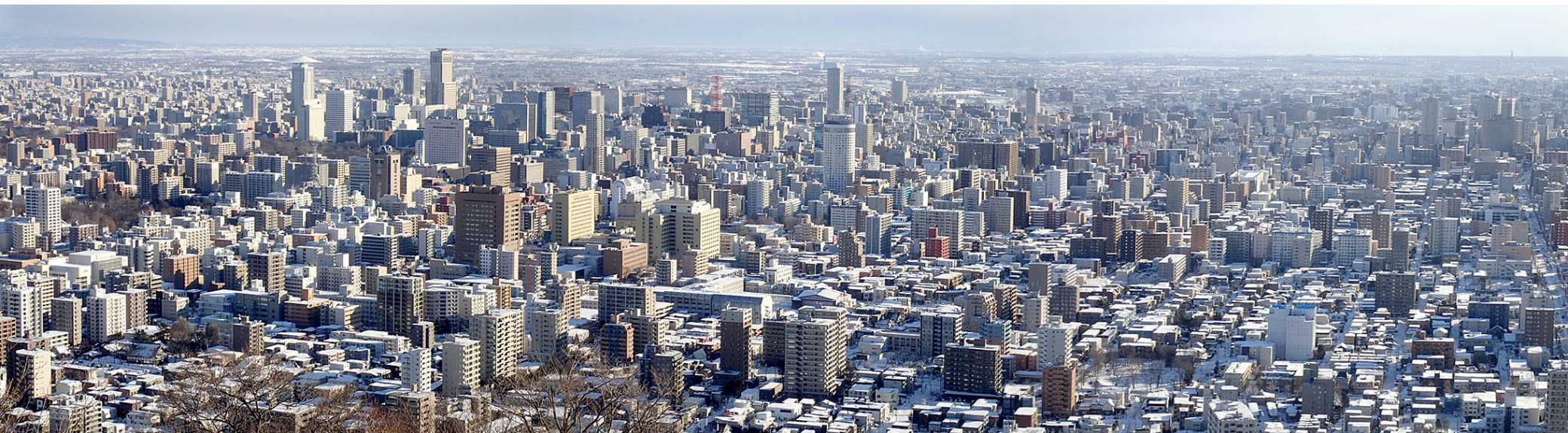


JST 新技術説明会

悪性末梢神経鞘腫(MPNST)の新規診断マーカー



札幌医科大学医学部 病理学第二講座

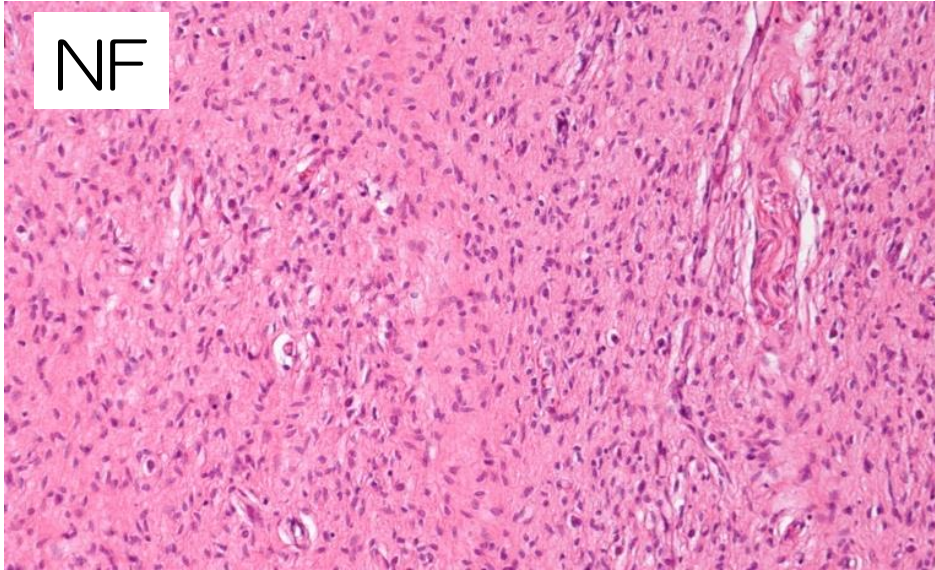
准教授 高澤 啓

悪性末梢神経鞘腫瘍 (MPNST)

