

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21250

研究課題名(和文) FFPE組織を用いた比較プロテオミクスによる高分化型脂肪肉腫のバイオマーカー探索

研究課題名(英文) Comparative proteomics of FFPE tissue for Exploring biomarker of well differentiated liposarcomas

研究代表者

青山 智志 (Aoyama, Tomoyuki)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50737781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で我々は、FFPE組織を用いた比較プロテオミクスにより、高分化型脂肪肉腫(ATL/WDL)にユニークな181個のタンパク質を同定し、最終的にATL/WDLマーカー候補としてCCDC180とLRRC4に注目した。CCDC180とLRRC4の免疫組織化学により、ALT/WDLと脱分化型脂肪肉腫の腫瘍細胞は明瞭に染色され、脂肪肉腫と脂肪腫を高い精度で染め分けられた。我々はさらに、細胞生物学的手法を用い、脂肪肉腫細胞におけるCCDC180とLRRC4の発現についても検討した。それらの発現は、脂肪肉腫において脂肪細胞分化に関連し悪性度に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, comparable proteome analysis of FFPE tissues revealed multiple candidate marker molecules for differentiating atypical lipomatous tumor/well-differentiated liposarcoma (ALT/WDL) from lipoma. We identified 181 unique proteins for ALT/WDL. Of the identified proteins, we finally focused on CCDC180 and LRRC4 as candidate markers of ALT/WDL. We showed that CCDC180 and LRRC4 immunohistochemistry clearly stained tumor cells of ALT/WDL and dedifferentiated liposarcoma and could differentiate them from lipoma with high accuracy. We also used cell biological methods to further examine the expression of the CCDC180 and LRRC4 in liposarcoma cells. Their expression was associated with adipocyte differentiation and contributed to malignant potentials of liposarcoma cells.

研究分野：医学

キーワード：FFPE ALT/WDL Proteomics

1. 研究開始当初の背景

プロテオミクスはタンパク質を網羅的に解析する技術の総称である。近年、バイオマーカーの探索などを目的に、質量分析法 (mass spectrometry) を基盤としたプロテオミクスの利用が端緒についている。

ホルマリン固定・パラフィン包埋 (formaldehyde fixed paraffin embedded; FFPE) は、医療施設において最も一般的な組織標本保存法である。FFPE 組織には、患者の詳細な情報がタグ付けされており、後ろ向き研究材料として適している。

FFPE 組織では、ホルマリン固定によりメチレン架橋などのタンパク質の強固な変性が加わり、長期にわたる保管を可能としている。一方、そのタンパク質の変性が FFPE 組織のタンパク質研究用試料としての利用を極めて限定させ、これまでは免疫組織化学法 (以下、免疫染色) による特定タンパク質の発現解析に利用されるのみであった。近年、質量分析法の目覚ましい進歩とタンパク質抽出法の改良により、FFPE 組織中に含まれるタンパク質を網羅的に解析するプロテオミクスへの利用が端緒についている。FFPE 組織を用いたプロテオミクスを可能にすることは、FFPE 組織として保管されたあらゆる疾患がバイオマーカー探索の対象となり得ることを意味しており、非常に意義高い。

高分化型脂肪肉腫 (atypical lipomatous tumor/well-differentiated liposarcoma: ALT/WDL) は、脂肪腫と形態学的に類似するが、遠隔転移の重要なリスクである脱分化が起こるため、脂肪腫と ALT/WDL の鑑別は非常に重要である。通常、ATL/WDL で異常増幅する MDM2、CDK4 などを、FISH、PCR および免疫染色で検出することで、両者の鑑別を行っている。FISH や PCR による遺伝子レベルでの増幅検出が高精度であるが、遺伝子検査には特殊な検査環境が必要であり一般的な医療施設での実施は難しい。免疫染

色による検出は汎用性に優れるが、非特異的な反応、染色性の判定に苦慮するなどの問題がある。以上のような背景から、ALT/WDL の判別に利用可能な新たな診断マーカーが求められている。

2. 研究の目的

以上の背景より、本研究では、FFPE 組織を用いた比較プロテオミクスを行い、ALT/WDL と脂肪腫を鑑別する診断マーカーの同定を試みた。

3. 研究の方法

2006 年より 2017 年までに当院整形外科等で切除・診断された、脂肪腫 25 例、ALT/WDL 22 例、脱分化型脂肪肉腫 (DDL) 18 例の手術材料を用い、プロテオミクスおよび免疫染色を行った。初めに脂肪腫 4 例と ALT/WDL 4 例を用いた比較プロテオミクスより ALT/WDL にユニークなタンパク質を同定し、診断マーカー候補とした。それらを標的とした免疫染色を脂肪腫、ALT/WDL および DDL で行い、脂肪腫と脂肪肉腫の判別能について解析した。診断マーカー候補分子について、脂肪肉腫細胞株 SW872 と 93T449 (well-differentiated liposarcoma 由来) を用い、増殖・遊走・浸潤能、抗アポトーシス効果および脂肪細胞分化との関連について検証した。

