



Title	SEREX法による非機能性膵神経内分泌腫瘍に対するIgG 抗体型腫瘍マーカーの探索
Author(s)	本谷, 康二
Description	配架番号 : 2479
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13465号
Issue Date	2019-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13465
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74741
Type	doctoral thesis
File Information	Koji_Hontani.pdf



学 位 論 文

SEREX 法による非機能性膵神経内分泌腫瘍に対する
IgG 抗体型腫瘍マーカーの探索

(Identification of novel IgG type tumor marker in non-
functional pancreatic neuroendocrine tumors by
SEREX method)

2019 年 3 月

北 海 道 大 学

本 谷 康 二

学 位 論 文

SEREX 法による非機能性膵神経内分泌腫瘍に対する
IgG 抗体型腫瘍マーカーの探索

(Identification of novel IgG type tumor marker in non-
functional pancreatic neuroendocrine tumors by
SEREX method)

2019 年 3 月

北 海 道 大 学

本 谷 康 二

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
方法	8 頁
結果	16 頁
考察	29 頁
総括および結論	33 頁
謝辞	34 頁
利益相反	34 頁
引用文献	35 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Koji Hontani, Takahiro Tsuchikawa, Takaki Hiwasa, Toru Nakamura, Takashi Ueno, Toshihiro Kushibiki, Mizuna Takahashi, Kazuho Inoko, Hironobu Takano, Satoshi Takeuchi, Hirotoshi Dosaka-Akita, Masaki Kuwatani, Naoya Sakamoto, Yutaka Hatanaka, Tomoko Mitsuhashi, Hideaki Shimada, Toshiaki Shichinohe and Satoshi Hirano

Identification of novel serum autoantibodies against EID3 in non-functional pancreatic neuroendocrine tumors.

Oncotarget, 8 (63): 106206-106221, Published:2017 Dec 5

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 本谷康二、土川貴裕、高橋瑞奈、櫛引敏寛、中西喜嗣、浅野賢道、野路武寛、倉島庸、海老原裕磨、村上壮一、中村透、岡村圭祐、七戸俊明、日和佐隆樹、平野聡

SEREX 法による非機能性膵神経内分泌腫瘍に対する IgG 抗体型腫瘍マーカーの探索研究

第5回日本神経内分泌腫瘍研究会, 2017年9月2日・東京

要旨

【背景・目的】

非機能性膵神経内分泌腫瘍（NF-pNETs）は特定の症状を示さないため、しばしば進行期に診断される。本邦においては pNETs の診断補助を目的とし、保険収載された腫瘍マーカーは無く、新規腫瘍マーカーの同定が期待されている。現在、西欧諸国では pNETs の腫瘍マーカーとして Chromogranin A (CgA) が使用されているが、プロトンポンプインヒビターの使用による偽陽性化やソマトスタチン治療による偽陰性化など様々な影響因子が知られている。一般的に、従来の血清腫瘍マーカーは、血液中に分泌される抗原量を測定するため腫瘍ボリュームの少ない早期の段階では陽性所見を示しにくい。一方、癌患者の血中には様々な腫瘍関連抗原に対する IgG 型自己抗体が早期の段階から出現すると報告されている。本研究では、IgG 抗体型腫瘍マーカーの探索方法として serological analysis of cancer antigens by recombinant cDNA expression cloning (SEREX) 法に着目した。SEREX 法は、1995 年に Sahin らにより報告された遺伝子の網羅的探索方法であり、患者血清中の IgG 抗体が認識する抗原をスクリーニングすることにより、腫瘍抗原を迅速かつ大規模に探索することが可能である。今回、SEREX 法を用いて NF-pNETs の新規抗原を同定した。さらに、ELISA と比べ微量な血清から高感度で抗原抗体反応の検出を可能とする amplified luminescent proximity homogeneous immunosorbent assay (AlphaLISA) 法を用いて患者群および健常者群の血清抗体価を比較し、新規腫瘍マーカーとしての有用性を検討した。

【方法】

膵神経内分泌腫瘍3症例分の腫瘍組織から λ ZAP II cDNA ライブラリーを構築し、青白判定およびコロニーPCR によりライブラリーの力価を測定した。構築した膵神経内分泌腫瘍由来および正常精巣由来の λ ZAP II cDNA ライブラリーと NF-pNETs 患者の血清を用いて SEREX 法を施行し、抗原を単離した。シーケンスおよび BLAST による相同性検索により抗原の遺伝子を同定した後に GST 融合タンパクを精製した。SDS-PAGE およびウェスタンブロットティングを施行しタンパク精製を確認した。精製した抗原タンパクに対する NF-pNETs 患者および健常者（各 25 症例）の抗体価を AlphaLISA 法を用いて測定し、患者群で有意に高値であった抗体について、その抗体価と予後の関連を比較検討した。また、同症例に対して血清 CgA 値を測定し、同定した抗体型腫瘍マーカーとの診断精度の比較、および予後との関連を比較検討した。さらに、患者群で有意に高い抗体価を示した遺伝子について、正常膵組織と腫瘍組織での mRNA の発現を qRT-PCR により解析し、そのタンパク発現強度を免疫組織化学染色により解析して比較検討した。

【結果】

腫瘍組織から mRNA を抽出し、cDNA フェージライブラリーを構築した。青白判定およびコロニーPCR を施行した結果、ライブラリーの力価は約 1.65×10^6 pfu/mL と推定された。これは、同様の実験系において報告された cDNA ライブラリーのサイズと同等であった。SEREX 法及び相同性検索により 5 種の腫瘍抗原 (PTEN、EID3、EHD1、LGALS9、BRAP) を同定した。AlphaLISA 法による解析の結果、EID3 抗原に対する抗体力価が患者群で有意に高値であった (患者群 7.034 ± 3.390 対 健常者群 3.477 ± 2.289 , $P = 0.0005$)。ROC (Receiver Operating Characteristic) 曲線により NF-pNETs 診断における抗 EID3 抗体の診断精度を解析し、AUC (Area Under the Curve) の値は 0.784 と中等度の診断精度であることが判明した。cut off 値を健常者の抗 EID3 抗体力価の平均値 + 2SD で設定した場合、診断感度は 40%であり、特異度は 92%であった。患者群を抗 EID3 抗体陽性群・陰性群の2群に分け予後解析を施行した結果、全生存率は両群で有意差を認めなかったが、無病生存期間は抗 EID3 抗体陽性群で有意に短いことが示された ($p = 0.0436$)。同様に、患者群を血清 CgA 値により2群に分けて予後解析を施行した結果、血清 CgA 値と Overall survival (OS) および Disease free survival (DFS) との間に有意差はなかった。抗 EID3 抗体力価と血清 CgA 値の相関解析の結果では、両者間に相関を認めた ($r = 0.411$, $p = 0.041$, Pearson の相関係数)。また、qRT-PCR によって EID3 の遺伝子発現を調べた結果、全ての症例において正常脾臓組織よりも NF-pNETs において発現が高かった (Paired t 検定、 $p = 0.0288$)。さらに、免疫組織化学染色の結果、正常組織と比べ腫瘍組織で EID3 のより高い発現を認めた。タンパク発現の程度で対象例を 2 群に分け、両群間の臨床病理学的特徴の差を調べたところ、EID3 タンパク発現と臨床病理学的特徴との間に有意な関連性はなかった。さらに、これら 2 群の生存分析から、EID3 タンパク発現と OS および DFS との間に有意な関連性を認めなかった。

【考察】

本研究では、pNETs に対する腫瘍マーカーを探索するにあたり、IgG 抗体型の腫瘍マーカーに着目して研究を開始した。抗体型マーカーを探索する方法としてはプロテインアレイ法、および本研究で施行した発現クローニング法/SEREX 法の2種類の方法があり、プロテインアレイ法は約 9000 種類の抗原を短期間で検索可能だが、欠点としてコストが非常に高いことや、検索できる抗原タンパクの種類に制限があることが挙げられる。一方で、SEREX 法では cDNA ライブラリーの作成や手技が煩雑なことから労力を要するが、低コストであり一度のスクリーニングで約 10 万抗原の検索が可能である。そこで、本研究では SEREX 法を選択しスクリーニン

グを施行した。その結果、5つの腫瘍抗原（PTEN, EID3, EHD1, LGALS9, BRAP）を同定することが可能であり、患者群で有意に高値であった抗 EID3 抗体について解析をすすめた。

EID ファミリーには EID1, EID2, EID3 の3種が同定されている。共通の機能として過剰発現系にて細胞分化を阻害することや、癌抑制遺伝子産物である retinoblastoma (RB) タンパクと細胞内で複合体を形成することが報告されており、その結果として腫瘍形成に寄与する可能性があることが報告されている。pNETs においては、RB タンパクは Cdk4 の高発現によるリン酸化により不活性化されていると報告されており、その結果、EID3 タンパクの発現増加を引き起こしている可能性がある。実際、本研究において免疫組織化学染色により NF-pNETs 組織における EID3 タンパクの高発現を示しており、上記のメカニズムによって NF-pNETs の腫瘍形成と関連し得ることを示唆している。

腫瘍マーカーは、臨床的に補助診断や再発のモニタリング、予後予測等を目的に用いられており、本研究においても血清抗 EID3 抗体の腫瘍マーカーとしての有用性を検討した。まず、補助診断としての有用性を検討するため、患者群および健常者群間の血清抗 EID3 抗体力価を AlphaLISA 法により測定し、比較検討した。その結果、NF-pNETs 診断における血清抗 EID3 抗体の感度および特異度は CgA を腫瘍マーカーとした既報の結果とも遜色ないものであった。また、CgA は早期病変では陽性率が低く早期検出に適していないが、IgG 型腫瘍マーカーは免疫応答により抗原の発現量が比較的少なくても血清中の抗体濃度が上昇することから、早期の検出に適しているとされる。したがって、血清抗 EID3 抗体は NF-pNETs の早期検出による再発のモニタリングにおいても使用できる可能性がある。

予後予測としての有用性を検討するため、NF-pNETs 患者の生存予後と抗 EID3 抗体力価の関連を評価した。その結果、より高い血清抗 EID3 抗体力価がより短い DFS と関連することが示されたことから、血清抗 EID3 抗体力価は、術前に NF-pNETs の予後を予測するための有用なバイオマーカーである可能性が考えられる。

【結論】

SEREX 法により5つの NF-pNETs 抗原候補（PTEN, EID3, EHD1, LGALS9, BRAP）を同定した。EID3 に対する抗体力価は、健常者と比較して NF-pNETs 患者において有意に高値であり、さらに NF-pNETs 患者の DFS と関連することから、NF-pNETs の腫瘍マーカーとして利用できる可能性が示唆された。

略語

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

alphaLISA	amplified luminescent proximity homogeneous immunosorbent assay
AUC	area under curve
BLAST	basic local alignment search tool
BRAP	BRCA1 associated protein
CgA	chromogranin A
CI	confidence interval
DFS	disease free survival
EHD1	EH domain containing 1
EID3	EP300 interacting inhibitor of differentiation 3
GST	glutathione S-transferase
HD	healthy donors
IPTG	Isopropyl β -thiogalactopyranoside
LGALS9	galectin 9
NCBI	national center for biotechnology information
OS	overall survival
pNETs	pancreatic neuroendocrine tumors
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RB	retinoblastoma
ROC	receiver operating characteristic
SEREX	serological identification of antigens by recombinant cDNA expression cloning
TACE	transcatheter arterial chemoembolization
WHO	world health organization

緒言

膵神経内分泌腫瘍 (pancreatic neuroendocrine tumors: pNETs) は、神経内分泌細胞に由来する比較的まれな腫瘍であるが、近年、罹患数が世界的に増加傾向にあることから注目を集めている (Ito et al., 2015; Yao et al., 2008)。pNETs は、ホルモン産生症状のある機能性 pNETs (functional pNETs: F-pNETs) とホルモン産生症状のない非機能性 pNETs (non-functional pNETs: NF-pNETs) に大別され、前者では insulinoma における低血糖症状、gastrinoma における上部消化管潰瘍等の特異的な症状により早期に診断されることが多いが、後者には特異的な症状がないため、約 30% の症例において他臓器転移を伴う進行した状態で診断される。治療に関しては、腫瘍増大速度が膵臓癌に比して比較的緩徐であるため、原発巣、転移巣ともに切除が治療の第一選択であるが、15~20% の根治手術症例において肝転移再発がみられ、分子標的薬を中心とした集学的治療を要する (Mosli et al., 2012; Touzios et al., 2005)。また、診断において、本邦では使用可能な腫瘍マーカーが確立されておらず、再発のスクリーニングおよび抗腫瘍療法の有効性の評価は、主に CT 等の画像診断により行われているのが現状である。

現在、西欧諸国では pNETs の腫瘍マーカーとして Chromogranin A (CgA) が使用されているが、様々な影響要因が知られている。例を挙げると、炎症、慢性膵炎、膵臓癌、腎不全、心不全、プロトンポンプインヒビターの使用により偽陽性が起き、ソマトスタチン治療により偽陰性が起きる可能性がある (Gut et al., 2016; Modlin et al., 2015; Mosli et al., 2012)。したがって、新規 pNETs マーカーを探索することは喫緊の課題である。