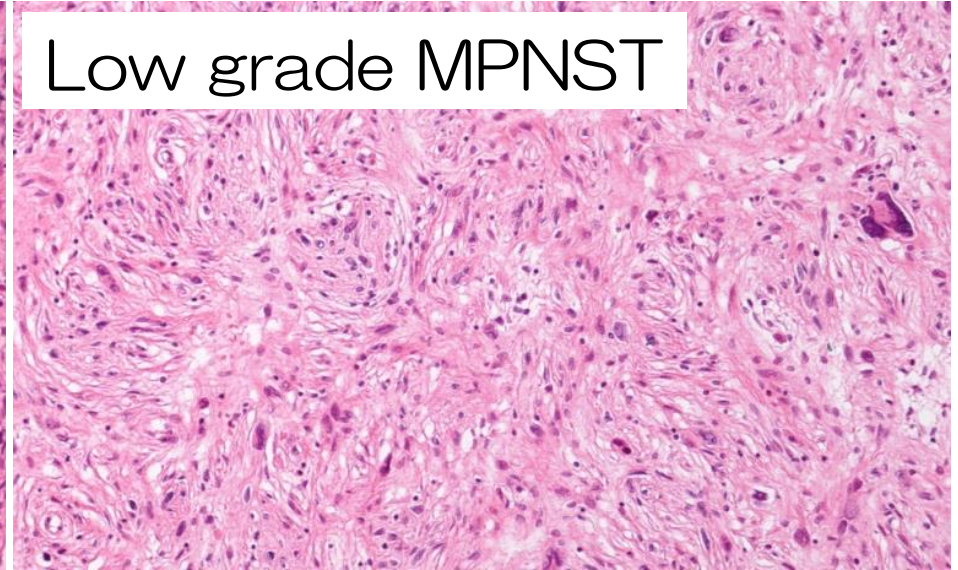
- ✓ 末梢神経の神経鞘から発生した悪性腫瘍(肉腫)
- ✓ 半数は神経線維腫症1型(NF1)患者に生じる神経線維腫(NF)から悪性転化
- ✓ 化学療法抵抗性で、5年生存率は40%前後と不良
- ✓ 分子標的薬を用いた新規治療法が模索されているが、良好な結果は得られていない。
- ✓ Failed trials
 - エルロチニブ：EGFRチロシンキナーゼ阻害 (2006)
 - イマチニブ：Bcr-Abl/KITチロシンキナーゼ阻害 (2009)
 - ソラフェニブ：マルチキナーゼ阻害 (2018)
- ✓ NFからMPNSTに転化する際、NF組織内に異型細胞が結節性に増加する領域が見られることがある
- ✓ Low grade MPNSTとAtypical NFとの鑑別は難しい

悪性末梢神経鞘腫瘍 (MPNST)

NF



Low grade MPNST



- ✓ 細胞密度、核異型、核分裂像など、組織学的所見の判定は観察者の主観によるところが大きく、観察者間の一致率は低い
- ✓ 最近、H3K27me3(ヒストンH3の27番目のリジン残基がトリメチル化されたもの)の発現欠損が、MPNST診断に有用との報告
 - 完全な欠損は半数程度であり、残る半数の判定は難しい
- ✓ 確定診断を補助する有用な診断マーカーが望まれる

FFPE組織標本

ホルマリン固定・パラフィン包埋(**FFPE**)は、最も一般的な**組織標本保存法**であり、病理組織診断に利用されている。

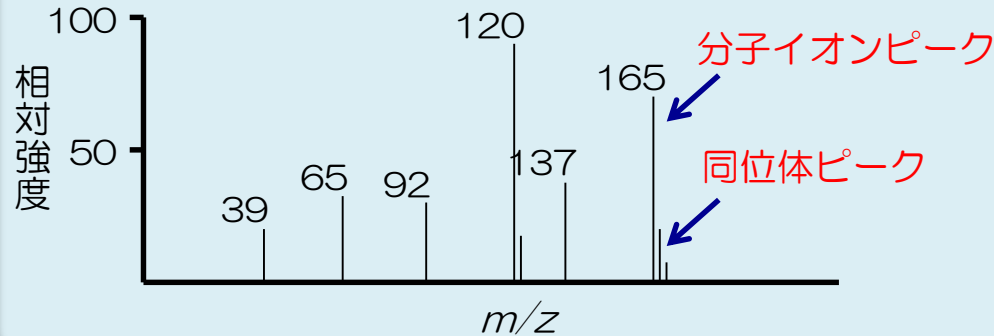


FFPE組織は**長期間にわたり保存可能**で、臨床病理学的特徴、検査データ、予後など**患者の詳細な情報**がタグ付けされている。

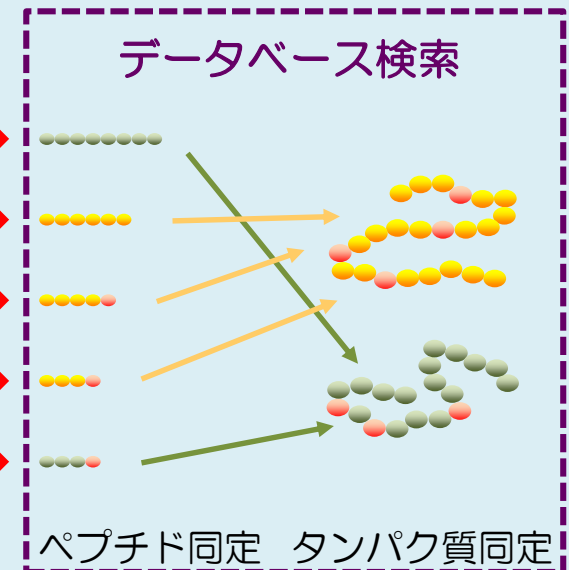
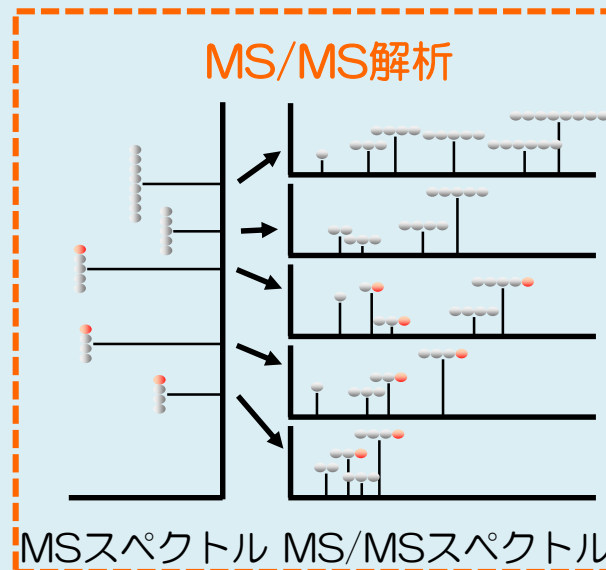
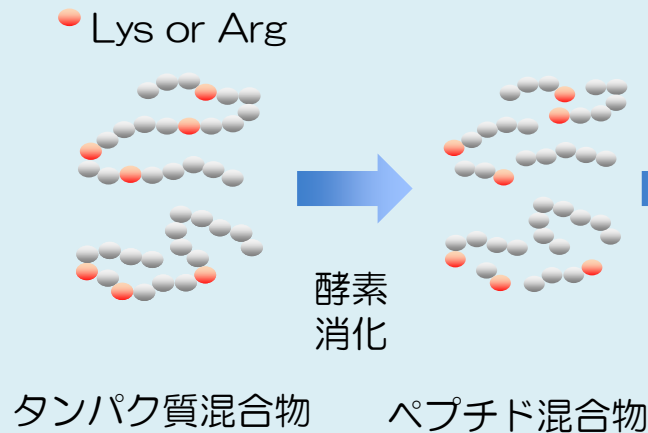
ホルマリン固定によりタンパク質の強固な架橋が形成されるため、FFPE組織は長期保存が可能になるが、質の高いタンパク質試料の抽出は困難となる。その結果、FFPE組織の利用は免疫染色に限られていた。しかし、近年の質量分析システムの進歩により、**FFPE組織を用いたプロテオーム解析が可能となった。**

