

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860249

研究課題名(和文)細胞間接着分子Nectin・Neclの膵神経内分泌腫瘍における発現と機能の解析

研究課題名(英文)Expression and role of nectin/necl in pancreatic neuroendocrine neoplasms

## 研究代表者

平林 健一 (HIRABAYASHI, Kenichi)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：60514388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：膵神経内分泌腫瘍でのnectinの発現と膵癌細胞株を用いたnectin-3の機能の解析を行った。免疫組織化学では、膵神経内分泌腫瘍ではnectin-2とnectin-3の比較的高い発現が認められたが、nectin-1とnectin-4は低発現であった。また、nectin-3の発現低下は、非機能性腫瘍、腫瘍径の大きな腫瘍、ki67陽性率が高い腫瘍、WHO gradeの高い腫瘍と関連があった。膵癌細胞株を用いた検討では、nectin-3ノックダウン細胞では細胞増殖能、細胞遊走能がコントロール群と比較し有意に高かったが、基底膜マトリクスに対する浸潤能に有意差は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Nectin expression in pancreatic neuroendocrine neoplasms (PNEs) was evaluated by immunohistochemistry and the role of nectin-3 in pancreatic cancer cell lines was analyzed. Immunohistochemical analysis revealed that nectin-2 and nectin-3 showed relatively high expression in PNEs, whereas nectin-1 and nectin-4 showed no or low expression. The low expression of nectin-3 in PNEs was associated with non-functional tumors, larger tumor size, higher Ki-67 labeling index, and a higher WHO grade. Moreover, nectin-3-knockdown pancreatic cancer cells exhibited a faster cell proliferation rate and migration than the negative control cells, although no significant difference was detected in the invasion assay.

研究分野：病理診断学

キーワード：膵神経内分泌腫瘍 Nectin Necl

### 1. 研究開始当初の背景

Nectin は immunoglobulin-like family に属する  $Ca^{2+}$  非依存性の接着分子であり、細胞質において actin 線維結合蛋白質である afadin と結合し actin 細胞骨格と連結している。Nectin/afadin 系接着分子は、E-cadherin/catenin 系と相互に作用し接着結合を形成し、更に E-cadherin/catenin 系を細胞間接着部位にリクルートする機能を有している。Nectin には 4 つの subtype が知られている。Nectin は nectin と類似したドメイン構造を有する分子で、nectin とともに細胞間接着や細胞移動に関与している。Nectin には 5 つの subtype が知られている。近年、様々な腫瘍で Nectin/necl の検討が報告されている。例えば、子宮頸部扁平上皮癌では nectin-1 の発現が腫瘍先進部で低下 (Guzman, et al., Arch Pathol Lab Med, 130, 2006)、胆嚢癌では nectin-2 の発現が転移・浸潤に関連 (Miao et al., Int J Clin Exp Pathol, 6, 2013)、肺非小細胞癌では nectin-4 の発現が予後不良に関連 (Takano, et al., Cancer Res, 69, 2009)、肺腺癌では necl-5 の発現が浸潤に関連 (Tane, et al., Exp Mol Pathol, 94, 2013)、大腸癌では necl-1、necl-4 が腫瘍増殖抑制に関連 (Raveh, et al., J Cell Biochem, 108, 2009) 等が報告されている。また、卵巣癌では血清 nectin-4 濃度が CA125 よりも特異度の高い腫瘍マーカーとして期待されている (Derycke, et al., Am J Clin Pathol, 134, 2010)。更に卵巣癌、乳癌では nectin-2 が抗体療法の新たな標的として検討されている (Oshima, et al., Mol Cancer, 12, 2013)。

膵神経内分泌腫瘍 (pancreatic neuroendocrine neoplasm; PNEN) は膵腫瘍全体 1-2% を占める稀な腫瘍であり、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。NEC は肺などでみられる小細胞癌または大細胞癌と同様の組織像を示し高悪性度の腫瘍である。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、予後等) 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がされているが、十分にコンセンサスが得られたものは無い。近年、上皮細胞が間葉系様細胞に形態変化する現象である epithelial-Mesenchymal Transition (EMT; 上皮間葉移行) の獲得が、腫瘍細胞の浸潤転移に関連していると示唆されている。E-cadherin は腫瘍の悪性度とその発現が逆相関し、また EMT 獲得に伴いその発現が抑制されることから EMT の代表的な指標の一つとされている。Gastrointestinal NEN でも NET に比較し NEC では E-cadherin の発現が低下すると報告されている (Li, et al. Virchows Arch, 440, 2002)。Nectin は E-cadherin と

相互作用する接着分子であることから、nectin/necl も同様に PNEN の悪性度に関連するのではないかと着想した。

### 2. 研究の目的

細胞間接着分子である nectin および necl について PNEN での発現や機能を解明することにより、nectin, necl に関連した腫瘍マーカーの開発や新たな治療法の開発などの臨床応用へと展開するための研究基盤を確立することを目指す。

### 3. 研究の方法

1) 症例: 1991 年 ~ 研究期間中に切除された PNEN を対象とした。過去の症例はすべてホルマリン固定後パラフィン包埋 (FFPE 切片) されている。

2) 免疫組織化学: 外科切除された PNEN の FFPE 切片を対象とし免疫組織化学を施行した。各 nectin subtype (nectin-1, nectin-2, nectin-3, nectin-4) に対する一次抗体を使用した。

