

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月30日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592238

研究課題名（和文） 顕微質量分析による口腔癌の予後および転移マーカーの研究・分子病理診断法の開発

研究課題名（英文） The study detects the prognosis and metastatic markers of oral cancer by imaging mass spectrometry and develops the molecular pathology diagnostic procedure.

研究代表者

長田 哲次（NAGATA TETSUJI）

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60264058

研究成果の概要（和文）：この研究は画像診断質量分析（IMS）によって視覚化される生体分子分布に基づく癌領域を示した。 m/z 770 と m/z 846 の信号は、各領域の上で分布して明瞭な領域を示した。タンデム型質量分析は、これらの信号を癌領域の m/z 770 はホスファチジルコリン（PC）（16：0/16：1）と間質領域の m/z 846 は PC（18：1/20：4）と確認した。口腔癌領域は IMS 分析によってこれらの PC を用いて明らかに区別され、分子同定は癌浸潤の機序を説明する情報を提供する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to clearly distinguish the border based on the biomolecule distributions visualized by imaging mass spectrometry (IMS) analysis. Two signals at m/z 770 and m/z 846 were distributed on each region and showed a clear border. A tandem mass spectrometry analysis identified these signals as phosphatidylcholine (PC) (16:0/16:1) at m/z 770 on the cancer region and PC (18:1/20:4) at m/z 846 on the stroma region. In conclusion, the cancer region and stromal region of OSCCs were clearly distinguished with the use of these PC species by IMS analysis and the molecular identification can provide important information to elucidate the mechanism in cancer invasion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：臨床腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は、様々な治療法が開発され比較的早期に発見されれば治癒可能な悪性腫瘍であるが進行した症例では予後が悪くなることが多い。早期に発見された症例であっても浸潤転移が発現することがある。一般的に臨床

で用いられている腫瘍マーカーは SCC 抗原であるが必ずしも確実性の高いものとはいえない。口腔癌「転移可能性」を評価できる客観的な評価基準がない。

予後や転移と関連のある生体分子の情報が治療開始前の生検材料であらかじめ判れば

手術切除範囲の設定や化学療法、放射線療法などの治療方針を選択するとき有用である。患者に必要以上の侵襲を加えることなく **quality of life** の向上が望めると考える。

近年、分子生物学の進歩により細胞周期の調節に様々な遺伝子が関与していることが明らかにされてきた。G1→S 期を調節している遺伝子群の異常が細胞の癌化に関わりがあると考えられ、p16INK4A は p53 と Rb と同様、重要な遺伝子であると報告されている。これまで本遺伝子異常について他種類の腫瘍組織における検索がなされてきた。P16INK4A 発現と口腔癌および頸部所属リンパ節転移との関係、p16 が癌発生に引き続いて悪性度にも関連しているか否かについて生検を行った口腔癌のパラフィンブロックより、組織アレイを作成、FISH 法および免疫組織化学的に検討した。その結果、P16INK4A が口腔癌の予後予測マーカーとなり得ることを報告した。

口腔扁平上皮癌において細胞周期促進因子である Pirh2 は高頻度で高発現しており、p27 の発現と逆関数しており Prish2 の高発現は、腫瘍サイズや予後と関連していた。Prish2 は細胞周期のブレーキである p27 を分解することにより腫瘍細胞の増殖に寄与している事を報告した。また、温熱、虚血、感染、放射線等の種々のストレスによって誘導され、蛋白の変性を抑制するとともに、変性した蛋白の修復を行う Heat shock protein27 も口腔癌の予後と関連性を有している事を報告した。

これらの研究結果を基に顕微質量分析の手法を加え、新しいバイオマーカーとなり得る分子を生探索する。

2. 研究の目的

顕微質量分析法は細胞や生体組織の形態観察時に、生体分子を質量分析により同定し、きわめて高い空間分布能で分布測定を行うことができる、新しい手法である。この方法を用い、口腔癌の生検あるいは手術検体の組織中に含まれる生体分子のイメージ化をおこなう。新しい転移および予後マーカーとなりうる物質の同定を試み、分子病理診断法の開発へと発展させる。