質量分析によるプロテオーム解析

MS(質量)スペクトル



イオン化された試料を電氣的・磁氣的な作用で m/z (質量/電荷数比) に従って分離検出を行う機器分析法。得られた質量スペクトルから試料の定性情報が得られ、イオン量から試料の定量を行うことが可能である。

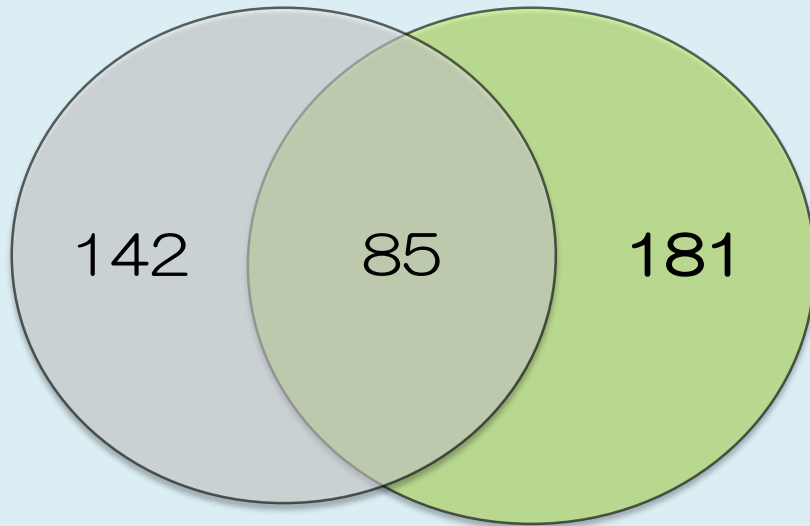


プロテアーゼ消化ペプチドを用い、高感度質量分析技術 (MS/MS解析) とデータベース検索から、タンパク質を網羅的に同定する。

高分化型脂肪肉腫と脂肪腫の比較プロテオミクス

同定されたタンパク質のベン図

Lipoma: 227 ALT/WDL: 266



脂肪滴の形成に関連する
Perilipin-1、脂肪代謝に関連する
FABP4が高分化型脂肪肉腫と脂肪腫から同定された。

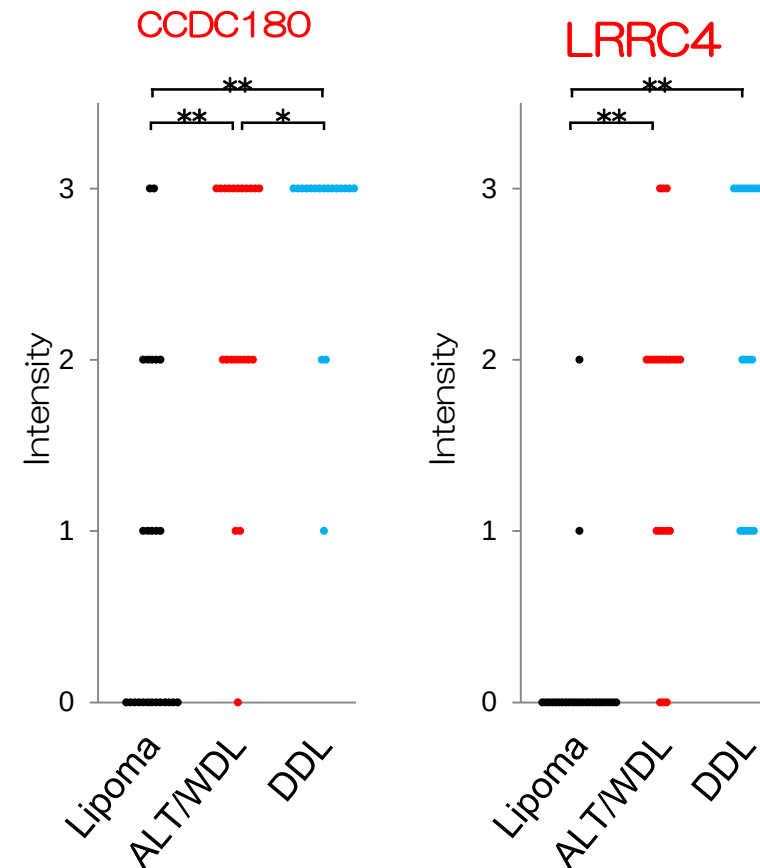
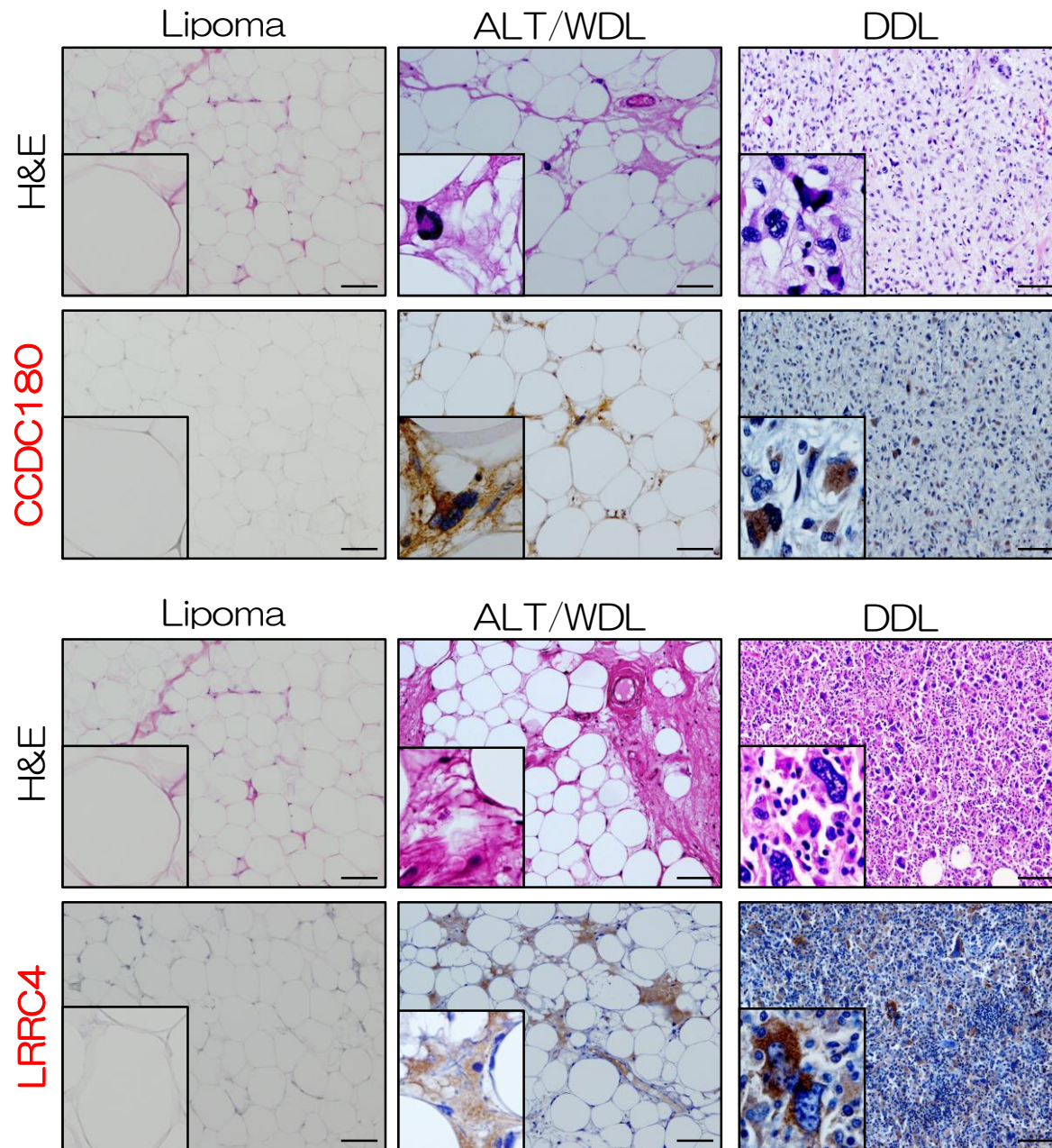
複数の高分化脂肪肉腫のみから
検出されたタンパク質

Chymase
TPSB2 protein
Putative beta-actin-like protein 3
IGL@ protein
High mobility group protein HMGI-C
Alpha-1-acid glycoprotein 1
Coiled-coil domain-containing protein 180 (CCDC180)
Apolipoprotein A1
Reticulon-3
Histone cluster 2 H3 pseudogene 2
Titin
Leucine-rich repeat-containing protein 4 (LRRC4)

Lipoma : 脂肪腫
ATL/WDL : 高分化型脂肪肉腫
DDL : 脱分化型脂肪肉腫

Aoyama T, Takasawa A, et al.
Am J Pathol (2019) 389.