一般的に腫瘍マーカーは、癌細胞から直接産生されるものと、癌細胞に対する生物学的反応として産生されるものの 2 つに大きく分けられる。前者には癌細胞から分泌されるホルモンや癌由来タンパク等が挙げられ、一般的には腫瘍量に比例して発現するため小型病変や早期病変では大部分が陰性となる。一方、後者の代表である IgG 抗体型腫瘍マーカーは、腫瘍抗原に対する免疫反応により血中に IgG 抗体が出現するため、腫瘍量が少ない小型病変や早期病変でも検出できるという特徴を持つ (Modlin et al., 2015)。

本研究では、IgG 抗体型腫瘍マーカーの探索方法として SEREX (Serological identification of antigens by recombinant cDNA expression cloning) 法に着目した。SEREX 法は、1995 年に Sahin らにより報告された遺伝子の網羅的探索方法であり、患者血清中の IgG 抗体が認識する抗原をスクリーニングすることにより、腫瘍抗原を迅速かつ大規模に探索することが可能である。現在までに、SEREX 法

は多くの腫瘍抗原の同定に寄与しており (Li et al., 2004)、スクリーニングの対象として、腫瘍組織由来の cDNA ライブラリーと、正常精巣組織由来の cDNA ライブラリーが報告されている (Chen et al., 1997; Monji et al., 2004; Sahin et al., 1995; Türeci et al., 1998)。腫瘍由来 cDNA ライブラリーのスクリーニングにより同定された代表的腫瘍抗原として p53 抗原が挙げられるが、それに対する IgG 抗体を腫瘍マーカーとする検出系は表在型食道癌およびステージ I 結腸・直腸癌を高い検出感度 (約 40.0%) で検出することから、この検出系を利用した ELISA kit (MESACUP anti-p53 Test[®]) が既に開発され臨床応用されている (Müller et al., 2006; Park et al., 2011; Scanlan et al., 1998; Takahashi et al., 2007; Zhang et al., 2012)。一方、精巣 cDNA ライブラリーのスクリーニングからは、食道癌関連抗原である NY-ESO-1 のような癌精巣抗原が同定されている (Chen et al., 1997)。両方のライブラリーをスクリーニングすることで、臨床的 IgG 型腫瘍マーカーを見出す可能性も高まると考えられる。

本研究では、NF-pNETs の新規腫瘍抗原を SEREX 法で同定し、それらの抗原に対する血清中の抗体価を患者群と健常者群で比較することで、新規腫瘍抗原に対する IgG 抗体型腫瘍マーカーの有用性を検討することを目的とする。

実験方法

1. 組織および血液検体と患者背景

腫瘍由来 cDNA ライブラリーの構築には、北海道大学病院消化器外科 II で切除された NF-pNETs の検体 3 例を用いた。SEREX スクリーニングおよび AlphaLISA には、北海道大学病院消化器外科 II および共同研究施設（北海道大学病院消化器内科、手稲溪仁会病院、北海道消化器科病院）において 2009 年から 2016 年の期間に NF-pNETs と診断された 25 例の患者から採取した血液検体を使用した。各患者の病期は、欧州神経内分泌腫瘍学会（European Neuroendocrine Tumor Society: ENETS）の TNM 分類に従って分類した（Rindi et al., 2007）。腫瘍の分化度は、2010 年の World Health Organization (WHO) Grading system (Hijioka et al., 2014; Klimstra et al., 2010)に基づいて分類した。25 例のうち 20 例が R0 根治手術（切除断端に腫瘍の遺残を認めない根治手術）を受け、そのうち 3 例は経過観察中に肝転移再発を認めた。残りの 5 例は手術不能症例であり、化学療法、分子標的薬、ソマトスタチンアナログ、および経カテーテル動脈化学塞栓術（transcatheter arterial chemoembolization: TACE）を適宜受けていた。性別および年齢に適合した 25 例の健康なドナー（healthy donors: HD）を健常対照とした。腫瘍組織および血清は-80℃で保存した。本研究は、全ての対象症例からインフォームドコンセントを得ており、また、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認を得たものである（承認 No. 015-0182）。

2. λ ZAP II cDNA ライブラリーの構築

腫瘍組織から TRIzol® Reagent (ThermoFisher scientific, Waltham, MA, USA) を用いて Total RNA を抽出し、Oligotex TM-dT30 <Super> mRNA 精製キット (Takara Bio, Kusatsu, Japan) を用いて messenger RNA を精製した。cDNA ライブラリー構築キット (Takara Bio, Kusatsu, Japan) を用いて cDNA ライブラリーを構築し、EcoRI と XhoI で二重消化した後、 λ ZAP II vector の EcoRI-XhoI 部位に Lambda ZAP II Undigested Vector Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いてライゲーションした。Gigapack III Gold packaging extracts (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いてライゲーション産物をファージへとパッケージングした。その後、青白判定およびコロニーPCR によりライブラリーの力価を測定した。青白判定では cDNA が λ ZAP II vector 内に挿入されなかった場合、 β -Galactosidase が発現し基質である Xgal の分裂により青色を呈するが、挿入されている場合は β -Galactosidase が発現せず白色となるため cDNA の挿入が確認可能である。さらに、白色コロニーを無作為に 27 個ピックアップ

プし、 λ ZAP II vector のクローニング部位である EcoRI-XhoI 配列をプライマーとして PCR を施行し、電気泳動することで、適切なサイズの cDNA が挿入されていることを確認した。

Construction of λ ZAPII cDNA library

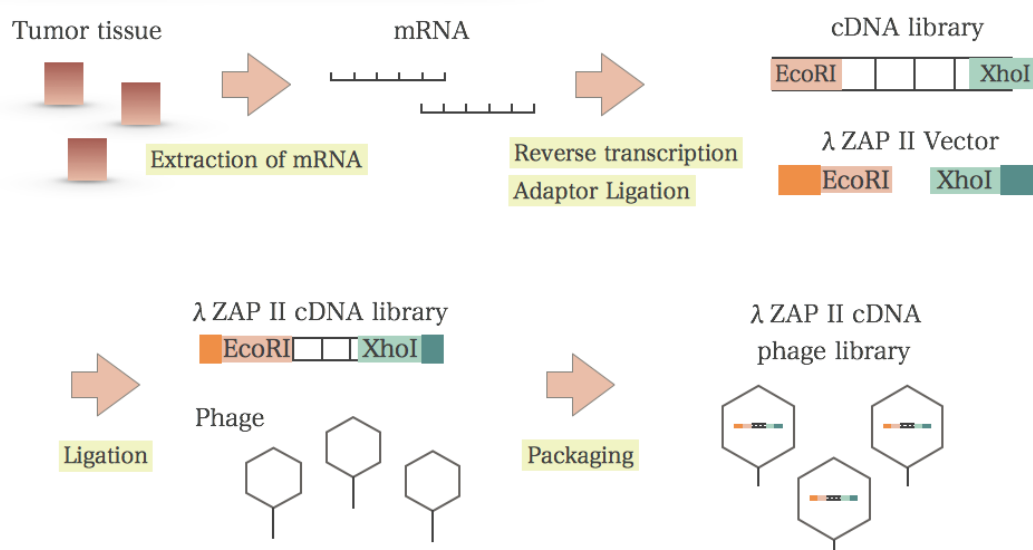


図 1 NF-pNETs 腫瘍組織由来の λ ZAP II cDNA ライブラリーの作成

腫瘍組織より messenger RNA を抽出して cDNA ライブラリーを作成後、 λ ZAP II vector にライゲーションすることで λ ZAP II cDNA ライブラリーを作成した。

3. SEREX 法による腫瘍抗原の探索

既報 (Sahin et al., 1995) に従って作成した cDNA ライブラリーおよび市販のヒト精集 cDNA ライブラリー (Uni-ZAP XR Premade Library®: Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を SEREX 法によりスクリーニングした。まず、大腸菌 (XL1-Blue MRF') に λ ファージを 2×10^4 pfu/plate になるよう感染させ、直径 15 cm の NZY プレート上でプラークが現れるまで 4~5 時間培養した。次に Isopropyl β -thiogalactopyranoside (IPTG) に 30 分間浸したニトロセルロースメンブレンを NZY プレート上に置いて 37°C で 2 時間培養することで発現した cDNA ライブラリーがコードするタンパク質を、ニトロセルロースメンブレンに転写した。ニトロセルロースメンブレンを TBS-T [0.05% Tween-20, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)] で 3 回洗浄した後、1% BSA を含む TBS 溶液中で 1 時間ブロッキングを行った。続いて、ニトロセルロースメンブレンを、1% BSA を含む TBS 溶液で 2000 倍に希釈した患者血清 (一次抗体) と 1 時間反応させ、TBS-T で 3 回洗浄後、5000 倍に希釈した二次抗体、すなわち、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト

IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) と反応させた。最後に、アルカリホスファターゼ発色液[0.3 mg/mL nitro blue tetrazolium, 0.15 mg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl (pH 9.5)]をメンブレンに反応させた。血清中の抗体と強く反応したことを示す濃い紫色を呈した陽性プラークをピックアップし、そのプラークを用いて同様のスクリーニングをさらに 2 回繰り返すことによりファージクローンを単離した。

SEREX screening

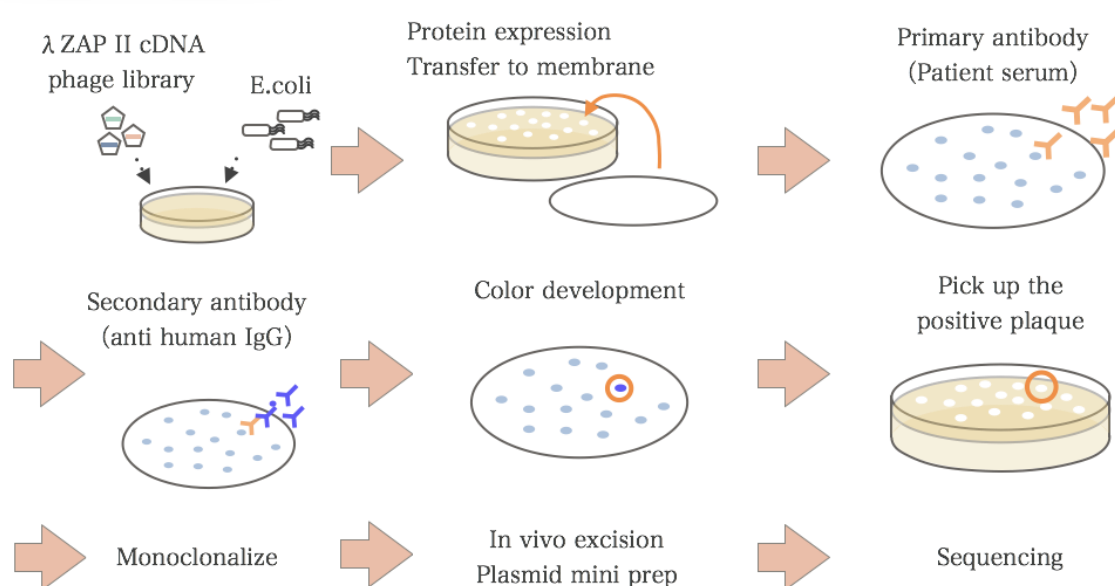


図 2 SEREX 法による腫瘍抗原の探索

患者血清を用いて cDNA ライブラリーをスクリーニングすることで腫瘍抗原を探索した。

4. シークエンシングおよび Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 検索による抗原遺伝子の同定

大腸菌 SOLR 株に単離した λ ファージクローンと ExAssist ヘルパーファージを共感染させ、in vivo excision により pBluescript ファージミドに変換した。GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いてプラスミド DNA を精製し、ABI PRISM 3130-Avant Genetic Analyzer を用いてプラスミド DNA の配列を決定した。決定した配列を BLAST を用いて National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースと照合し、抗原遺伝子を同定した。

5. 同定した各抗原遺伝子産物の glutathione S-transferase (GST) 融合タンパク質の作成

同定した抗原遺伝子の配列内に EcoRI および XhoI 配列が存在するか否かにより、異なる方法で GST 融合タンパク質を作成した。

同定した抗原遺伝子の配列内に EcoRI および XhoI 配列が存在しなかった場合は、プラスミド DNA を EcoRI および XhoI で二重消化後にアガロースゲル電気泳動を行って抗原遺伝子を分離し、GeneElute™ Minus EtBr SPIN COLUMNS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いて精製したものを、DNA ライゲーションキット Mighty Mix (Takara Bio, Kusatsu, Japan) を用いて EcoRI と XhoI で二重消化した pGEX 4T ベクターにライゲーションした。一方、同定した抗原遺伝子の配列内に EcoRI または XhoI 配列が含まれる場合は、その cDNA 断片を In-Fusion HD Cloning システム (Takara Bio, Kusatsu, Japan) を用いて pGEX 4T ベクターに挿入した。