3. 研究の方法

凍結材料、パラフィン切片標本を使用し、顕微質量分析装置で分析する。それぞれの症例を臨床病理学的パラメーターに沿った評価（癌の分化度、浸潤様式、病的細胞分裂像の頻度）を行い、質量分析による口腔癌の傾向をとらえ、予後や転移との関連性を求める。

(1)凍結組織を用いた質量顕微鏡法による解析

口腔癌凍結材料を用いた質量分析イメージング解析を行う。凍結切片を材料にした解析においてはリン脂質、糖脂質、コレステロールなどの脂質が主として検出される。2つの連続的な組織切片を作成して1つの断片は質量分析イメージング分析に適用し、他の断片はヘマトキシリン-エオジン (HE) で染色する。質量分析イメージング分析の大量の範囲はリン脂質に集中し、癌の特定のピークはコンピュータソフトウェアを使用して統計解析によって分析された。口腔癌組織における脂質分布について解析し、正常組織との比較を行うことで口腔癌に特異的な物質を明らかにする。癌を差別的に分布する分子を視覚化した。これらの分子を特定するために、タンデム型質量分析 (MS/MS) 分析を行った。

(2)パラフィン包埋組織を用いた質量顕微鏡法による解析

病理学標本として使用されているパラフィン包埋組織はホルムアルデヒドによる固定されているため抗体賦活化の前処理を行った。パラフィン包埋組織を薄切、脱パラフィン処理後、トリブシンによって on-tissue digestion 法を施行した。質量分析イメージング分析の大量の範囲は、癌の特定のピークはコンピュータソフトウェアを使用して統計解析によって分析された。

4. 研究成果

(1)凍結組織の質量顕微鏡法による解析

凍結標本のヘマトキシリン-エオシン染色
口腔癌組織の凍結標本は、術前療法が行われなかった歯肉から得られた。詳細に形態学的な特徴を分析するために、我々はヘマトキシリン-エオシン染色を使用した。病理組織学的診断は高分化型だった。(図1)

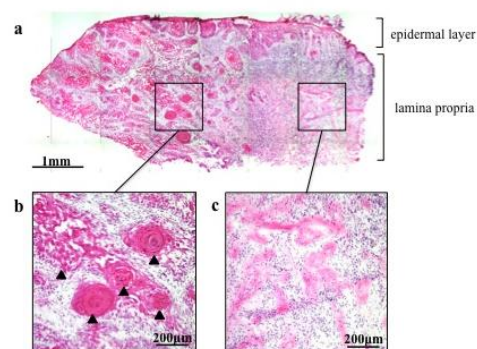


図1.

質量分析イメージング解析後に、各領域からの平均質量スペクトルは、m/z 400-1,200 (図2) で作成された。同位体ピークを除いたトップ 80 のピークは、ソフトウェアを用いて m/z 400-700 から拾われた。

と 850-1,200 で 65 のピークは、各領域の間で信号強度のほとんど違いを示さなかった。一方では、 m/z 700-850 の 15 のピークは、信号強度の違いを示した。15 の信号(m/z 720.1、741.5、748.1、756.6、770.5、772.5、782.6、794.5、796.5、798.5、800.5、804.5、820.5、824.6、および 846.6 であった)は、図 3 の中のイオン像として視覚化される。さまざまな分布は、イメージングによって視覚化された。 m/z 804.5、820.5 と 846.6 はリンパ球を含む間質領域で分布を示し、 m/z 720.1、770.5 と 794.5 のイオン像は癌細胞を含む癌領域で明らかに分布を示した。 m/z 741.5、748.1、756.6、772.5、782.6、796.5、798.5、800.5、および 824.6 の他の信号は、有意差なしで全部の領域で分布した。