脂肪細胞性腫瘍への診断マーカー候補の免疫染色



プロテオーム解析により高分化型脂肪肉腫で同定された**CCDC180**, **LRRC4**は高分化型脂肪肉腫、脱分化型脂肪肉腫で高発現していた。

- ✓ FFPE組織を用いた比較プロテオーム解析は、バイオマーカー探索、物質蓄積性の疾患の蓄積物同定に有用



本実験手法は、あらゆる疾患の病理診断や治療のターゲットとなるバイオマーカー探索に応用できる

特に、凍結標本が入手困難な希少疾患(希少がん)で果たす役割は大きいのでは？

目的

NFとMPNSTのFFPE組織を用いた比較プロテオーム解析を行い、バイオマーカーを探索し、その有用性を評価する

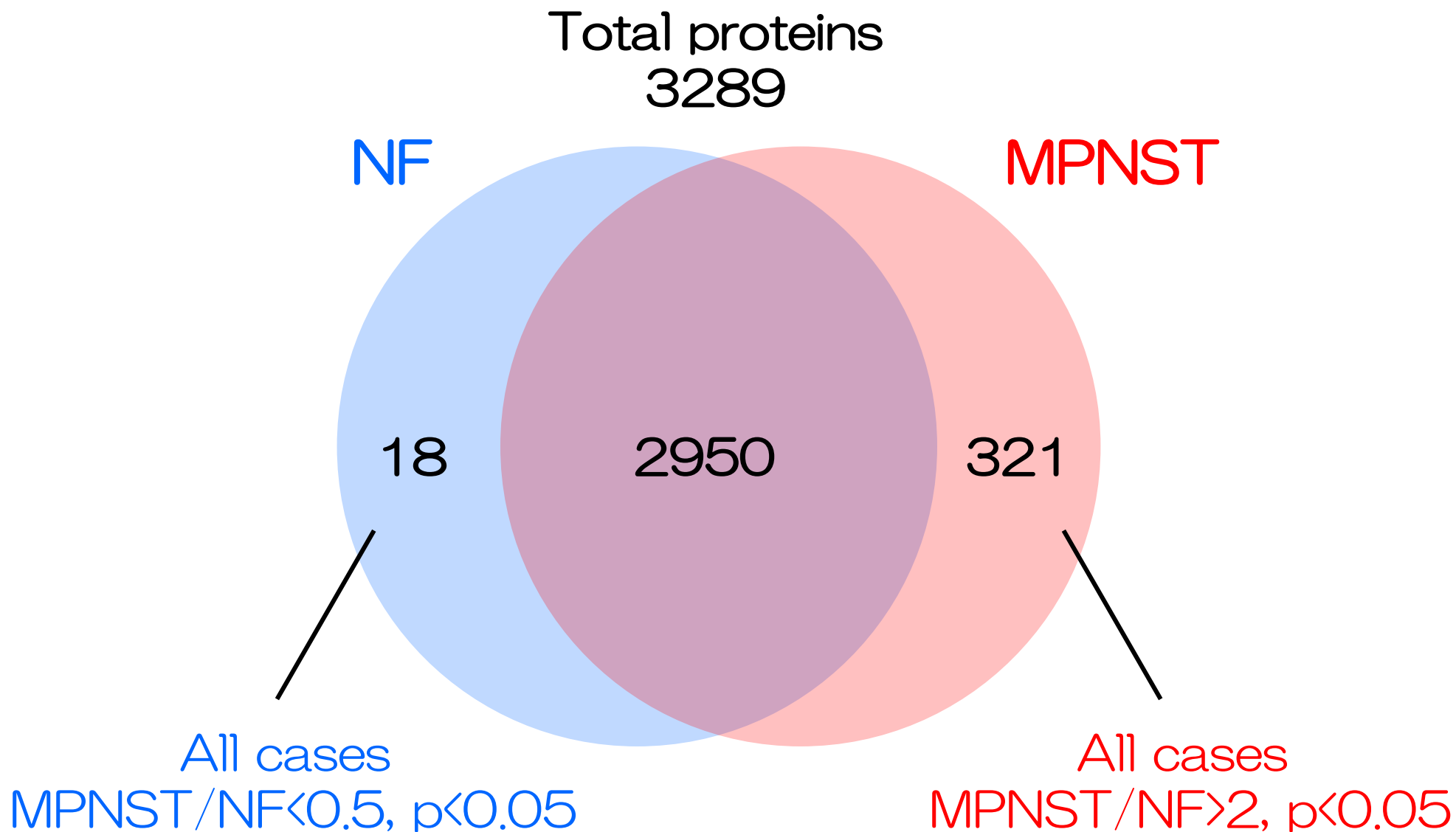
対象症例

NF1患者の病理組織：NFとMPNSTが含まれる病変

方法

病理組織から、NFとMPNSTを切り出し、比較プロテオーム解析を行う。診断マーカー候補の免疫組織化学を行う

プロテオーム解析データの概要



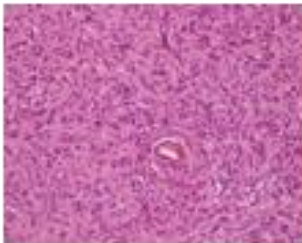
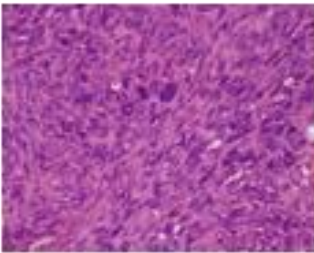
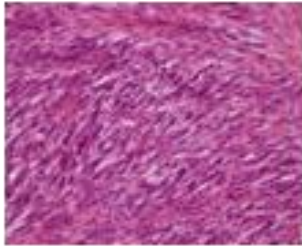
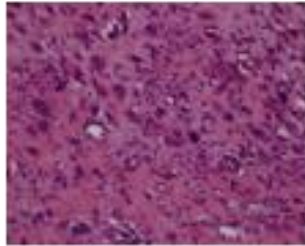
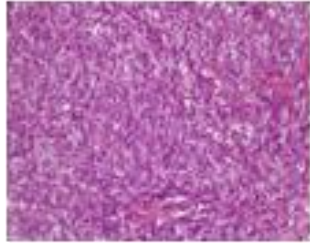
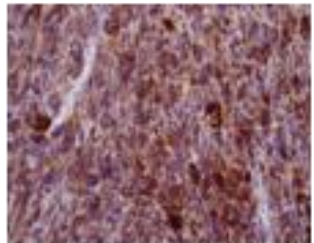
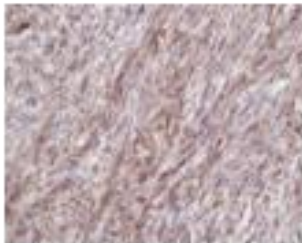
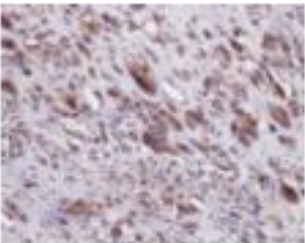
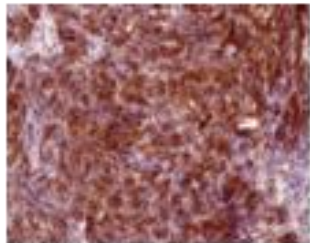
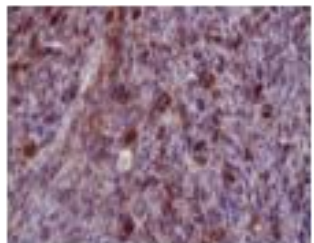
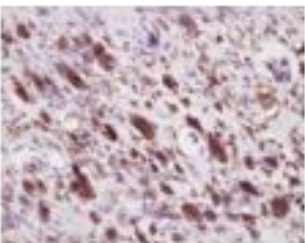
NFで未検出, MPNSTで検出されたタンパク質

	Abundances					
	神経繊維腫症 1 型			悪性末梢神経鞘腫		
	A	B	C	A	B	C
Protein A	0	0	0	6.29.E+06	1.67.E+07	2.02.E+07
Protein B	0	0	0	9.98.E+06	1.29.E+07	2.28.E+07
Protein C	0	0	0	1.35.E+07	1.62.E+07	2.02.E+06
Protein D	0	0	0	1.69.E+07	9.74.E+06	4.66.E+07
Protein E	0	0	0	4.21.E+07	6.18.E+06	1.69.E+07
Protein F	0	0	0	4.65.E+06	6.12.E+06	9.83.E+06
Protein G	0	0	0	1.71.E+06	3.79.E+06	2.38.E+06
Protein H	0	0	0	1.87.E+07	3.33.E+06	2.78.E+07
Protein I	0	0	0	8.19.E+06	3.93.E+06	1.83.E+07
Protein J	0	0	0	1.57.E+07	4.61.E+06	7.17.E+06
Protein K	0	0	0	1.97.E+07	2.38.E+06	8.36.E+06