3) 臨床病理学的検討: PNEN 切除標本は通常の病理学的検索を行い、膵癌取扱い規約、WHO/ENETS 分類、UICC/AJCC 分類に従い病理学的事項をまとめた。腫瘍 grade に関しては、WHO 分類に従い G1、G2、G3 (NEC) に分類した。また、予後、再発などの臨床的事項に関してもデータ収集を行った。Nectin の発現と臨床病理学的事項の関連を統計学的に解析した。

4) 細胞株: 膵神経内分泌腫瘍細胞株 QGP1 および膵癌細胞株 BxPC-3、Panc-1、MIAPaCa-2 を用い適切な条件下で培養継代した。

5) Real time RT-PCR: 各培養細胞より total RNA を抽出し total RNA より cDNA を合成した。cDNA を鋳型とし nectin に対する probe を使用し Real time RT-PCR を行った。

6) Western blotting: 各細胞株より全タンパク質を抽出し、Western blotting 法により各抗 nectin 抗体を用いて細胞株での nectin の発現について検討した。

7) Small interfering RNA (siRNA) による nectin-3 のノックダウン: BxPC-3 細胞を対象として siRNA により nectin-3 の発現をノックダウンした。

8) Cell proliferation assay: nectin-3 ノックダウン細胞を含む懸濁液を播種し、5% CO<sub>2</sub>、37 °C 下で 48 時間および 72 時間インキュベートし非ノックダウン細胞との細胞増殖率を比較した。

9) Wound healing assay: シート状に増殖し

た nectin-3 ノックダウン細胞集塊を、20 µL ピペットでスクラッチし直線状の創を形成した。6 時間、9 時間、12 時間後の創の回復率を非ノックダウン細胞と比較検討した。

10) Cell invasion assay: 基底膜マトリクスがコーティングされたチャンバーを用い、基底膜マトリクスに対する浸潤能を nectin-3 ノックダウン細胞と非ノックダウン細胞間で比較検討した。

11) Nectin-3 関連遺伝子の網羅的遺伝子解析: BxPC-3 より total RNA を抽出後、マイクロアレイによる網羅的解析を行った。Nectin-3 ノックダウン細胞と非ノックダウン細胞間で比較することにより nectin-3 に関連する遺伝子を探索した。

#### 4. 研究成果

切除検体での結果

1) 免疫組織化学: 正常ランゲルハンス島細胞は nectin-1 が陰性、nectin-2 が陰性または細胞膜および細胞質に淡く陽性、nectin-3 が細胞膜および細胞質に陽性、nectin-4 が陰性または細胞質に淡く陽性であった。PNEN では、nectin-2、nectin-3 で比較的高い発現が観察されたが、nectin-1 および nectin-4 の発現は低発現もしくは陰性であった。

2) 臨床病理学的検討: PNEN における nectin-3 の発現消失は、非機能性腫瘍、腫瘍径の大きな腫瘍、ki67 labeling index が高い腫瘍、WHO grade の高い腫瘍と関連があった。Nectin-1、nectin-2、nectin-4 の発現と臨床病理学的因子との関連は認められなかった。

培養細胞での結果

1) Real time RT-PCR: BxPC-3 は Panc-1、MIAPaCa-2、QGP1 と比較し nectin-1、nectin-2、nectin-4 の発現が相対的に高かった。Nectin-3 は BxPC-3、Panc-1、MIAPaCa-2 で発現がみられたが、QGP1 ではほぼ発現がみられなかった。

臨床病理学的検討では nectin-3 の発現低下と PNEN の悪性度との関連性が示唆された。しかしながら膵神経内分泌腫瘍細胞株である QGP1 が nectin-3 を発現していなかったため、膵癌細胞株である BxPC-3 を用いて追加の検討を行った。

2) Cell proliferation assay: Nectin-3 をノックダウンした BxPC-3 の 48 時間、72 時間後の細胞増殖能は、非ノックダウン細胞群と比較し有意に高かった。

3) Wound healing assay: Nectin-3 をノックダウンした BxPC-3 の 6 時間、9 時間、12 時

間後の創傷治癒能(遊走能)は、非ノックダウン細胞群と比較し有意に高かった。

4) Cell invasion assay: nectin-3 ノックダウン細胞と非ノックダウン細胞との間に、基底膜マトリクスに対する浸潤能に有意差はみられなかった。

5) 網羅的遺伝子解析: 非ノックダウン細胞よりも nectin-3 ノックダウン細胞で 2 倍以上の発現亢進がみられた遺伝子は 111 個、発現減弱があったのは 91 個であった。細胞接着または EMT に関与する分子に関しては、nectin-3 ノックダウン細胞では snail の発現亢進と E-cadherin の発現減弱が僅かに確認された。

現在、PNEN における Nectin-3 の発現について検討を行っている途中である。

#### 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 1 件)

Izumi H, Hirabayashi K, Nakamura N, Nakagohri T. Nectin expression in pancreatic adenocarcinoma: nectin-3 is associated with a poor prognosis. Surg Today、査読有、45 巻、2015、p.487-94.

[学会発表](計 2 件)

平林健一 他、浸潤性膵管癌における nectin-1 発現の検討、2015、第 104 回日本病理学会総会、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

和泉秀樹、平林健一 他、浸潤性膵管癌における細胞接着分子 Nectin1 の発現における臨床病理学的検討、2014、第 114 回日本外科学会、国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都(京都府京都市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

該当なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

平林 健一 (HIRABAYASHI, Kenichi)

東海大学・医学部・講師

研究者番号: 60514388

(2)研究分担者  
該当者なし

(3)連携研究者  
該当者なし