

184. 次世代プロテオミクスによる膵癌術前治療の効果予測法

神田 光郎

Key words : 膵癌, 化学放射線療法, 奏効度,
免疫学的細胞死, Carboxypeptidase N subunit 2

名古屋大学 医学部 消化器外科学講座

緒 言

膵癌は最も予後不良な固形癌であり, その予後を改善すべく根治を目指した拡大手術や術後補助化学療法が行われてきた。これまで膵癌に対する化学療法は Gemcitabine を中心とした術後補助化学療法が主流であったが¹⁾, 依然として予後不良なままであり 5 年生存率は 5~15% と低い。そこで近年, 術前化学放射線療法 (Neoadjuvant Chemoradiation Therapy: NACRT) が新しい膵癌治療として注目されている。我々は, 門脈浸潤等を有する Borderline resectable 膵癌症例に対して, 本邦臨床試験において術後補助療法での全生存期間が Gemcitabine を大きく上回った S-1 を用いた NACRT を 2010 年より開始している。現在, 膵癌の NACRT は国内外で多くの臨床試験が進行中であり, 膵癌治療の最大のトピックスである。しかし, その効果は一定ではなく, 著効例を認める一方で, 不応例や術前にある程度奏効しても早期に再発する例もあり, 適切な個別化治療の確立のための効果予測バイオマーカーの同定と, NACRT における腫瘍増殖抑制メカニズムの解明が不可欠である。

治療前効果予測バイオマーカーの幅広いスクリーニングに最適な検体は, 侵襲性や簡便性から考えると血清検体である。しかし, これを達成するためには血清中に含まれる無数の候補蛋白質の中からきわめて低濃度の蛋白質も検出し, 判定する必要がある。この問題を解決すべく, iTRAQ 法での網羅的解析と, 三連四重極型質量分析計 (QqQ 型 MS) を用いた高感度定量分析法である MRM 法によるターゲット・プロテオーム解析を組み合わせ, それぞれの長所を活かし, 従来のプロテオーム解析法では評価困難であった微量蛋白も含めた網羅的バイオマーカー探索を行った。

消化器系癌では, 食道癌において NACRT が国内外で普及しており, NACRT による腫瘍細胞死の機序の研究報告がある。従来は, 放射線療法は直接的に腫瘍細胞のアポトーシスとネクローシスを惹き起こすとされていたが, 近年放射線療法もしくは化学放射線療法が腫瘍の免疫原性細胞死を誘導しているという説が注目されている²⁾。しかし, 膵癌における NACRT による腫瘍細胞死の機序はいまだ不明である。

本研究の目的は, 定量的で高感度な次世代プロテオーム解析法を用いてスクリーニングに理想的な血清検体から新規バイオマーカーを同定することである。さらに, 同定された候補蛋白の発現と化学放射線療法によって誘導される免疫原性細胞死との関連を調べ, 膵癌細胞の NACRT による腫瘍細胞死の機序を解明することも目的とする。

方 法

1. 膵癌に対する NACRT の新規効果予測バイオマーカー検出

1) 血清検体および臨床データの収集

2) 次世代プロテオーム解析によるバイオマーカー候補蛋白の選定: NACRT 奏効例 4 例と無効例 4 例の治療前血清を用いて, まず iTRAQ 法で網羅的なプロテオーム解析を行った。蛋白発現結果をもとに, 奏効例と無効例において明確な発現量の差を認めた血清中蛋白群を抽出する。次に, iTRAQ 法により絞りこまれた蛋白群を対象に MRM 法によるターゲット・プロテオーム解析を行い, 質量の微量な蛋白も含めてより正確な定量的判定を行った。

3) 選定蛋白の発現解析: 収集された NACRT 前血清検体における蛋白発現量を ELISA 法によって調べ, iTRAQ 法と MRM 法によるプロテオーム解析の結果を確認した。次に, NACRT 奏効例, 無効例および非実施例のそれぞれにおい

て、NACRT 前、後、術後の血清で候補蛋白の発現分析を行い、治療過程における血清中の発現変化を調べた。さらに、発現度と生存期間、各種臨床病理学的因子との相関性を調べ、選定蛋白発現の臨床的意義を検証した。