抗原遺伝子を GST 融合タンパク質として発現する pGEX ベクターを ECOS™ コンピテント *E.coli* BL21 (NIPPON GENE, Tokyo, Japan) に形質転換した。50 μ g/mL アンピシリンを含む LB プレートにて組換え体のセレクションを行い、単コロニーをピックアップした。組換え体の塩基配列を確認し、適切な遺伝子組換え体を有している大腸菌 BL21 を 0.5 mM の IPTG と共に 25℃で 4 時間インキュベートすることにより、GST 融合タンパク質の発現を誘導した。GST 融合タンパク質を GSTrap FF カラム (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) で精製し、Amicon Ultra 15 (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) を用いて緩衝液を Phosphate buffered saline と交換した。

Construction of recombinant GST fusion protein

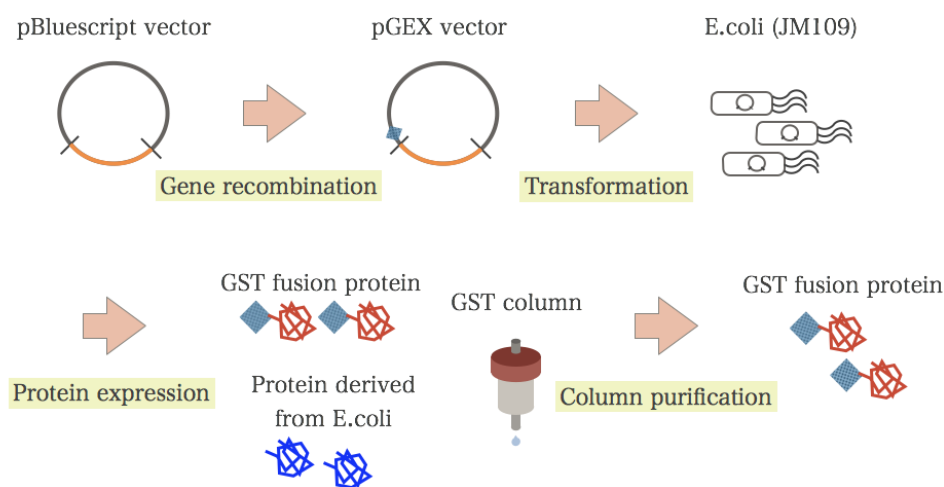


図 3 GST 融合蛋白の精製

同定した各抗原遺伝子を pGEX ベクターに組み込み GST 融合タンパクの精製を行った。

6. SDS-PAGE およびウェスタンブロットティング

SDS 緩衝液に溶解した各 GST 融合タンパク質を 100℃で 3 分間処理後、15% アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行い、クマシーブルー染色にてタンパク質の精製を確認した。ウェスタンブロットティングの一次抗体として、抗 PTEN 抗体 (Origene Technologies, Rockville, MD, USA)、抗 EID3 抗体 (Abcam, Cambridge, UK)、抗 EHD1 抗体 (Abcam)、抗 BRAP 抗体 (Abnova, Taipei, Taiwan)、抗 LGALS9 抗体 (GeneTex, Los Angeles, CA, USA) および抗 GST 抗体 (Rockland, Gilbertsville, PA, USA) を用いた。各一次抗体の希釈濃度を表 1 に示す。

表 1 ウェスタンブロットティングで使用した抗体

Molecule	Clonality	Dilution	Manufacture
PTEN	Mouse monoclonal	1:2000	Origene
EID3	Rabbit polyclonal	1:1000	Abcam
EHD1	Rabbit monoclonal	1:1000	Abcam
LGALS9	Rabbit polyclonal	1:1000	GeneTex
BRAP	Rabbit polyclonal	1:250	Abnova

7. AlphaLISA による解析

患者群および健常者群における各候補抗原に対する血清抗体力価を AlphaLISA を用いて比較検討した。まず、AlphaLISA Immunoassay Buffer (Perkins Elmer, Waltham, MA, USA) で 100 倍に希釈した血清と、10 μ g/mL に希釈した GST タンパク質または各 GST 融合タンパク質を、それぞれ 2.5 μ L ずつ 384 ウェルマイクロタイタープレート (Perkin Elmer) に入れて混合し、3 時間室温にて反応させた。次に、抗ヒト IgG アクセプタービーズ (40 μ g/mL、2.5 μ L/well) およびグルタチオンドナービーズ (40 μ g/mL、2.5 μ L/well) を加えて 14 日間反応させた。反応により生じた Alpha 信号を EnSpire Alpha マイクロプレートリーダー (Perkin Elmer) を用いて測定した。各候補抗原に対する血清抗体力価は、各 GST 融合タンパク質の Alpha 信号から GST タンパク質の Alpha 信号を差し引いて算出した。

AlphaLISA assay

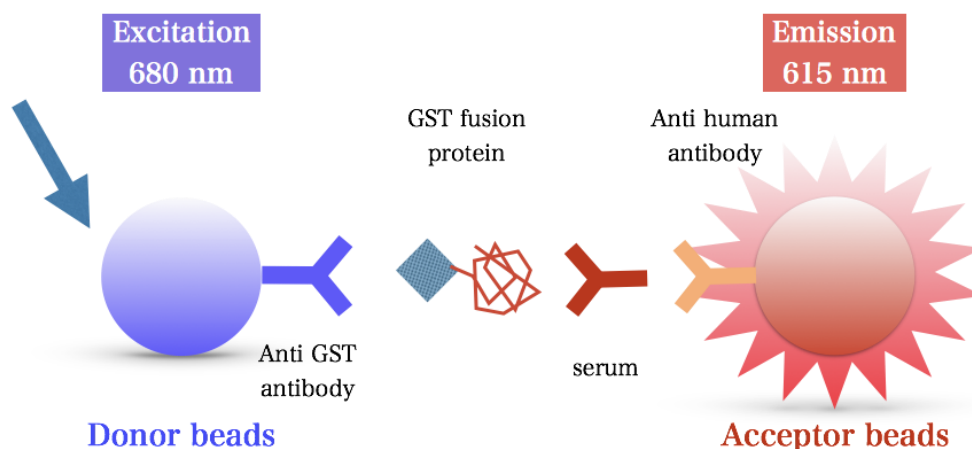


図 4 AlphaLISA assay の原理

Donor beads および Acceptor beads によるサンドイッチアッセイにより、GST 融合蛋白と反応した血清中の特異的抗体レベルを検出することができる。励起光 680nm を照射すると近接した Acceptor beads 内で化学反応が起こり、615nm の発光が検出される。

8. 血清 CgA 値の測定

患者群 (n = 25) および健常者群 (n = 25) の血清 CgA 値をヒトクロモグラニン A EIA キット (Yanaihara Institute inc., Fujinomiya, Japan) を用いて測定した。まず、33.33 pmol/mL の標準液を調製し、それを緩衝液で希釈することにより 11.11、3.70、1.23、0.41、0.14 pmol/mL の各標準液を調製した。測定プレートを 3 回洗浄し、各ウェルに緩衝液 50 μ L を入れ、次に標準液 (33.33~0 pmol/mL) または各検体 25 μ L を加え、さらに標識抗原溶液 50 μ L および特異抗体溶液 100 μ L を加えた。測定プレートを密閉用シールで覆い、室温で一晩 (約 16 時間) 反応させた。プレートを 3 回洗浄後、各ウェルに SA-HRP 溶液 100 μ L を加えて室温で 2 時間振とうした。プレートを 4 回洗浄し、各ウェルに発色剤溶液 100 μ L を入れ、室温で 30 分間反応させた後、マイクロプレート吸光度計にて 490 nm の吸光度を測定した。各濃度 CgA 標準液の測定値から標準曲線を作成し、検体中の CgA 濃度を算出した。

9. 定量的 RT-PCR

PAXgene Tissue (Qiagen, Hilden, Germany) に保存された腫瘍および正常脾臓組織の 6 サンプルから Total RNA を抽出し、Prime Script RT Master Mix (Takara Bio, Kusatsu, Japan) を用いて逆転写反応により cDNA を得た。StepOne Real-time PCR system (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) を用いて PCR を triplicate にて行い標的遺伝子を増幅した。EID3 の mRNA 発現量は、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH 遺伝子で標準化された比較 CT 法を用いて算出した相対値として表した。使用したプライマー配列を表 2 に示す。

表 2 qPCR に用いたプライマー配列

Primer	Forward	Reverse
GAPDH	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC -3 '	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'
EID3	5'-GCCGACGTAGACCCAAAGC-3 '	5'-GTTAAGGAGTTGTTCGCCGAG -3 '

10. 免疫組織化学染色

5 μ m にスライスしたパラフィン包埋標本を脱パラフィンし、抗原賦活化装置 (Dako, Santa Clara, CA, USA) を用いて pH 9.0 の溶液中で 95℃、20 分間加熱して抗原を賦活化した。次に、Dako peroxidase blocking solution を用いて内因性ペルオキシダーゼ活性をブロッキングした。非特異的な反応は、10% 正常ヤギ血清 (Nichirei, Tokyo, Japan) および Antibody Diluent with Background Reducing Components (Dako, Santa Clara, CA, USA) を使用して軽減させた。続いて、一次抗体を 4℃で一晩反応させ、EnVision FLEX / HRP システム (Dako, Santa Clara, CA, USA) を用いて発色後、ヘマトキシリンで核染色を行い、目的タンパク質の局在を解析した。免疫組織化学染色に用いた抗体を表 3 に示す。

表 3 免疫組織化学染色に用いた抗体

Molecule	Clonality	Dilution	Manufacture
EID3	Rabbit polyclonal	1:1000	Abcam

11. 統計分析

臨床病理学的因子の解析には Pearson's Chi-square 検定および Fisher's exact 検定を使用した。異なる群間比較には Mann-Whitney U 検定を用いた。受信者動作特性曲線 (Receiver Operatorating Characteristic curve: ROC) 分析を用いて、同定した血清抗体の診断能を評価した。生存分析は、患者群 25 例のうち R0 根治手術を受けた 20 例について Kaplan-Meier 法に従って実施した。生存率の差はログランク検定により比較検討した。ハザード比 (Hazard ratio: HR) は Cochran-Mantel-Haenszel 法により算出した。相関解析には、連続変数に対しては Pearson の相関係数を用い、序数変数に対しては Spearman の相関係数を用いた。 $p < 0.05$ を統計学的な有意差ありと判定した。全ての統計解析は、GraphPad Prism 6 ソフトウェア (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) を用いて行った。

実験結果

1. λ ZAP II cDNA ライブラリーの作成

腫瘍組織から mRNA を抽出し、cDNA フェージライブラリーを構築した。青白判定の結果、白色プラーク数（遺伝子導入が成功しているプラーク数）は約 1000 個/ μ L であった（図 5A）。また、白色プラークからランダムに抽出した 9 つのコロニーに対してコロニーPCRを行った結果、5 つのコロニーにおいてタンパク質精製に適度な長さ・サイズの遺伝子導入を確認することができた（図 5B）。同様の操作を 3 例分繰り返し、その平均値よりライブラリーの力価を計算したところ、 $1000 \times 0.55 \times 3 \times 1000 = 1.65 \times 10^6$ pfu/mL となった。これは、同様の実験系において報告された cDNA ライブラリーのサイズと同等であった（Muto et al., 2015）。