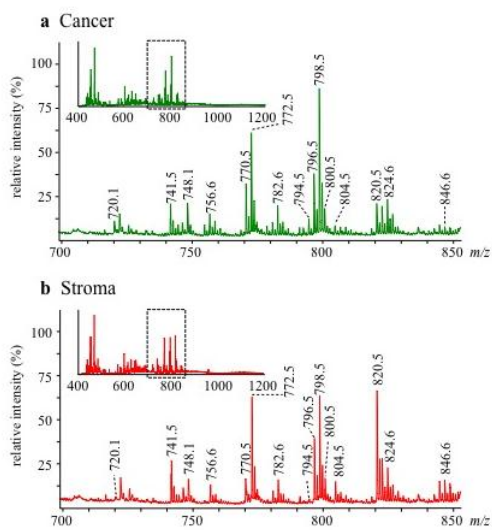


図 2.

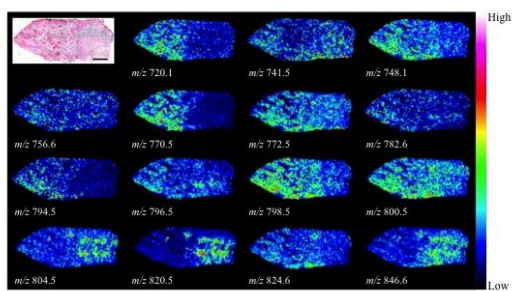


図 3.

癌と間質領域の間に有意差を明らかにするために、 m/z 700-850 で、15 のピークにウェルチの t 検定を使用した。表 1 で示すように、11 のピークは、有意に異なった。6 つの分子 (m/z 720.1、770.5、794.5、804.5、820.5、846.6) は癌と間質領域の間に有意差を示した。これらは図 4 の中の棒グラフとして示される。 m/z 720.1、770.5、794.5 の信号は、

癌領域で増加し、 m/z 804.5、820.5、846.6 の信号は、間質領域で増加した。

表 1 Molecular screening using Welch's t -test

m/z	Signal intensity (a.u.)		p-values
	Cancer	Stroma	
770.5	27.8 ± 0.9	7.1 ± 0.2	1.60E-78
820.5	14.6 ± 0.5	53.9 ± 1.9	2.70E-68
846.6	5.1 ± 0.2	12.4 ± 0.4	1.73E-62
794.5	10.2 ± 0.3	3.7 ± 0.1	1.51E-59
720.1	8.3 ± 0.3	4.4 ± 0.1	2.44E-38
804.5	5.7 ± 0.2	11.4 ± 0.4	1.58E-33
741.5	14.8 ± 0.5	22.3 ± 0.8	2.56E-16
798.5	69.4 ± 2.0	52.2 ± 1.5	2.15E-11
748.1	16.6 ± 0.5	13.1 ± 0.4	1.31E-07
782.6	14.9 ± 0.4	12.5 ± 0.4	2.67E-05
756.6	11.5 ± 0.4	10.0 ± 0.3	1.13E-03

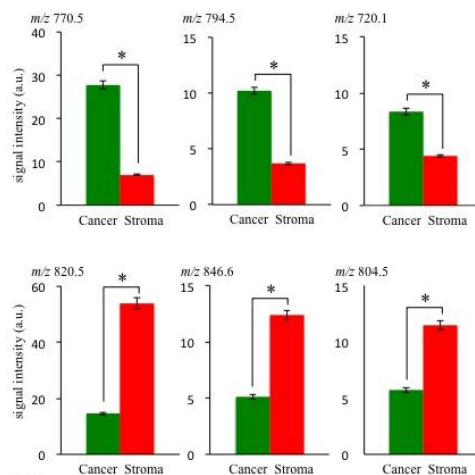


図 4.