2. NACRT による免疫原性細胞死の機序

1) 選定蛋白発現と NACRT による免疫原性腫瘍細胞死との関連性の検討；切除標本から得た切片を用いて、細胞性免疫マーカーである CD8 と Foxp3 の発現を免疫組織化学染色法によって調べる。さらに、この T 細胞浸潤度と選定蛋白の NACRT 前後の血清中発現レベルとの相関性を検討した。

2) 選定蛋白の免疫原性腫瘍細胞死の調節因子発現における役割；膀胱癌細胞株に対して、選定蛋白発現の siRNA 法によるノックダウンを行い、免疫原性細胞死調節因子である HMGB1 および calreticulin の発現がどのように変化するかを調べる。

結 果

1. 次世代プロテオーム解析によるバイオマーカー候補蛋白の選定；NACRT 著効例と無効例の治療前血清を用いて、iTRAQ 法による網羅的なプロテオーム解析を施行した。NACRT 著効例と無効例の間に有意な発現量の差を認めた血清蛋白が 103 種検出された。その中でも、Carboxypeptidase N subunit 2 (CPN2) は著効例における平均血清値が無効例の約 3 分の 1 と顕著な差を示していたため、有力な膀胱癌 NACRT 効果予測バイオマーカー候補に選定した（表 1）。

表 1. iTRAQ 法による血清中 CPN 蛋白量の比較

	著効例1/無効例		著効例2/無効例		著効例3/無効例	
	Value	P値	Value	P値	Value	P値
CPN2	0.1871	<0.001	0.1271	<0.001	0.7447	0.036

Carboxypeptidase N subunit 2 (CPN2) は NACRT 著効例における平均血清値が無効例の約 3 分の 1 と、顕著な低下を示していた。

次いで、CPN2 を対象に MRM 法によるターゲット・プロテオーム解析を行った。解析した 10 検体において、CPN2 の微量な症例も含め、著効例では無効例に比して血清中 CPN2 量は低値であることが確認された。

2. 周術期における血清中 CPN2 発現解析；20 例の患者から収集された NACRT 前血清検体における CPN2 の発現を ELISA 法によって調べることで iTRAQ 法と MRM 法によるプロテオミクスの結果を確認した。治療前の血清 CPN2 値を中央値で 2 群に分けて解析すると、治療前血清 CPN2 低値群の病理学的腫瘍壊死率は平均 62% であり、高値群の平均 36% より高かった。NACRT 前および術後の血清 CPN2 値と NACRT 治療効果や予後との相関性については 2 群間で差を認めなかった。

3. 組織中 CPN2 発現と免疫学的腫瘍細胞死；免疫組織化学染色により、組織中の CPN2 蛋白発現の分布を調べた。膀胱癌腫瘍細胞での CPN2 蛋白発現度と、腫瘍周囲組織への CD8 陽性細胞浸潤の度合いとの関連性が示唆された。VEGF および Foxp3 の染色度との間には明らかな関連性は認められなかった。

考 察

本研究では、これまでに報告のない膀胱癌 NACRT の効果予測バイオマーカーを血清中から同定することを目指した。血清検体は幅広くスクリーニング可能である上に、非侵襲的で簡便に採取できる理想的な検体である。これにより、治療前に NACRT の奏効例と不応例を選別する方法が提案されるため、膀胱癌患者の新たな治療法選択基準となりうる。つまり、S1 併用 NACRT の著効が期待される症例には NACRT を行い、また NACRT への抵抗性が予想される症例には手術先行治療を選択するなどの、個別化治療の選択が可能となる。