Protein L	0	0	0	8.61.E+07	2.52.E+06	1.45.E+07
Protein M	0	0	0	1.21.E+07	2.21.E+06	1.09.E+07
Protein N	0	0	0	2.35.E+07	1.82.E+06	3.36.E+07
Protein O	0	0	0	3.77.E+07	1.96.E+06	3.10.E+07
Protein P	0	0	0	4.15.E+06	1.10.E+06	6.07.E+06
Protein Q	0	0	0	4.53.E+06	1.56.E+06	5.65.E+06
Protein R	0	0	0	6.30.E+06	1.46.E+06	2.66.E+06
Protein S	0	0	0	3.75.E+07	4.28.E+06	2.28.E+07

NFで未検出，MPNSTで検出されたタンパク質

		Abundances						
		神経繊維腫症 1 型			悪性末梢神経鞘腫			
		A	B	C	A	B	C	
	Protein A	0	0	0	6.29.E+06	1.67.E+07	2.02.E+07	
Q8WX93-1	PALLD Palladin, Cytoskeletal Associated Protein 4q32.3	0	0	0	9.98.E+06	1.29.E+07	2.28.E+07	
	Protein C	0	0	0	1.35.E+07	1.62.E+07	2.02.E+06	
	Protein D	0	0	0	1.69.E+07	9.74.E+06	4.66.E+07	
Q9Y6M1	IGF2BP2 Insulin Like Growth Factgor 2 mRNA Binding Protein 2 3q27.2	0	0	0	4.21.E+07	6.18.E+06	1.69.E+07	
↓ 抗IGF2BP2抗体，抗PALLD抗体を用いて，切除・生検材料に対して免疫組織化学を行った。		Protein F	0	0	0	4.65.E+06	6.12.E+06	9.83.E+06
		Protein G	0	0	0	1.71.E+06	3.79.E+06	2.38.E+06
		Protein H	0	0	0	1.87.E+07	3.33.E+06	2.78.E+07
		Protein I	0	0	0	8.19.E+06	3.93.E+06	1.83.E+07
		Protein J	0	0	0	1.57.E+07	4.61.E+06	7.17.E+06
		Protein K	0	0	0	1.97.E+07	2.38.E+06	8.36.E+06
		Protein L	0	0	0	8.61.E+07	2.52.E+06	1.45.E+07
		Protein M	0	0	0	1.21.E+07	2.21.E+06	1.09.E+07
		Protein N	0	0	0	2.35.E+07	1.82.E+06	3.36.E+07
		Protein O	0	0	0	3.77.E+07	1.96.E+06	3.10.E+07
		Protein P	0	0	0	4.15.E+06	1.10.E+06	6.07.E+06
		Protein Q	0	0	0	4.53.E+06	1.56.E+06	5.65.E+06
		Protein R	0	0	0	6.30.E+06	1.46.E+06	2.66.E+06
		Protein S	0	0	0	3.75.E+07	4.28.E+06	2.28.E+07