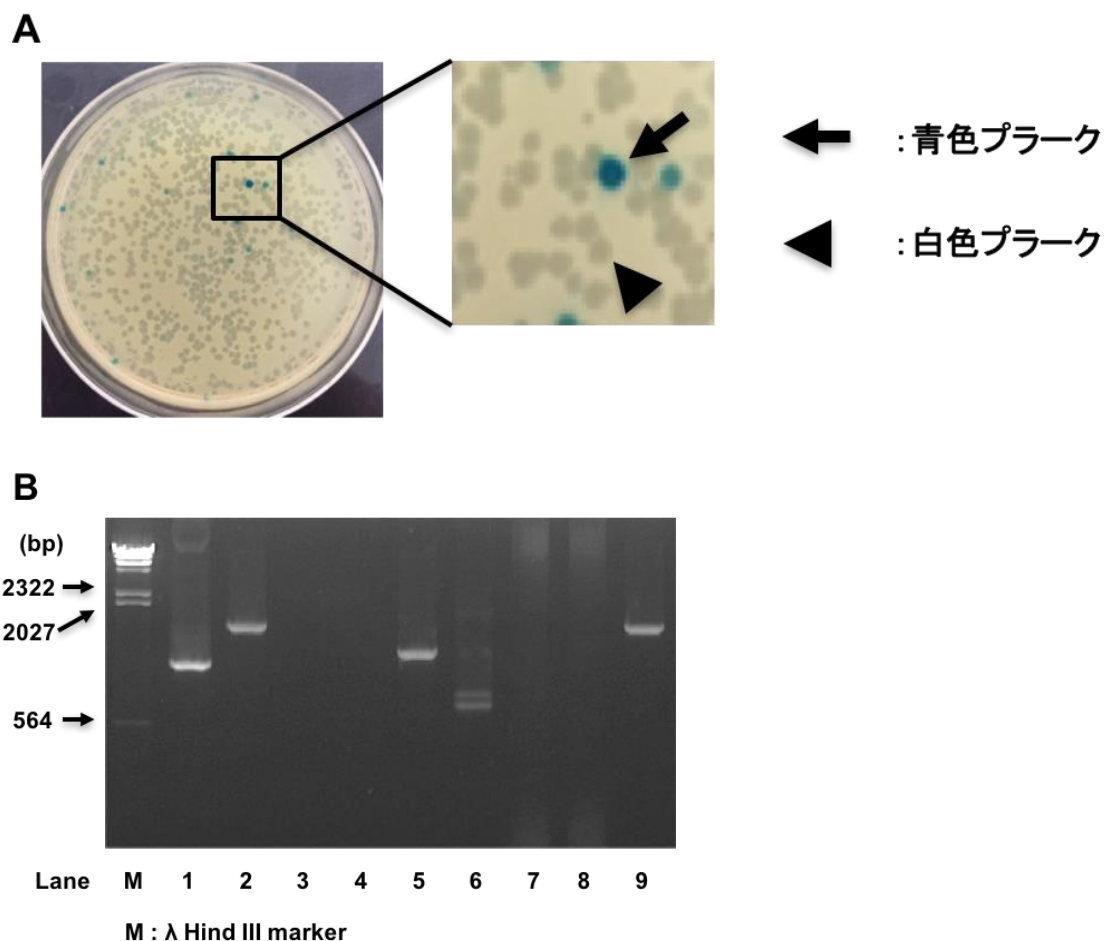


図 5 青白選択およびコロニーPCRによる cDNA ライブラリーの力価の推定

A: 青白選択により遺伝子導入されたプラーク（白色プラーク、矢頭）数を計測した。B: colony PCR の結果、レーン 1～9 のうち、レーン 1、2、5、6、9 に対応するクローンにタンパク質精製に適した長さの遺伝子導入が確認された。

2. SEREX スクリーニングによる NF-pNETs 腫瘍抗原の同定

構築した cDNA ライブラリーおよび市販の精巢 cDNA ライブラリーを、NF-pNETs 患者の血清でスクリーニングし、20 の免疫反応性クローンを単離した (図 6、表 4)。DNA シークエンシングにより得られた遺伝子配列は BLAST を用いて相同性検索を施行し、phosphatase and tensin homolog (PTEN)、EP300 interacting inhibitor of differentiation 3 (EID3)、EH domain containing 1 (EHD1)、galectin-9 (LGALS9)、BRCA1 associated protein (BRAP) および glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の6つの抗原との相同性が示された (表 4)。GAPDH については、ハウスキーピング遺伝子であり、病的意義は低いと判断してその後の解析から除外した。また、ELK2A については偽遺伝子であることが知られており、病的意義は低いと判断してその後の解析から除外した。本研究で単離した配列の位置情報および各抗原のコード配列の位置情報を表 5 に示す。

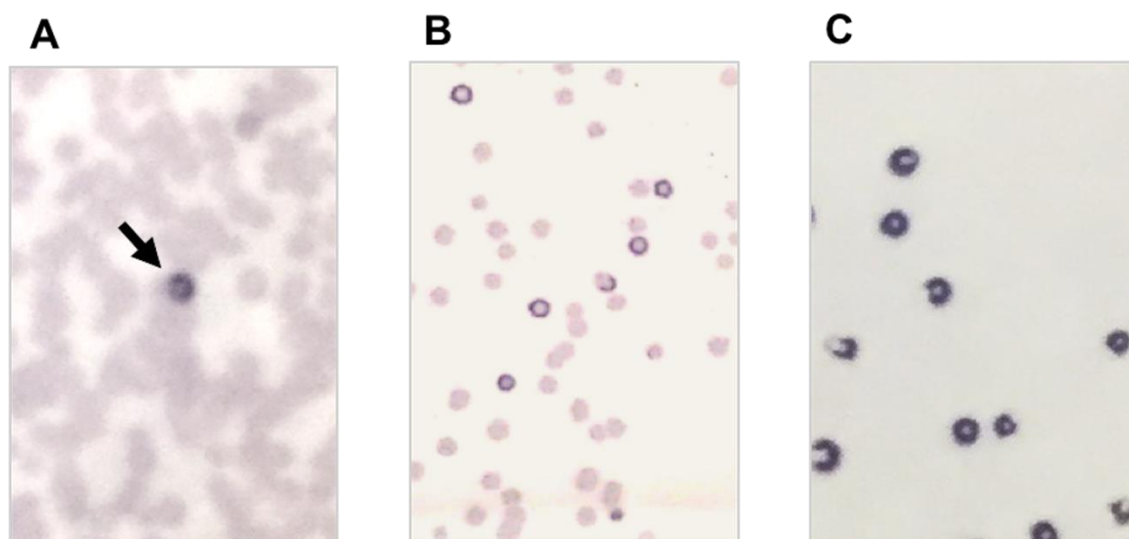


図 6 NF-pNETs 患者の血清を用いた SEREX スクリーニング

cDNA クローンがコードするタンパク質を発現させ、ニトロセルロースメンブレン上に転写し、患者の血清を反応させてスクリーニングを行った。第1ラウンドスクリーニングにより陽性クローン (矢印) を回収した (A)。第2ラウンド (B) および第3ラウンド (C) の SEREX スクリーニングにより、陽性クローンを単離した。

表 4 SEREX 法により単離された遺伝子

Clone name	Gene identity	NCBI Accession Number
N1	Phosphatase and tensin homolog (PTEN)	NM_000314
N2, N8	EP300 interacting inhibitor of differentiation 3 (EID3)	NM_001008394
N3, N9	EH domain containing 1 (EHD1)	NM_001282444
N4, N10, N11	Galectin 9 (LGALS9)	NM_002308
N5	BRCA1 associated protein (BRAP)	NM_006768
N6, N12	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	NM_001256799
N 7	ELK2A, member of ETS oncogene family	NR_046211.1
N13 - 20	ESTs	

表 5 単離した配列とコード配列

抗原名	単離した配列	コード配列
PTEN	1424..2301	1032..2243
EID3	427..1487	204..1205
EHD1	738..2431	123..1727
LGALS9	93..1617	119..1090
BRAP	234..410	205..1983

3. SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングによる NF-pNETs 腫瘍抗原の精製および抗原性の確認

同定した各抗原の GST 融合タンパク質を精製した。SDS-PAGE 解析において、各 GST 融合タンパク質は、シークエンシングの結果から予測される分子量の位置において顕著なバンドとして検出された（図 7、レーン 1）。GST 抗体を用いたウェスタンブロッティング（図 7、レーン 2）および各抗原に対する抗体（抗 PTEN、抗 EID3、抗 EHD1、抗 LGALS9 および抗 BRAP 抗体）を用いたウェスタンブロッティング（図 7、レーン 3）の結果、顕著なバンドだけでなく低分子量のバンドも認識された。これらの結果は、顕著な太いバンドが GST タグと抗原性を有する目的のタンパクであり、他の低分子量のバンドは分解産物や非特異的な反応であることを示唆している。

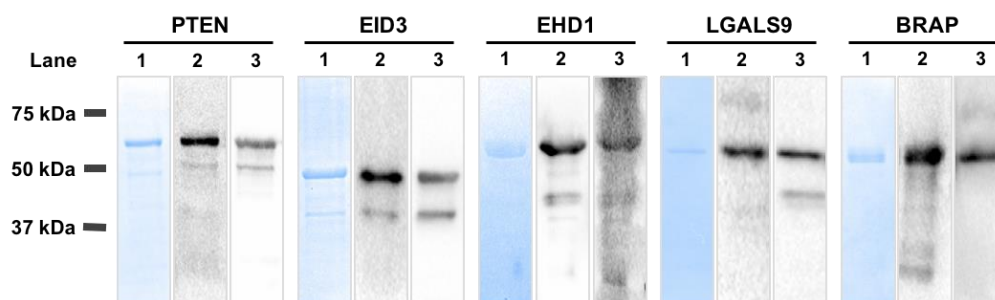


図 7 SDS-PAGE およびウェスタンブロッティング

レーン 1: SDS-PAGE 解析により GST 融合タンパク質の精製を確認した。レーン 2: 抗 GST 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、各 GST 融合タンパク質が GST タグを有するかを確認した。レーン 3: 各抗原に対する特異的抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、各 GST 融合タンパク質の精製を確認した。

4. AlphaLISA による患者および健常者の各抗原に対する抗体力価の解析

SEREX 法により同定した 5 つの抗原に対する抗体反応性を患者群と健常者群の間で比較するため、各群 25 例の血清を用いて AlphaLISA を実施した。5 つの抗原中、群間に有意差があったのは EID3 抗原のみであり、健常者群の 3.477 ± 2.289 Count/ 10^3 に対して患者群では 7.034 ± 3.390 Count/ 10^3 と有意に高くなっていた ($p = 0.0005$ 、図 8)。PTEN、EHD1、LGALS9 および BRAP に対する抗体力価は群間で有意差がなかったことから (図 8)、腫瘍マーカー候補として血清抗 EID3 抗体に的を絞る、その有用性を検討すべく解析を進めることとした。

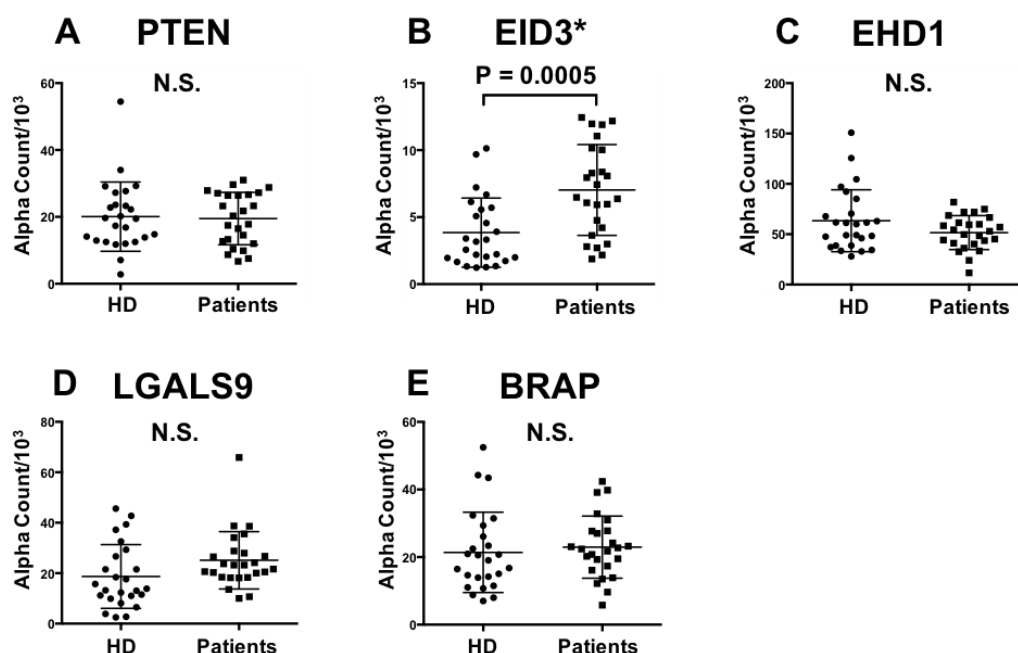


図 8 AlphaLISA を用いた患者群と健常者群間の各抗原に対する血清抗体力価の比較

患者群および健常者群各 25 例の血清と各種 GST 融合タンパク質[PTEN (A)、EID3 (B)、EHD1 (C)、LGALS9 (D) および BRAP (E)]を用いて AlphaLISA を行い、得られた血清抗体力価の散布図を示す。EID3 抗原に対する抗体力価は健常者群よりも NF-pNETs 患者群で有意に高かった (B) (* $p < 0.05$ 、Mann-Whitney U 検定)。

5. 血清抗 EID3 抗体力価と血清 CgA 値との相関

患者群および健常者群それぞれの血清 CgA 値を測定した結果を図 9A に示す。患者群および健常者群における CgA レベルの中央値は、それぞれ 11.93 pmol/mL (範囲、5.403–95.37 pmol/mL) および 11.71 pmol/mL (範囲、4.487–22.12 pmol/mL) であり、両群間に統計学的有意差はなかった。図 9B に示す通り、血清抗 EID3 抗体力価と血清 CgA 値には正の相関が認められた ($r = 0.411$ 、 $p = 0.041$ 、Pearson の相関係数)。