4. 研究成果

以下の結果をまとめ、論文として報告した (業績 1)。

脂肪細胞性腫瘍の FFPE 組織を用いたプロテオミクスにより、脂肪滴の形成、脂肪代謝に関連するタンパク質、既知の脂肪細胞性腫瘍マーカー HMGI-C を含め、809 個のタンパク質が同定された。これらの中には、ALT/WDL にユニークなタンパク質が 181 個含まれていた。

プロテオミクスにより脂肪肉腫の診断マーカーの候補タンパク質として CCDC180、LRRC4、chymase を抽出した。

CCDC180、LRRC4 の免疫染色で、ATL/WDL および DDL の腫瘍細胞に強い染色性が見られ、脂肪腫と脂肪肉腫の鑑別での有用性が確認された。

脂肪肉腫細胞株で CCDC180、LRRC4 の発現が確認された。

CCDC180 の発現抑制で、脂肪肉腫細胞株の増殖・遊走・浸潤能、抗アポトーシス効果が抑制された。脂肪細胞分化を誘導すると CCDC180 の発現が低下した。

LRRC4 の発現抑制で、脂肪肉腫細胞株の増殖能は抑制され、浸潤能は促進された。脂肪細胞分化を誘導すると LRRC4 の発現が低下した。

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 8 件)

1. Aoyama T, Takasawa A, Takasawa K, Ono Y, Emori M, Murata M, Osanai M, Yamashita T, Hasegawa T, Sawada N. Identification of CCDC180 and LRRC4 as potential immunohistochemical markers for liposarcoma based on proteomic analysis using formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Oncotarget*. in Press. (査読あり)
2. Aoki H, Yamamoto E, Takasawa A, Niinuma T, Yamano HO, Harada T, Matsushita HO, Yoshikawa K, Takagi R, Harada E, Tanaka Y, Yoshida Y, Aoyama T, Eizuka M,

Yorozu A, Kitajima H, Kai M, Sawada N, Sugai T, Nakase H, Suzuki H. Epigenetic silencing of SMOC1 in traditional serrated adenoma and colorectal cancer. *Oncotarget*. 9, 4707-4721, 2018. (査読あり)

3. Takasawa K, Takasawa A, Osanai M, Aoyama T, Ono Y, Kono T, Hirohashi Y, Murata M, Sawada N. Claudin-18 coupled with EGFR/ERK signaling contributes to the malignant potentials of bile duct cancer. *Cancer Lett*. 403, 66-73, 2017. (査読あり)
4. Sugita S, Aoyama T, Ito Y, Asanuma H, Sugawara T, Segawa K, Ito Y, Kikuchi N, Tsujiwaki M, Fujita H, Ono Y, Hasegawa T. Diagnostic utility of automated SureFISH (Dako Omnis) in the diagnosis of musculoskeletal translocation-related sarcomas. *Pathol Int*. 67, 510-513, 2017. (査読あり)
5. Ueda A, Takasawa A, Akimoto T, Takasawa K, Aoyama T, Ino Y, Nojima M, Ono Y, Murata M, Osanai M, Hasegawa T, Saito T, Sawada N. Prognostic significance of the co-expression of EGFR and HER2 in adenocarcinoma of the uterine cervix. *PLoS One*. 12, 1-13, 2017. (査読あり)
6. Sugita S, Arai Y, Aoyama T, Asanuma H, Mukai W, Hama N, Emori M, Shibata T, Hasegawa T. NUTM2A-CIC fusion small round cell sarcoma: a genetically distinct variant of CIC-rearranged sarcoma. *Hum Pathol*. 65, 225-230, 2017. (査読あり)

7. Sugita S, Hirano H, Kikuchi N, Kubo T, Asanuma H, Aoyama T, Emori M, Hasegawa T. Diagnostic utility of FOSB immunohistochemistry in pseudomyogenic hemangioendothelioma and its histological mimics. Diagn Pathol. DOI:10.1186/s13000-016-0530-2, 2016. (査読あり)
8. Akimoto T, Takasawa A, Murata M, Kojima Y, Takasawa K, Nojima M, Aoyama T, Hiratsuka Y, Ono Y, Tanaka S, Osanai M, Hasegawa T, Saito T, Sawada N. Analysis of the expression and localization of tight junction transmembrane proteins, claudin-1, -4, -7, occludin and JAM-A, in human cervical adenocarcinoma. Histol Histopathol. 31: 921-931, 2016. (査読あり)

[学会発表](計3件)

1. 青山智志 他: 平滑筋肉腫の FFPE 組織標本を用いた新規バイオマーカー探索の試み. 第42回日本医用マススペクトル学会年会 2017年9月14-15日 一橋講堂(東京都千代田区)
2. 青山智志 他: 平滑筋肉腫の FFPE 組織標本を用いた新規バイオマーカー探索の試み. 第96回北海道医学大会病理部会・第49回北海道病理談話会 2016年10月15日 北大医学部学友会館(北海道札幌市)
3. 青山智志 他: FFPE 組織を用いた比較プロテオミクスによる高分化型脂肪肉腫のバイオマーカー探索. 第105回日本病理学会総会 2016年5月12-14日 仙台国際センター(宮城県仙台市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

青山 智志(TOMOYUKI AOYAMA)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号: 50737781

(2)研究分担者

(3)連携研究者