候補分子の免疫組織化学

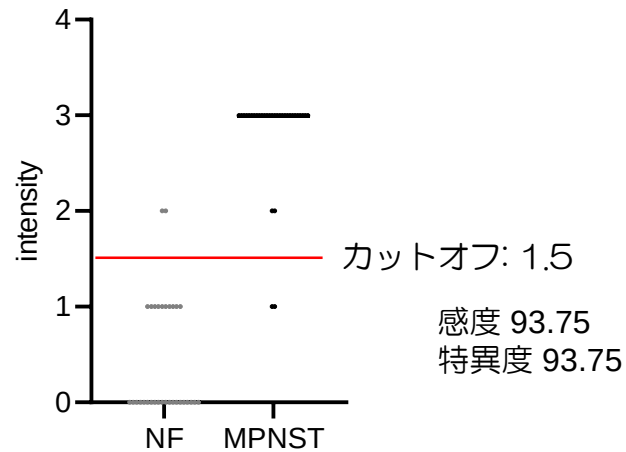
		MPNST				
		NF	1	2	3	4
HE						
PALLD						
IGF2-BP2						

NFと比較してMPNSTで、IGF2BP2, PALLDは高発現していた

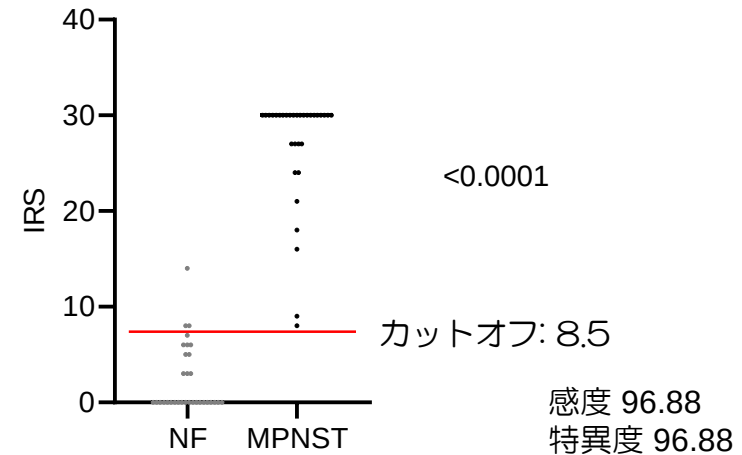
抗PALLD抗体による免疫組織化学のまとめ

ドットチャート

染色強度での比較

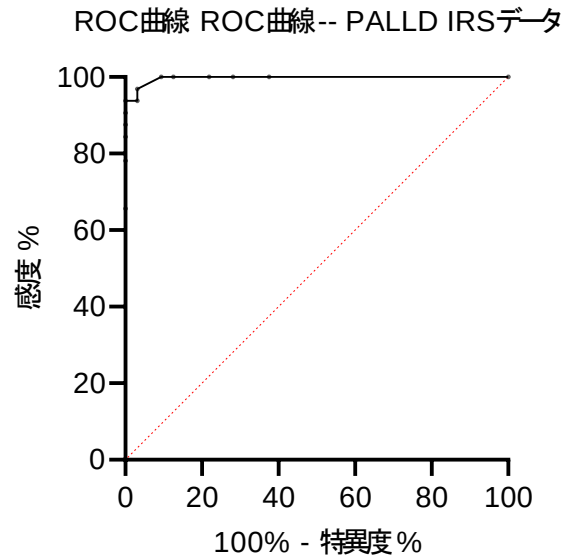
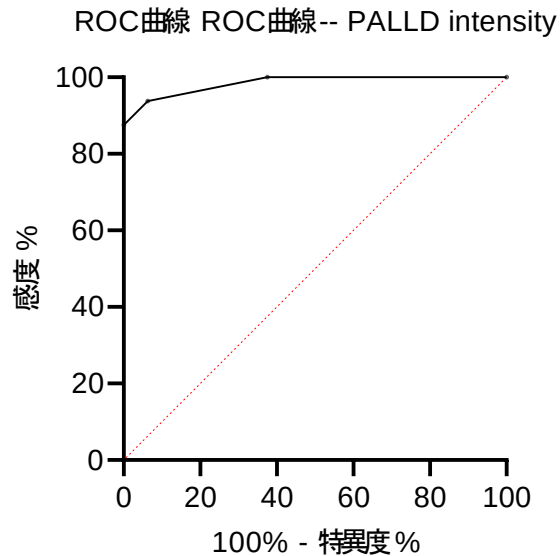