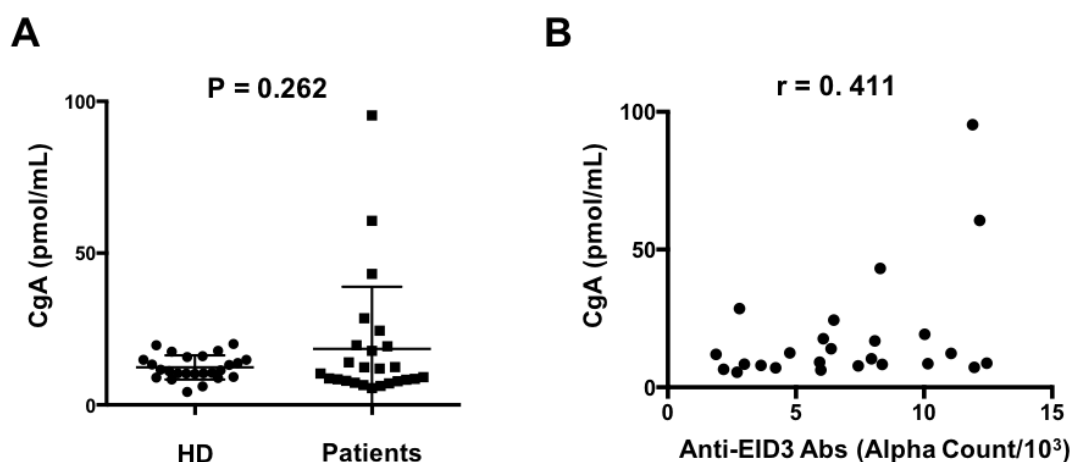


図 9 NF-pNETs 患者における血清 CgA 値と抗 EID3 抗体力価の相関

(A) 患者群および健常者群の血清 CgA 値を測定し、散布図を作成した。2 つの群間で血清 CgA 値に有意差はなかった。(B) 患者群における血清 CgA 値および抗 EID3 抗体力価の相関分析 ($n = 25$)。抗 EID3 抗体力価と血清 CgA 値に相関を認めた ($r = 0.411$ 、 $p = 0.041$ 、Pearson の相関係数)。

6. ROC 曲線を用いた NF-pNETs 検出における血清抗 EID3 抗体および血清 CgA 値の診断精度の解析

ROC 曲線から Area Under Curve (AUC) を計算して血清抗 EID3 抗体および血清 CgA 値の診断能を評価した。まず、血清抗 EID3 抗体の診断能については、AUC は 0.784 [95%信頼区間 (confidence interval: CI):0.658-0.909] であり、中等度の診断精度を持つことが明らかとなった (図 10A)。血清抗 EID3 抗体力価のカットオフ値を健常者群の平均+2SD (カットオフ値:8.055) とした場合、診断特異度は 92% (95%CI:0.739-0.990) であり、診断感度は 40% (95%CI:0.211-0.613) であった。次に、血清 CgA 値の診断能については、AUC は 0.538 (95%CI:0.367-0.709) であった (図 10B)。血清 CgA 値のカットオフ値を同様に健常者群の平均値+2SD (カットオフ値:17.61) とした場合、診断感度は 32% (95%CI:0.465-0.850) であり、診断特異度は 88% (95%CI:0.593-0.932) であった。さらに、血清抗 EID3 抗体および血清 CgA 値の結果を用いてコンビネーションアッセイを実施した。どちらか一方の検査値がカットオフ値を上回る値を示した場合を陽性とする、その診断感度は 52%に上昇した。

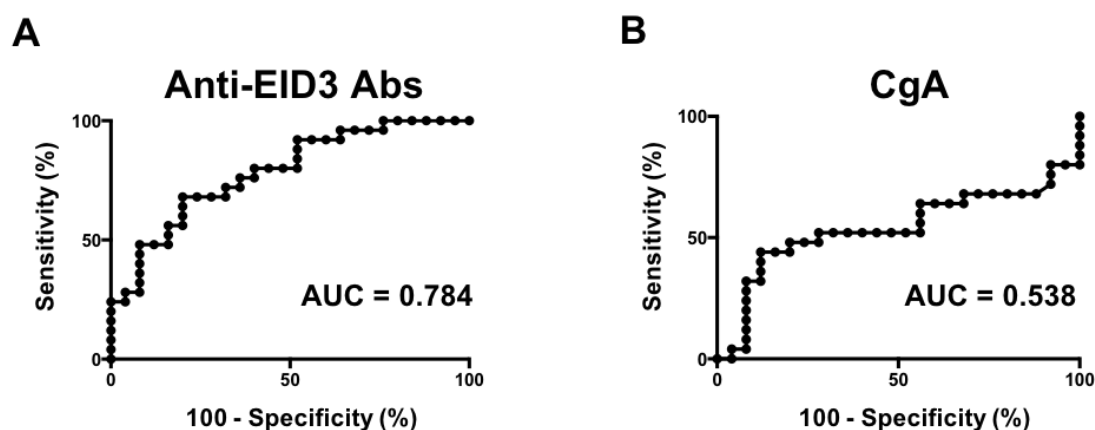


図 10 NF-pNETs における抗 EID3 抗体および CgA の診断精度

ROC 曲線分析により血清抗 EID3 抗体および CgA 値の診断精度を評価した。

(A) NF-pNETs 患者の診断における血清抗 EID3 抗体力価の ROC 曲線分析。ROC 曲線分析の結果から計算した AUC は 0.784 (95%CI:0.658-0.909) であった。(B) NF-pNETs 患者の診断における血清 CgA の ROC 曲線分析。ROC 曲線分析の結果から計算した AUC は 0.538 (95%CI:0.367-0.709) であった。

7. 臨床病理学的特徴と血清抗 EID3 抗体力価との間の関連性

患者群を上記のカットオフ値に従って、EID3 陽性群（血清抗 EID3 抗体力価 ≥ 8.055 ）と EID3 陰性群（血清抗 EID3 抗体力価 < 8.055 ）に分け、NF-pNETs 患者の臨床病理学的特徴と抗 EID3 抗体陽性率との関係を調べたが、両者に有意な関連を認めなかった（表 6）。さらに、R0 切除を受けた 20 例の患者の生存分析を行った。単変量解析は、EID3 陽性群が EID3 陰性群と比較して無病生存率（disease free survival: DFS）と有意に関連していることを示した（ $p = 0.043$ 、図 11A）。他の因子では、腫瘍（T）因子（ $p = 0.006$ ）、局所リンパ節（N）因子（ $p = 0.020$ ）、およびステージ（ $p = 0.020$ ）は DFS と関連し、性別、年齢、遠隔転移（M）因子では、全生存率（overall survival: OS）は DFS と関連しなかった（All $p > 0.05$ ）（表 7）。同様に、患者群を CgA の値により 2 つの群（CgA 陽性：血清 CgA 値 $\geq$ カットオフ値、CgA 陰性：血清 CgA 値 $<$ カットオフ値、カットオフ値：17.61pmol / mL）に分け、生存分析を行ったところ、血清 CgA 値と OS および DFS との間に有意差はなかった（図 11B）。

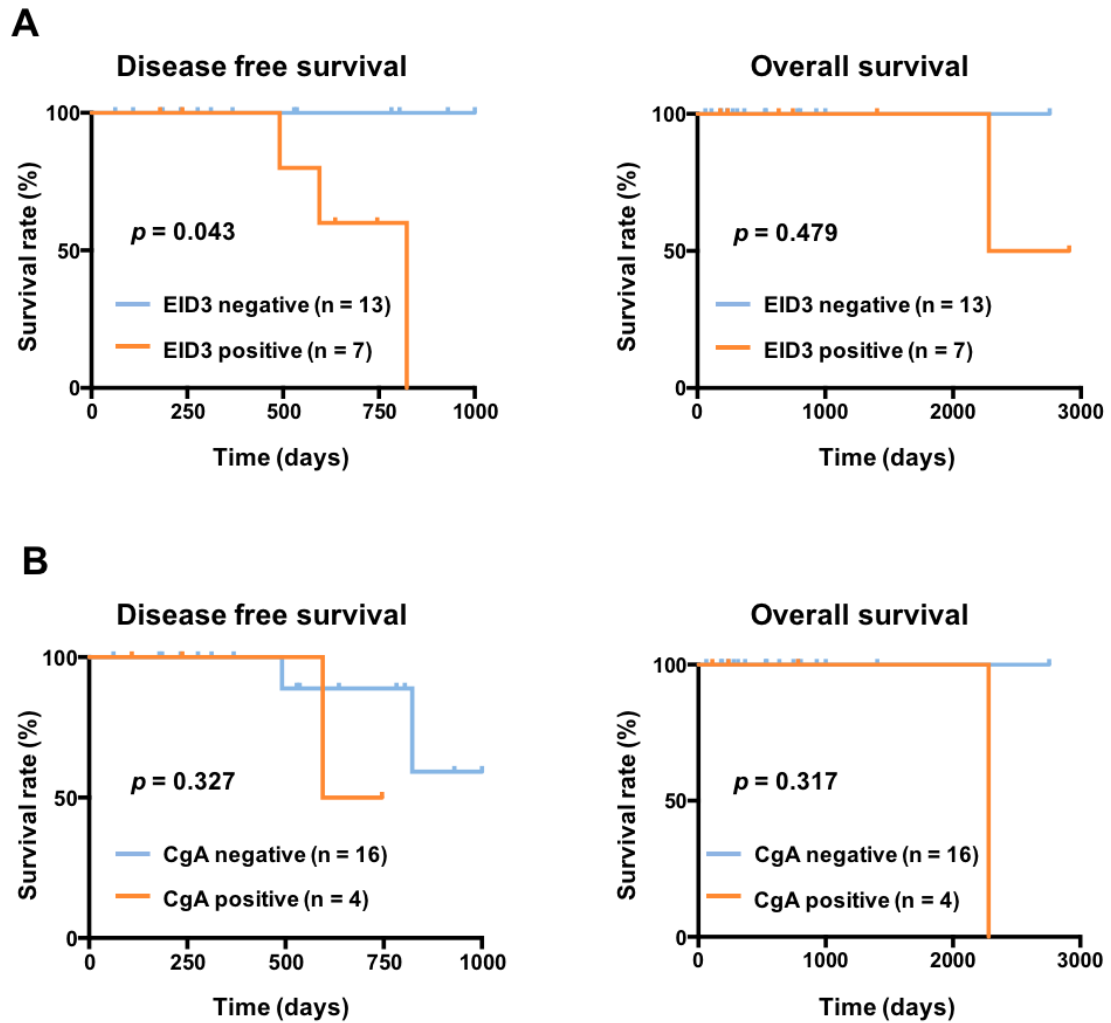


図 11 R0 手術を受けた NF-pNETs 患者における血清抗 EID3 抗体力価と DFS の関係
Kaplan-Meier 曲線により、血清抗 EID3 抗体力価および血清 CgA 値と予後の生存解析を行った。A) 血清抗 EID3 抗体陽性の患者群は、陰性の患者群よりも有意に短い DFS を示した (Log-rank 検定、 $p = 0.0436$)。すべての再発例は肝転移であった。血清抗 EID3 抗体力価と OS との間に有意な相関はなかった。B) 血清 CgA 値と OS および DFS との間に有意差はなかった。

表 6 抗 EID3 抗体陽性患者と背景因子の関連性

Characteristic			Number of patients	Number of serum anti-EID3 Abs positive patients (%)	p value
Gender	Male		9	3 (33)	0.6913
	Female		16	7 (44)	
Age	<54		12	6 (50)	0.4283
	≥54		13	4 (31)	
Tumor size	<17 mm		12	5 (41)	>0.9999
	≥17 mm		13	5 (38)	
Grade	G1		8	4 (50)	0.6668
	G2		17	6 (35)	
T	T1, T2		20	6 (30)	0.1206
	T3, T4		5	4 (80)	
N	N0		16	5 (31)	0.3973
	N1		9	5 (55)	
M	M0		19	7 (37)	0.6532
	M1		6	3 (50)	
Stage	I, II		14	4 (29)	0.2406
	III, IV		11	6 (54)	

表 7 無病生存期間と各種因子の単変量解析 (*:統計学的有意差 p < 0.05)

Patient characteristics (Number of patient)		Hazard ratio	95% CI	p value
All patients (20)				
Gender	Male (8) vs. Female (12)	3.793	0.3071 to 46.83	0.256
Age	≥54 (10) vs. <54 (10)	9.499	0.0104 to 1.060	0.056
Grade	G2 (13) vs. G1 (7)	2.369	0.2353 to 23.86	0.464
Tumor size	≥17 mm (10) vs. <17 mm (10)	10.15	0.9559 to 107.9	0.054
T	T3,4 (3) vs. T1,2 (17)	33.98	2.7520 to 419.6	0.006*
N	N1 (7) vs. N0 (13)	16.48	1.5520 to 175.1	0.020*
M	M1 (2) vs. M0 (18)	2.969	0.1413 to 62.39	0.483
Stage	III/IV (7) vs. I/II (13)	16.48	1.5520 to 175.1	0.020*
anti-EID3 Abs	positive (7) vs. negative (13)	10.78	1.0700 to 108.5	0.043*