ポストゲノム時代において、ゲノム情報の最終産物であり生体内でさまざまな活性を有する蛋白質の全体像であるプロテオームを解析するシステムは、近年めざましい進歩を遂げている。iTRAQ 法は Isobaric tag によって修飾されたペプチドの MS/MS 解析におけるシグナル強度比からサンプル間の比較定量を網羅的に行う高スループット技術である³⁾。MRM 法は、三連四重極型質量分析計 (QqQ 型 MS) を用いた高感度定量分析法である⁴⁾。治療前効果予測バイオマーカーの幅広いスクリーニングに最適な検体は、侵襲性や簡便性から考えると血清検体であるが、血清中に含まれる無数の候補蛋白質の中からきわめて低濃度の蛋白質も検出し、判定する必要がある。本研究では、この問題を解決すべく、iTRAQ 法での網羅的解析と、三連四重極型質量分析計 (QqQ 型 MS) を用いた高感度定量分析法である MRM 法によるターゲット・プロテオーム解析を組み合わせを行った。これにより、NACRT 著効例と無効例の治療前血清において有意な差を認める CPN2 蛋白を効果予測バイオマーカーとして検出した。CPN2 は肝で合成される細胞外糖蛋白質であり、各種増殖因子およびサイトカインの活性化を調節するため⁵⁾、腫瘍細胞増殖や免疫への関与が注目されているが、膵癌における役割や NACRT 奏効度との関連性については調べられていない。治療前血清 CPN2 値は、病理学的に判定された主病変の壊死率と相関しており、有望なバイオマーカー候補であると考えられた。今後、さらなる症例の集積と長期間予後追跡により、血清 CPN2 値と長期予後および再発形式との関連性を明らかにしていく必要がある。

また、化学放射線療法が腫瘍の免疫原性細胞死を誘導しているという説が注目されており²⁾、本研究では CPN2 蛋白の発現と膵癌腫瘍細胞の免疫原性細胞死との関連性についても検討した。免疫組織化学染色法にて腫瘍部での CPN2 発現の弱い症例では、CD8 陽性細胞の腫瘍周囲への浸潤が強い傾向があり、CPN2 の組織中発現と免疫原性細胞死との間に関連性があることが示唆された。

本研究により同定された CPN2 蛋白は、最適な個別化治療提供のための診断的意義のみにとどまらないことが期待される。CPN2 蛋白の膵癌細胞の浸潤や増殖における機能解析を行っていくことで、発癌や腫瘍進展における役割が解明でき、さらには将来的に、膵癌における新規分子標的へと応用できる可能性がある。

共同研究者

本研究の共同研究者は、名古屋大学医学部消化器外科学講座の小寺泰弘および藤井 努である。

文 献

- 1) Oettle, H., Post, S., Neuhaus, P., Gellert, K., Langrehr, J., Ridwelski, K., Schramm, H., Fahlke, J., Zuelke, C., Burkart, C., Gutberlet, K., Kettner, E., Schmalenberg, H., Weigang-Koehler, K., Bechstein, W. O., Niedergethmann, M., Schmidt-Wolf, I., Roll, L., Doerken, B. & Riess, H. : Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA*, **297** : 267-277, 2007.
- 2) Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., Mignot, G., Maiuri, M. C., Ullrich, E., Saulnier, P., Yang, H., Amigorena, S., Ryffel, B., Barrat, F. J., Saftig, P., Levi, F., Lidereau, R., Nogues, C., Mira, J. P., Chompret, A., Joulin, V., Clavel-Chapelon, F., Bourhis, J., André, F., Delaloge, S., Tursz, T., Kroemer, G. & Zitvogel, L. : Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat. Med.*, **13** : 1050-1059, 2007.
- 3) Wiese, S., Reidegeld, K. A., Meyer, H. E. & Warscheid, B. : Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics*, **7** : 340-350, 2007.
- 4) Picotti, P., Bodenmiller, B., Mueller, L. N., Domon, B. & Aebersold, R. : Full dynamic range proteome analysis of *S. cerevisiae* by targeted proteomics. *Cell*, **138** : 795-806, 2009.
- 5) Keil, C., Maskos, K., Than, M., Hoopes, J. T., Huber, R., Tan, F., Deddish, P. A., Erdős, E. G., Skidgel, R. A. & Bode, W. : Crystal structure of the human carboxypeptidase N (kininase I) catalytic domain. *J. Mol. Biol.*, **366** : 504-516, 2007.