IRSでの比較



ROC曲線

AUC: 0.9844

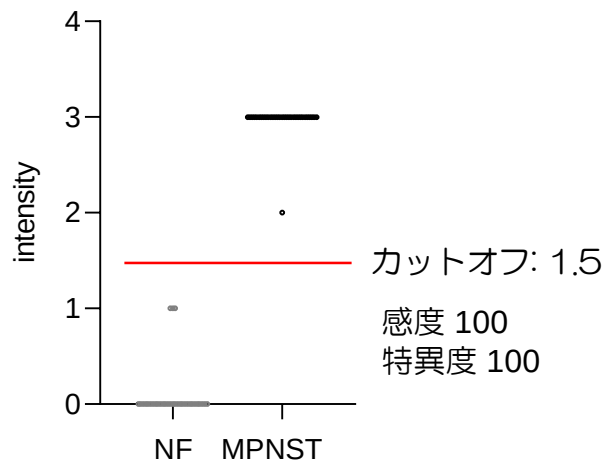


AUC: 0.9971

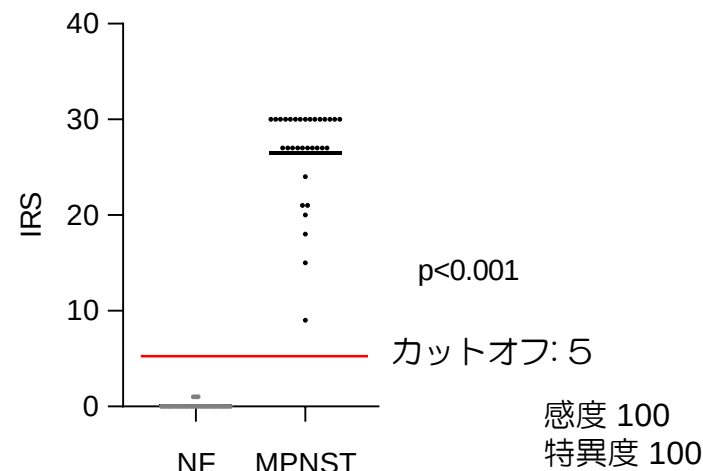
抗IGF2BP2抗体による免疫組織化学のまとめ

ドットチャート

染色強度での比較



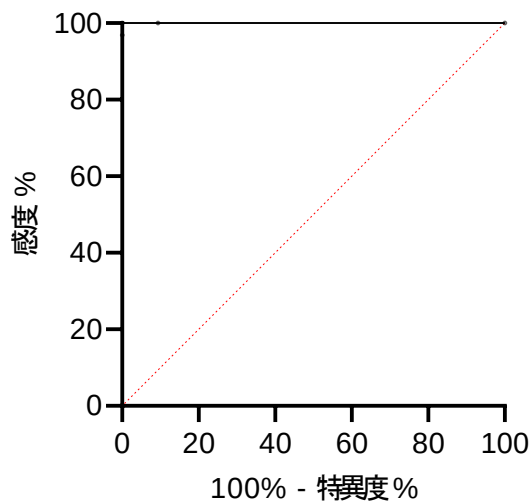
IRSでの比較



ROC曲線

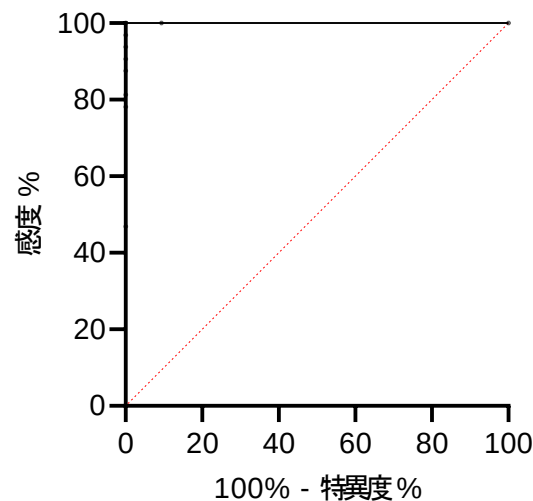
ROC曲線 ROC曲線-- IGF2BP2 intensity

AUC: 1.00



ROC曲線 ROC曲線-- IGF2BP2 IRSデータ

AUC: 1.00



想定される用途

- ✓ NFとMPNSTの鑑別マーカーとしての利用
- ✓ 血中マーカーとしての評価
- ✓ 増殖能や浸潤能などへの関与を前提とした治療標的としての可能性

実用化に向けた課題

- ✓ 今後、体外診断薬に適用していく場合の条件設定を行っていく
- ✓ 独自のモノクローナル抗体の作製と評価
- ✓ MPNST以外の希少疾患について臨床或いは実験データを取得し、個々の疾患における確定診断補助マーカー・治療標的創出技術としての実証実績を積み重ねていく

企業への期待

- ✓ 独自のモノクローナル抗体の作製と評価を担当いただける企業を求めています
- ✓ 様々な希少疾患について、診断マーカーや治療標的を探索している、または、探索と臨床利用への発展に興味を持たれている企業との共同研究など

発明の名称：悪性末梢神経鞘腫瘍の診断マーカー

出願番号：特願2020-186829

出願人：北海道公立大学法人札幌医科大学

発明者 高澤 啓、車野晃大、江森誠人、小山内 誠

お問い合わせ先

札幌医科大学

附属産学・地域連携センター

TEL 011-611-2111 (21570)

FAX 011-611-2185

e-mail chizai@sapmed.ac.jp