8. NF-pNETs および正常膵組織における EID3 の遺伝子およびタンパク発現分析

リアルタイム RT-PCR によって EID3 の遺伝子発現を調べた結果、全ての症例において正常膵臓組織よりも NF-pNETs において EID3 の発現が高かった (Paired t 検定、 $p = 0.0288$ 、図 12)。

腫瘍および正常膵組織における EID3 タンパクの発現および分布を、免疫組織化学染色によって調べた。代表的な結果は図 13 に示した通りであり、正常膵臓組織よりも NF-pNETs 組織においてより強く発現していた。EID3 タンパクの局在化に関しては、核内よりも細胞質においてより強く発現していた。腫瘍組織における EID3 タンパクの発現に不均一性はなかった。症例によって、陽性対照の副睾丸と比較して非常に弱い (図 13A、1+)、弱い (図 13A、2+)、および同程度 (図 13A、3+) の発現が観察された。組織試料および血清の両方が保存されていた 17 例の患者において、組織における EID3 タンパクの高発現は、血清抗 EID3 抗体の高力価 ($p < 0.05$ 、図 13B) と関連していた。また、患者を低 EID3 群 (1+、2+) と高 EID3 群 (3+) の 2 群に分け、両群間の臨床病理学的特徴の差を調べたところ、EID3 タンパク発現と臨床病理学的特徴との間に有意な関連性はなかった (表 8)。さらに、これらの 2 群の生存分析から、EID3 タンパク発現と OS および DFS との間に有意な関連性がないことが明らかになった (図 13C)。

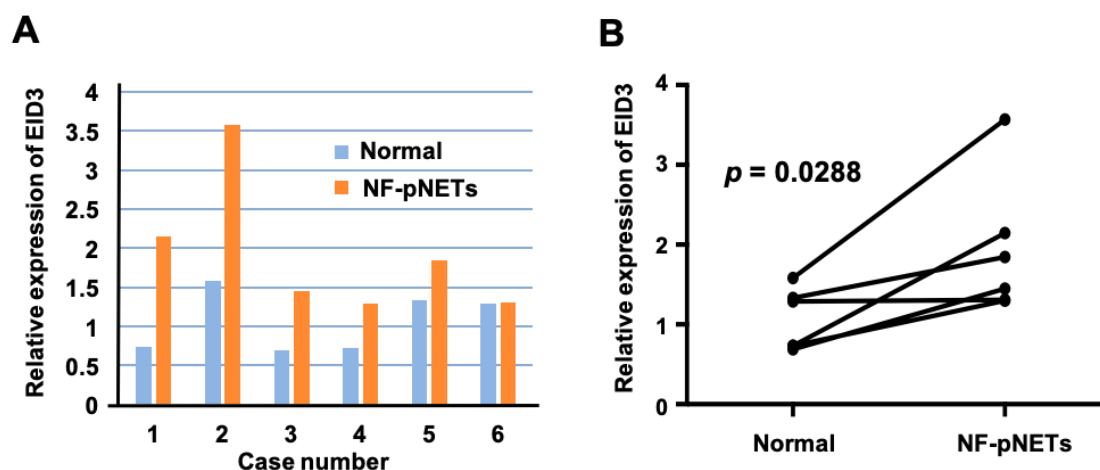


図 12 NF-pNETs および正常膵組織における EID3 mRNA の発現解析

NF-pNETs および正常膵臓組織における EID3 の mRNA 発現解析をリアルタイム RT-PCR で確認した (A)。ハウスキーピング遺伝子 GAPDH によって標準化された比較 CT 法により、EID3 の相対的発現は、正常な膵臓組織よりも NF-pNETs 組織において有意に高かった (B) ($p = 0.0288$ 、Paired t 検定)。

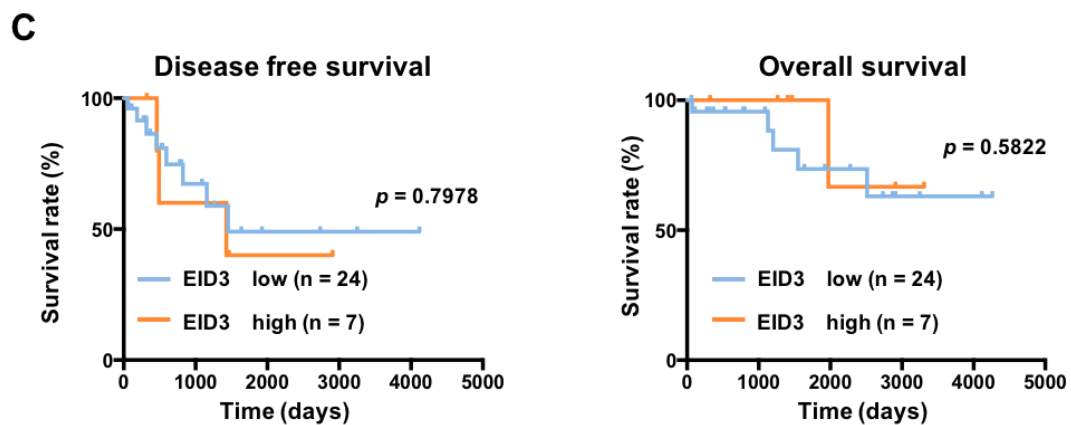
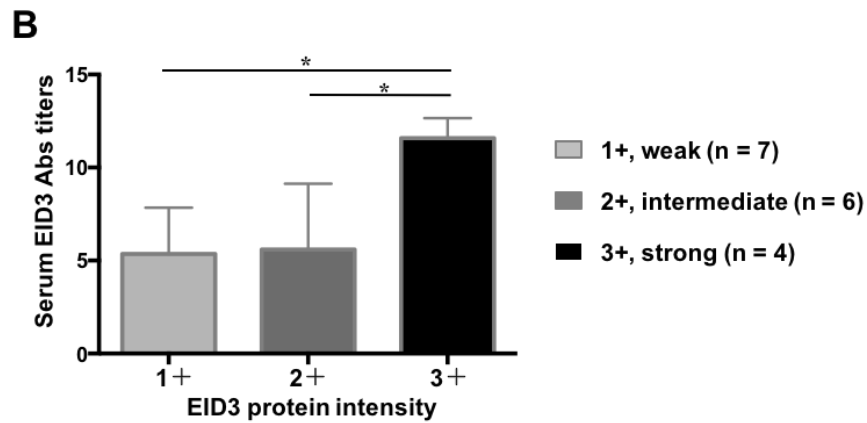
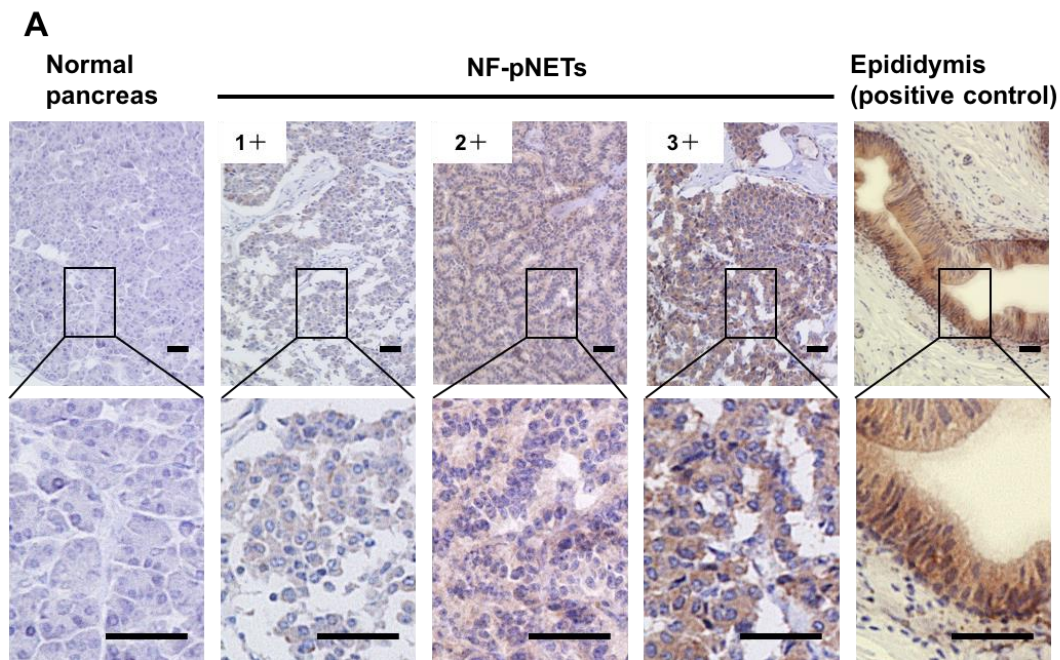


図 13 免疫組織化学染色による NF-pNETs における EID3 のタンパク発現解析

(A) 切除検体 31 例に対して免疫組織化学的染色を行い、NF-pNETs および正常膵組織における EID3 タンパク発現を解析した。正常膵組織と比較して NF-pNETs 組織でより強い EID3 タンパク発現が観察された。(B) EID3 タンパク発現と血清抗 EID3 抗体力価の関連を解析した。血清抗 EID3 抗体力価は EID3 タンパクの強 (3+) 発現群において有意に高かった (* $p < 0.05$)。 (C) Kaplan-Meier 曲線による生存解析を低 EID3 群 (1+, 2+) と高 EID3 群 (3+) に分けて施行した。発現強度による OS および DFS の有意差はなかった。スケールバー: 50 μm

表 8 EID3 タンパク発現と臨床病理学的特徴の関連性

Characteristic		EID3 high (n=7)		p value
		n	n	
Gender	Male	2	11	0.6672
	Female	5	13	
Age	<54	4	12	>0.9999
	≥ 54	3	12	
Tumor size	<17 mm	3	9	>0.9999
	≥ 17 mm	4	15	
Grade	G1	1	10	0.3717
	G2	6	14	
Ki-67/MIB-1	<3%	2	13	0.3944
	3-20%	5	11	
T	T1, T2	3	11	>0.9999
	T3, T4	4	13	
N	N0	4	16	0.6757
	N1	3	8	
M	M0	6	20	>0.9999
	M1	1	4	
Stage	I, II	3	15	0.413
	III, IV	4	9	

考察

pNETs のうち、NF-pNETs には特異的な症状がないため、約 30%の NF-pNETs 症例は他臓器転移を伴う進行した状態で診断される。さらに、根治術後でも約 20%において肝転移再発し、分子標的薬を中心とした集学的治療を要する。しかしながら、本邦では診断の一助として使用可能な腫瘍マーカーが確立されていないため、新規腫瘍マーカーの探索・同定は喫緊の課題である (Mosli et al., 2012; Touzios et al., 2005)。そこで、SEREX 法により腫瘍抗原を同定し、それに免疫反応する抗体を患者血清で確認し、NF-pNETs に対する新規抗体型腫瘍マーカーを見出すことを目的に研究を開始した。本研究により、5 つの腫瘍抗原 (PTEN, EID3, EHD1, LGALS9, BRAP) が同定され、その中でも、EID3 抗原に対する血清抗体力価は、健常者群と比べ患者群において有意に高かった。さらに、血清抗 EID3 抗体力価を用いた ROC 曲線分析により求めた AUC 値は 0.784 であり、血清抗 EID3 抗体が中程度の精度を有する腫瘍マーカーとなり得ることが示された。

◆ SEREX 法について

本研究では、pNETs に対する腫瘍マーカーを探索するにあたり、IgG 抗体型の腫瘍マーカーに着目して研究を開始した。抗体型マーカーを探索する方法としてはプロテインアレイ法および本研究で施行した発現クローニング法/SEREX 法の 2 種類の方法がある。プロテインアレイ法は約 9000 種類の抗原を搭載したプロトアレイにより短期間で大量の抗原を検索可能だが、欠点としてコストが極めて高いことや、検索できる抗原タンパクの種類に制限があることが挙げられる (Huang and Zhu, 2017; Koo et al., 2014)。一方で、発現クローニング法/SEREX 法は cDNA ライブラリーの作成やスクリーニングの手技が煩雑なことから労力を要するが、低コストであり、cDNA ライブラリーの質にも依るが一度のスクリーニングで約 10 万抗原の検索が可能である (Hartmann et al., 2005; Kagaya et al., 2011)。また、SEREX 法の利点としては患者血清を使用してスクリーニングを施行するため、実際に患者生体内で液性免疫を誘導した抗原を同定することが可能である (Rauch and Gires, 2008)。そこで、本研究では SEREX 法を選択しスクリーニングを施行した。その結果、5 つの腫瘍抗原 (PTEN, EID3, EHD1, LGALS9, BRAP) を同定することが可能であり、患者群で有意に高値であった抗 EID3 抗体について解析を進めた。