我々は症例 2-5 に関して質量分析イメージング解析を実行した。それは高分化型で、症例 1 の場合のように癌と間質領域の間に有意に異なった値を適用した。これらのは、図 5 の中のイオン像として視覚化される。イオン像は m/z 720.1、770.5、794.5 は癌領域で陽性であった。対照的に、 m/z 804.5、820.5、846.6 は間質領域で陽性であった。 m/z 770.5 と 846.6 の合併されたイメージは重なりなしで癌と間質領域の分布を示す。そして、辺縁は HE で染色した断片のそれらより明らかに視覚化される。

組織切片の MS/MS 分析は、生体分子の構造を特定するために行われた。 m/z 770.5 に対応している分子は $[PC + K]^+$ に割り当てられた。同様に、 m/z 846.6 に対応している分子は PC (diacyl-18:1/20:4) の $[M + K]^+$ イオンとして割り当てられた。

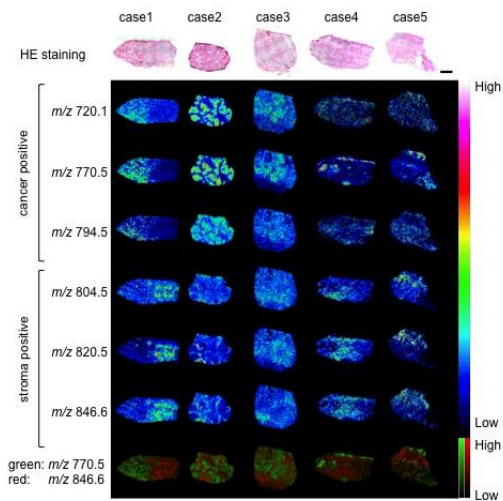


Fig 5.

(2)パラフィン包埋組織の処理および質量顕微鏡法による解析

臨床病理学的評価を行った試料の組織を顕微質量分析し、相互の比較を行った。通常病理学標本として使用されているパラフィン包埋組織を薄切片し、切片を脱パラフィン後トリプシンによって on-tissue digestion 法を施し断片化させ顕微質量分析を行った。癌の分化度で比較、高分化型、未・中分化型ともに 72 個のピークを検出、特に m/z 433.3、435.5、457.6、651.5 にピークを認めた。また、マン・ホイットニーの U 検定を行ったところ m/z 878.6、755.3、590.4、648.3、416.2 以上に有意差を認められた。

口腔癌領域は質量分析イメージング分析によってこれらのホスファチジルコリンを用いて明らかに区別され、分子同定は癌浸潤の機序を説明する情報を提供する。

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 2 件)

Yoshiyuki Uchiyama, Takahiro Hayasaka, Noritaka Masaki, Yoshiko Watanabe, Kazuma Masumoto, Tetsuji Nagata, Fuminori Katou, and Mitsutoshi Setou Imaging mass spectrometry distinguished the cancer and stromal regions of oral squamous cell carcinoma by visualizing phosphatidylcholine (16:0/16:1) and phosphatidylcholine (18:1/20:4) Analytical and Bioanalytical Chemistry. 査読あり、2013、(in press)

Hirokazu Hirano, Noritaka Masaki, Takahiro Hayasaka, Yoshiko Watanabe,

Kazuma Masumoto, Tetsuji Nagata, Fuminori Katou, and Mitsutoshi Setou. Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry revealed traces of dental problem associated with dental structure. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 査読あり、2013、(in press)

〔学会発表〕(計 1 件)

内山佳之、早坂孝宏、正木紀孝隆、加藤文度、瀬藤光利、質量分析イメージングを用いたヒト口腔扁平上皮癌のホスファチジルコリンの分布解析、日本医用マススペクトル学会

〔図書〕(計 1 件)

瀬藤光利、他、学祭企画、病気の分子形態学総論 質量顕微鏡法、2011、370

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長田 哲次 (NAGATA TETSUJI)
浜松医科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60264058

(2) 研究分担者

瀬藤 光利 (SETOU MITSUTOSHI)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：20302664

倉部 誠也 (KURABE NOBUYA)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：60466737

小野寺 麻記子 (ONODERA MAKIKO)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：20443963

(3) 連携研究者

()

研究者番号：