizu, M. Ohtsuka, A. Kato, K. Furukawa, T. Takayashiki, S. Kuboki, D. Suzuki, N. Sakai, H. Nojima and M. Miyazaki、第 47 回日本膵臓学会大会、第 20 回国際膵臓学会、第 6 回アジアオセアニア膵臓学会、2016 年 8 月 4 日～8 月 7 日、仙台国際センター（宮城県仙台市）

Shigetsugu Takano, Mamoru Satoh, Kazuyuki Sogawa, Hideyuki Yoshitomi, Hiroaki Shimizu, Masayuki Ohtsuka, Atsushi Kato, Satoshi Kuboki, Shingo Kagawa, Kazuyuki Matsushita, Fumio Nomura and Masaru Miyazaki、Identification of Cofilin as a useful biomarker in pancreatic cancer progression.、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8 日～10 月 10 日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

Shingo Kagawa, Shigetsugu Takano, Mamoru Satoh, Kazuyuki Sogawa, Hideyuki Yoshitomi, Hiroaki Shimizu, Masayuki Ohtsuka, Atsushi Kato, Katsunori Furukawa, Tsukasa Takayashiki, Satoshi Kuboki, Daiki Okamura, Daisuke Suzuki, Nozomu Sakai, Fumio Nomura, Masaru Miyazaki、自己免疫複合体測定法による膵癌バイオマーカーの臨床学的意義、第 23 回日本消化器関連学会週間 (JDDW2015)、2015 年 10 月 8 日～10 月 11 日、グランドプリンスホテル新高輪（東京都品川区）

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 宮崎 勝  
(MIYAZAKI Masaru)  
国際医療福祉大学・大学病院・教授  
研究者番号：70166156

(2) 研究分担者 高野 重紹  
(TAKANO Shigetsugu)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：20436380

研究分担者 吉富 秀幸  
(YOSHITOMI Hideyuki)  
千葉大学・医学（系）研究科（研究院）・  
講師  
研究者番号：60375631

研究分担者 大塚 将之  
(OHTSUKA Masayuki)  
千葉大学・医学（系）研究科（研究院）・  
教授  
研究者番号：90334185

研究分担者 清水 宏明  
(SHIMIZU Hiroaki)  
千葉大学・医学（系）研究科（研究院）・

准教授  
研究者番号：80272318

研究分担者 加藤 厚  
(KATO Atsushi)  
国際医療福祉大学・大学病院・教授  
研究者番号：70344984

研究分担者 久保木 知  
(KUBOKI Satoshi)  
千葉大学・医学（系）研究科（研究院）・  
助教  
研究者番号：50571410

研究分担者 賀川 真吾  
(KAGAWA Shingo)  
千葉大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：90507302