◆ EID3 の腫瘍形成への寄与

EID ファミリーには EID1, EID2, EID3 の3種が同定されており、共通の機能として過剰発現系にて細胞分化を阻害することや、癌抑制遺伝子産物である Retinoblastoma (RB) と細胞内で複合体を形成することが報告されている (Ji et al., 2003; Sasajima et al., 2005)。EID3 は精巣で高度に発現し、核および細胞質の両方に局在し (Bavner et al., 2005)。正常条件下において EID ファミリーは細胞周期の終わりに RB タンパクによって急速に分解され、細胞分化を促進する (Khidr and Chen, 2006; Miyake et al., 2000)。しかしながら、RB の遺伝子変異による不活性化や RB タンパクの機能抑制により、EID が安定化し、細胞分化が阻害されることから、結果として EID が腫瘍形成に寄与する可能性があることが報告されている (Bavner et al., 2005; MacLellan et al., 2000; Sasajima et al., 2005)。実際に、EID3 は結腸直腸癌における細胞分化抑制および癌幹細胞形成に関与していることが報告されている (Munakata et al., 2016)。pNETs において、RB タンパクは Cdk4 の高発現によるリン酸化により不活性化されていると報告されており (Tang et al., 2012)、そのような RB タンパクの不活性化は EID ファミリーのタンパク発現の増加を引き起こしている可能性がある。さらに、リン酸化された pRB は、転写因子である E2F を抑制することができず、細胞周期に関連する様々な因子の転写活性化を引き起こす。EID 遺伝子のプロモーター領域は、E2F 結合領域 (<http://www.genecards.org/>) を含み、E2F の活性化は EID の mRNA の発現増加をもたらす。実際、本研究において免疫組織化学染色により NF-pNETs 組織における EID3 タンパクの高発現、および qPCR により NF-pNETs における EID3 の mRNA の高発現を示しており、上記のメカニズムによって NF-pNETs の腫瘍形成と関連し得ることを示唆している。

◆ pNETs 患者における抗 EID3 抗体の産生機序

一般的に、免疫系は自己抗原以外の外来タンパクに応答して抗体を産生する。免疫系が自己および非自己タンパクを区別できない場合、自己抗体が産生される。自己抗体産生の根底にあるメカニズムは完全には解明されていないが、特定の化学物質への長時間の曝露や正常抗原の過剰発現等の環境誘因や遺伝的素因が組み合わさり抗体産生が起きると報告されている (Disis et al., 2006; Suppiah and Greenman, 2013)。例えば、抗 p53 抗体は野生型 p53 が過剰発現している動物の血清中で発見されている (Kress et al., 1979; Melero et al., 1979)。本研究においても、抗原の発現量と血清抗体力価についての関連を検証した。その結果、血清抗 EID3 抗体力価は EID3 の高発現群において有意に高値であっ

た。以上より、pNETs 腫瘍における EID3 の高発現が抗体産生を引き起こし得ることを示唆していると考えられる。

◆ 抗 EID3 抗体の腫瘍マーカーとしての性能および既存マーカーとの比較

腫瘍マーカーは、臨床的に補助診断やスクリーニング、再発や治療効果のモニタリング、予後予測等を目的に用いられている。補助診断用途の代表例として、肝臓癌患者における α -フェトプロテインは約 90% の症例で陽性になると報告され、前立腺癌においての前立腺特異的抗原は数値が高くなるに従って陽性率が上昇し、100ng/ml 以上では約 60% の症例で骨転移をきたしていると報告されている (Taketa et al., 1993; Wolmark et al., 2005)。治療効果のモニタリング用途の例としては、腫瘍の組織量や増殖状態と関連すると報告されている膵臓癌における癌抗原 19-9 (CA19-9) および結腸癌の癌胎児性抗原が挙げられる (Ferrone et al., 2006; Wolmark et al., 2005)。予後予測の用途としては BRCA1 遺伝子の異常が乳癌予後不良に関連するという報告や (Amado et al., 2008; James et al., 2007)、抗体型腫瘍マーカーである抗 p53 抗体では ELISA による結腸・直腸癌患者 255 例の術前血清の精査の結果、組織学的分化度、血管への腫瘍浸潤、生存期間および無病生存期間との関連などの予後不良因子との関連が示されている (Houbiers et al., 1995)。また、これらの腫瘍マーカーは複数の役割を担うことがあり、例えば、膵臓癌において CA19-9 は治療効果の判定だけでなく、補助診断や予後予測の役割も担う。

本研究においては、補助診断、再発モニタリングおよび予後予測の役割としての血清抗 EID3 抗体の有用性を検討した。まず、補助診断としての有用性を検討するため、患者群および健常者群間の血清抗 EID3 抗体力価を AlphaLISA 法により測定し比較検討した。カットオフ値を健常者群の平均+2SD として設定した場合の血清抗 EID3 抗体の感度と特異度はそれぞれ 40% と 92% であり、この診断精度は本研究における CgA の診断精度 (感度 32%, 特異度 88%) や pNETs の診断において CgA をマーカーとした既報の結果とも遜色ないものであった (Campana et al., 2007; Hijioka et al., 2014; Zatelli et al., 2007)。これらのデータは、血清抗 EID3 抗体が NF-pNETs の補助診断として有用であり得ることを示唆している。現在、最も研究が進んでいる pNETs の腫瘍マーカーは CgA であるが、濃度上昇を引き起こす複数の分泌刺激経路が存在することから、偽陽性が問題となる (Bech et al., 2014; Campana et al., 2007; O'Toole et al., 2009)。さらに、CgA は進行期では陽性率が上昇するが早期病変では陽性率が低く、早期検出には適していない (Nehar et al., 2004; Qiao et al., 2014)。一方で、SEREX スクリーニングによって同定される IgG 型腫瘍マーカーは、免疫応答が大きければ抗原

の発現量が比較的少なくとも血清中の抗体濃度が上昇することから、早期の検出に適しているとされる (Disis et al., 2006; Heo et al., 2012; Ralhan et al., 1998; Shimada et al., 2000; Suppiah and Greenman, 2013)。実際に、転移を有さない症例の CgA の陽性率は 20%程度に止まるのに対して (Modlin et al., 2015; Prestifilippo and Blanco, 2012)、本研究において血清抗 EID3 抗体は転移を有さない症例でも 37%の陽性率を示した。したがって、血清抗 EID3 抗体は NF-pNETs の早期検出および再発モニタリングにおいて使用できる可能性がある。

◆ 抗 EID3 抗体と pNETs 患者の生存予後との関連

pNETs 患者の生存予後については、KRAS、DAXX/ATRX、MEN1 等の遺伝子異常および免疫組織化学染色における発現の多寡が予後と関連することが報告されているが、切除標本が必要なことから手術前の評価ができないという問題点がある (Sato et al., 2014; Yuan et al., 2014)。本研究においても、EID3 についてその発現や抗体の有無が NF-pNETs の予後と関連するかどうかを調べるため、免疫染色における EID3 タンパクの発現と予後の関連、および血清 EID3 抗体力価と予後との関連を評価した。その結果、免疫染色における EID3 タンパクの発現は OS および DFS との関連を示さなかった一方で、より高い血清抗 EID3 抗体力価がより短い DFS と関連することが示された。これらの結果の相違の原因としては、抗体力価を測定した AlphaLISA 法が免疫組織化学染色とは異なる検出感度を有する検出系である事に加え、少量の抗原に対しても抗体が産生されるという特徴に起因しているものと考えられる (Ferrier et al., 1999; Poulsen and Jensen, 2007)。以上より、血清抗 EID3 抗体力価は、術前に NF-pNETs の予後を予測するための有用なバイオマーカーである可能性があると考えられる。今回の研究知見により、抗 EID3 抗体が臨床応用可能であれば、術前術後補助療法の必要性の有無の判断根拠としても応用することも可能と考えられる。

総括および結論

① 本研究により以下のような新知見が得られた。

1. SEREX 法により 5 つの NF-pNETs 抗原候補 (PTEN, EID3, EHD1, LGALS9, BRAP) を同定した。
2. EID3 に対する抗体力価は、健常者と比較して NF-pNETs 患者において有意に高値であり、血清抗 EID3 抗体が補助診断マーカーとして利用できる可能性が示唆された。
3. 血清抗 EID3 抗体力価は NF-pNETs の DFS と関連したため、予後予測マーカーとして利用できる可能性が示唆された。

② 新知見の意義

本研究を通して得られた知見は、血清抗 EID3 抗体が、NF-pNETs の診断および予後の予測に利用される新たな腫瘍マーカーとなる可能性を示すものである。実用化が可能であれば、術後サーベイランスにおける再発のスクリーニングや術後補助療法の必要性の有無の判断根拠としても応用可能である。

③ 本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開され得るか

血清抗 EID3 抗体を NF-pNETs マーカーとして実臨床で利用するために、ELISA キットの開発や大規模臨床試験等への展開が必要と考えられる。また、本研究において同定された EID3 の NF-pNETs 抗原としての機能は未解明な部分が多いため、腫瘍形成における EID3 の機能解析や Pathway 解析等の研究への展開が考えられる。

④ 今後の課題

本研究の課題としては、まず希少疾患の探索的研究であり症例数が少なかったことが挙げられる。そのため、本研究を実臨床に応用するにあたり、大規模臨床試験により結果を再検証する必要がある。また、本研究においては GST 融合タンパク質を用いた AlphaLISA アッセイを行ったため、非特異的反応が観察された。これは、GST 融合タンパク質には目的とする特異的エピトープ以外の配列も含まれていることが原因と考えられる。よって、今後の研究では、EID3 のエピトープを探索・同定し、同部位のペプチドを用いることで、感度および特異度をさらに向上させることが可能である (Machida et al., 2015)。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただきました北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅱ 平野 聡 教授に深く感謝致します。研究全般にわたり、有意義な御指導御鞭撻をいただきました北海道大学大学院消化器外科学分野Ⅱ 土川 貴裕 講師、中村 透 助教に深く感謝致します。SEREX 法や AlphaLISA 法などの研究方法に関してご指導ご鞭撻を頂きました千葉大学大学院医学研究院遺伝子生化学 日和佐 隆樹 准教授に深く感謝致します。また、本研究を遂行するにあたり御協力をいただいた北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅱ、北海道大学大学院医学研究院内科系部門内科学分野腫瘍内科学教室、北海道大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野、北海道大学病院病理部病理診断科の皆様に心より感謝致します。

利益相反

開示すべき利益相反状態はありません。

引用文献

Amado, R.G., Wolf, M., Peeters, M., Van Cutsem, E., Siena, S., Freeman, D.J., Juan, T., Sikorski, R., Suggs, S., Radinsky, R., et al. (2008). Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 26, 1626-1634.

Bavner, A., Matthews, J., Sanyal, S., Gustafsson, J.A., and Treuter, E. (2005). EID3 is a novel EID family member and an inhibitor of CBP-dependent co-activation. *Nucleic Acids Research* 33, 3561-3569.

Bech, P.R., Martin, N.M., Ramachandran, R., and Bloom, S.R. (2014). The biochemical utility of chromogranin A, chromogranin B and cocaine- and amphetamine-regulated transcript for neuroendocrine neoplasia. *Annals of Clinical Biochemistry* 51, 8-21.

Campana, D., Nori, F., Piscitelli, L., Morselli-Labate, A.M., Pezzilli, R., Corinaldesi, R., and Tomassetti, P. (2007). Chromogranin A: Is it a useful marker of neuroendocrine tumors? *Journal of Clinical Oncology* 25, 1967-1973.

Chen, Y.T., Scanlan, M.J., Sahin, U., Türeci, O., Gure, A.O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., and Old, L.J. (1997). A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 1914-1918.

Disis, B.M.L., Pupa, S.M., Gralow, J.R., Dittadi, R., Menard, S., and Cheever, M.a. (2006). High-Titer HER-2 / neu Protein-Specific Antibody Can Be Detected in Patients With Early-Stage Breast Cancer. *Society* 15, 3363-3367.

Ferrier, C.M., de Witte, H.H., Straatman, H., van Tienoven, D.H., van Geloof, W.L., Rietveld, F.J., Sweep, C.G., Ruiter, D.J., and van Muijen, G.N. (1999). Comparison of immunohistochemistry with immunoassay (ELISA) for the detection of components of the plasminogen activation system in human tumour tissue. *British journal of cancer* 79, 1534-1541.

Ferrone, C.R., Finkelstein, D.M., Thayer, S.P., Muzikansky, A., Fernandez-delCastillo, C., and Warshaw, A.L. (2006). Perioperative CA19-9 levels can predict stage and survival in patients with resectable pancreatic adenocarcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 24, 2897-2902.

Gut, P., Czarnywojtek, A., Fischbach, J., Baczyk, M., Ziemnicka, K., Wrotkowska, E., Gryczynska, M., and Ruchala, M. (2016). Chromogranin A - unspecific neuroendocrine marker. Clinical utility and potential diagnostic pitfalls. *Archives of Medical Science* 12, 1-9.

Hartmann, T.B., Bazhin, A.V., Schadendorf, D., and Eichmüller, S.B. (2005). SEREX identification of new tumor antigens linked to melanoma-associated retinopathy. *International Journal of Cancer* 114, 88-93.

Heo, C.-K., Bahk, Y.Y., and Cho, E.-W. (2012). Tumor-associated autoantibodies as diagnostic and prognostic biomarkers. *BMB Reports* 45, 677-685.

Hijioka, M., Ito, T., Igarashi, H., Fujimori, N., Lee, L., Nakamura, T., Jensen, R.T., and Takayanagi, R. (2014). Serum chromogranin A is a useful marker for Japanese patients with pancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer Science* 105, 1464-1471.

Houbiers, J.G., van der Burg, S.H., van de Watering, L.M., Tollenaar, R.A., Brand, A., van de Velde, C.J., and Melief, C.J. (1995). Antibodies against p53 are associated with poor prognosis of colorectal cancer. *British journal of cancer* 72, 637-641.

Huang, Y., and Zhu, H. (2017). Protein Array-based Approaches for Biomarker Discovery in Cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 15, 73-81.

Ito, T., Igarashi, H., Nakamura, K., Sasano, H., Okusaka, T., Takano, K., Komoto, I., Tanaka, M., Imamura, M., Jensen, R.T., et al. (2015). Epidemiological trends of pancreatic and gastrointestinal neuroendocrine tumors in Japan: a nationwide survey analysis. *Journal of Gastroenterology* 50, 58-64.

James, C.R., Quinn, J.E., Mullan, P.B., Johnston, P.G., and Harkin, D.P. (2007). BRCA1, a potential predictive biomarker in the treatment of breast cancer. *Oncologist* 12, 142-150.

Ji, A., Dao, D., Chen, J., and MacLellan, W.R. (2003). EID-2, a novel member of the EID family of p300-binding proteins inhibits transactivation by MyoD. *Gene* 318, 35-43.

Kagaya, A., Shimada, H., Shiratori, T., Kuboshima, M., Nakashima-Fujita, K., Yasuraoka, M., Nishimori, T., Kurei, S., Hachiya, T., Murakami, A., et al. (2011). Identification of a novel SEREX antigen family, ECSA, in esophageal squamous cell carcinoma. *Proteome science* 9, 31.

Khidr, L., and Chen, P.L. (2006). RB, the conductor that orchestrates life, death and differentiation. *Oncogene* 25, 5210-5219.

Klimstra, D.S., Modlin, I.R., Coppola, D., Lloyd, R.V., and Suster, S. (2010). The pathologic classification of neuroendocrine tumors: a review of nomenclature, grading, and staging systems. *Pancreas* 39, 707-712.

Koo, B.K., Chae, S., Kim, K.M., Kang, M.J., Kim, E.G., Kwak, S.H., Jung, H.S., Cho, Y.M., Choi, S.H., Park, Y.J., et al. (2014). Identification of novel autoantibodies in type 1 diabetic patients using a high-density protein microarray. *Diabetes* 63, 3022-3032.

Kress, M., May, E., Cassingena, R., and May, P. (1979). Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *Journal of Virology* 31, 472-483.

Li, G., Miles, A., Line, A., and Rees, R.C. (2004). Identification of tumour antigens by serological analysis of cDNA expression cloning. *Cancer Immunol Immunother* 53, 139-143.

Machida, T., Kubota, M., Kobayashi, E., Iwadate, Y., Saeki, N., Yamaura, A.,

- Nomura, F., Takiguchi, M., and Hiwasa, T. (2015). Identification of stroke-associated-antigens via screening of recombinant proteins from the human expression cDNA library (SEREX). *Journal of Translational Medicine* 13, 1-11.
- MacLellan, W.R., Xiao, G., Abdellatif, M., and Schneider, M.D. (2000). A novel Rb- and p300-binding protein inhibits transactivation by MyoD. *Molecular and cellular biology* 20, 8903-8915.
- Melero, J., Stitt, D., Mangel, W., and Carroll, R. (1979). Identification of new polypeptide species (48-55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in SV40-infected and -transformed cells. *Virology* 93, 466-480.
- Miyake, S., Sellers, W.R., Safran, M., Li, X., Zhao, W., Grossman, S.R., Gan, J., DeCaprio, J.a., Adams, P.D., and Kaelin, W.G. (2000). Cells degrade a novel inhibitor of differentiation with E1A-like properties upon exiting the cell cycle. *Molecular and cellular biology* 20, 8889-8902.
- Modlin, I.M., Kidd, M., Bodei, L., Drozdov, I., and Aslanian, H. (2015). The clinical utility of a novel blood-based multi-transcriptome assay for the diagnosis of neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract. *The American Journal of Gastroenterology* 110, 1223-1232.
- Monji, M., Nakatsura, T., Senju, S., Yoshitake, Y., Sawatsubashi, M., Shinohara, M., Kageshita, T., Ono, T., Inokuchi, A., and Nishimura, Y. (2004). Identification of a Novel Human Cancer / Testis Antigen , KM-HN-1 , Recognized by Cellular and Humoral Immune Responses. *Clinical Cancer Research* 10, 6047-6057.
- Mosli, H.H., Dennis, A., Kocha, W., Asher, L.J., and Van Uum, S.H. (2012). Effect of short-term proton pump inhibitor treatment and its discontinuation on chromogranin A in healthy subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 97, E1731-1735.
- Müller, M., Meyer, M., Schilling, T., Ulsperger, E., Lehnert, T., Zentgraf, H., Stremmel, W., Volkmann, M., and Galle, P.R. (2006). Testing for anti-p53

antibodies increases the diagnostic sensitivity of conventional tumor markers. *International Journal of Oncology* 29, 973-980.

Munakata, K., Uemura, M., Tanaka, S., Kawai, K., Kitahara, T., Miyo, M., Kano, Y., Nishikawa, S., Fukusumi, T., Takahashi, Y., et al. (2016). Cancer Stem-like Properties in Colorectal Cancer Cells with Low Proteasome Activity. *Clinical Cancer Research* 22, 5277-5286.

Muto, M., Mori, M., Hiwasa, T., Takiguchi, M., Iwadate, Y., Uzawa, A., Uchida, T., Masuda, H., Sugimoto, K., and Kuwabara, S. (2015). Novel serum autoantibodies against talin1 in multiple sclerosis: Possible pathogenetic roles of the antibodies. *Journal of Neuroimmunology* 284, 30-36.

Nehar, D., Lombard-Bohas, C., Olivieri, S., Claustrat, B., Chayvialle, J.A., Penes, M.C., Sassolas, G., and Borson-Chazot, F. (2004). Interest of Chromogranin A for diagnosis and follow-up of endocrine tumours. *Clinical Endocrinology* 60, 644-652.

O'Toole, D., Grossman, A., Gross, D., Delle Fave, G., Barkmanova, J., O'Connor, J., Pape, U.F., Plockinger, U., Mallorca Consensus Conference, p., and European Neuroendocrine Tumor, S. (2009). ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: biochemical markers. *Neuroendocrinology* 90, 194-202.

Park, Y., Kim, Y., Lee, J.H., Lee, E.Y., and Kim, H.S. (2011). Usefulness of serum anti-p53 antibody assay for lung cancer diagnosis. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 135, 1570-1575.

Poulsen, F., and Jensen, K.B. (2007). A luminescent oxygen channeling immunoassay for the determination of insulin in human plasma. *Journal of biomolecular screening* 12, 240-247.

Prestifilippo, a., and Blanco, G. (2012). Chromogranin A and Neuroendocrine Tumors. *Intechopen* 60, 386-395.

Qiao, X.W., Qiu, L., Chen, Y.J., Meng, C.T., Sun, Z., Bai, C.M., Zhao, D.C., Zhang, T.P., Zhao, Y.P., Song, Y.L., et al. (2014). Chromogranin A is a reliable serum diagnostic biomarker for pancreatic neuroendocrine tumors but not for insulinomas. *BMC Endocrine Disorders* 14, 1-10.

Ralhan, R., Nath, N., Agarwal, S., Mathur, M., Wasylyk, B., and Shukla, N.K. (1998). Circulating p53 antibodies as early markers of oral cancer: Correlation with p53 alterations. *Clinical Cancer Research* 4, 2147-2152.

Rauch, J., and Gires, O. (2008). SEREX, proteomex, AMIDA, and beyond: Serological screening technologies for target identification. *Proteomics - Clinical Applications* 2, 355-371.

Rindi, G., Kloppel, G., Couvelard, A., Komminoth, P., Korner, M., Lopes, J.M., McNicol, A.M., Nilsson, O., Perren, A., Scarpa, A., et al. (2007). TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Archiv* 451, 757-762.

Sahin, U., Tureci, O., Schmitz, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I., and Pfreundschuh, M. (1995). Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* 92, 11810-11813.

Sasajima, Y., Tanaka, H., Miyake, S., and Yuasa, Y. (2005). A novel EID family member, EID-3, inhibits differentiation and forms a homodimer or heterodimer with EID-2. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 333, 969-975.

Sato, S., Tsuchikawa, T., Nakamura, T., Sato, N., Tamoto, E., Okamura, K., Shichinohe, T., and Hirano, S. (2014). Impact of the tumor microenvironment in predicting postoperative hepatic recurrence of pancreatic neuroendocrine tumors. *Oncology Reports* 32, 2753-2759.

Scanlan, M.J., Chen, Y.T., Williamson, B., Gure, a.O., Stockert, E., Gordan, J.D.,

Türeci, O., Sahin, U., Pfreundschuh, M., and Old, L.J. (1998). Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies. *International Journal of Cancer Journal International Du Cancer* 76, 652-658.

Shimada, H., Takeda, A., Arima, M., Okazumi, S., Matsubara, H., Nabeya, Y., Funami, Y., Hayashi, H., Gunji, Y., Suzuki, T., et al. (2000). Serum p53 antibody is a useful tumor marker in superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 89, 1677-1683.

Suppiah, A., and Greenman, J. (2013). Clinical utility of anti-p53 auto-antibody: systematic review and focus on colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology* 19, 4651-4670.

Takahashi, K., Miyashita, M., Nomura, T., Makino, H., Futami, R., Kashiwabara, M., Katsuta, M., and Tajiri, T. (2007). Serum p53 antibody as a predictor of early recurrence in patients with postoperative esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 20, 117-122.

Taketa, K., Endo, Y., Sekiya, C., Tanikawa, K., Koji, T., Taga, H., Satomura, S., Matsuura, S., Kawai, T., and Ilirai, H. (1993). A Collaborative Study for the Evaluation of Lectin-Reactive α -Fetoproteins in Early Detection of Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research* 53, 5419-5424.

Tang, L.H., Contractor, T., Clausen, R., Klimstra, D.S., Du, Y.C., Allen, P.J., Brennan, M.F., Levine, A.J., and Harris, C.R. (2012). Attenuation of the retinoblastoma pathway in pancreatic neuroendocrine tumors due to increased cdk4/cdk6. *Clinical Cancer Research* 18, 4612-4620.

Touzios, J.G., Kiely, J.M., Pitt, S.C., Rilling, W.S., Quebbeman, E.J., Wilson, S.D., and Pitt, H.A. (2005). Neuroendocrine Hepatic Metastases. *Annals of Surgery* 241, 776-785.

Türeci, O., Sahin, U., Zwick, C., Koslowski, M., Seitz, G., and Pfreundschuh, M. (1998). Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

United States of America 95, 5211-5216.

Wolmark, N., Fisher, B., Wieand, H., Henry, R., Lerner, H., Legault-Poisson, S., Deckers, P., Dimitrov, N., Gordon, P., and Jochimsen, P. (2005). The prognostic significance of preoperative carcinoembryonic antigen levels in colorectal cancer. Results from NSABP (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) clinical trials. *Annals of Surgery* 242, 629-630.

Yao, J.C., Hassan, M., Phan, A., Dagohoy, C., Leary, C., Mares, J.E., Abdalla, E.K., Fleming, J.B., Vauthey, J.N., Rashid, A., et al. (2008). One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *Journal Of Clinical Oncology* 26, 3063-3072.

Yuan, F., Shi, M., Ji, J., Shi, H., Zhou, C., Yu, Y., Liu, B., Zhu, Z., and Zhang, J. (2014). KRAS and DAXX/ATRX Gene Mutations Are Correlated with the Clinicopathological Features, Advanced Diseases, and Poor Prognosis in Chinese Patients with Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *International Journal of Biological Sciences* 10, 957-965.

Zatelli, M.C., Torta, M., Leon, A., Ambrosio, M.R., Gion, M., Tomassetti, P., De Braud, F., Delle Fave, G., Dogliotti, L., and Uberti, E.C.d. (2007). Chromogranin A as a marker of neuroendocrine neoplasia: an Italian Multicenter Study. *Endocrine Related Cancer* 14, 473-482.

Zhang, J., Xv, Z., Wu, X., and Li, K. (2012). Potential Diagnostic Value of Serum p53 Antibody for Detecting Esophageal Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* 7.