

令和 4 年 8 月 31 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09562

研究課題名(和文) 質量分析イメージング解析による口腔粘膜前癌病変の糖鎖構造プロファイル

研究課題名(英文) Glycan profiling of oral precancerous lesions using Mass Spectrometry Imaging

研究代表者

江原 道子 (Ehara, Michiko)

朝日大学・歯学部・講師

研究者番号：10425308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：口腔粘膜において前癌病変と位置づけされている上皮性異形成および悪性の上皮内癌および扁平上皮癌と診断された病理組織標本を用いて、病理標本上で存在する物質の質量を可視化するとともに定量的に解析可能な方法であるマトリックス支援レーザー脱離イオン化法による質量顕微鏡解析(MALDI-IMS)を行い、口腔前癌病変と正常部における糖鎖構造改変現象を網羅的に定量化した。その結果、正常から上皮性異形成、上皮内癌および扁平上皮癌へと病変が移行するのに伴って変化する糖鎖構造が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔がんは全悪性腫瘍のわずか3%程度の稀少がんであるが、本邦における死亡者数は緩やかに増加傾向を示しており、早期発見・早期治療が望まれる。口腔において悪性腫瘍に移行する可能性が高いと考えられている口腔上皮性異形成の有力な候補遺伝子・診断マーカー・抗体の確立が期待されているものの、未だ確立されていないのが現状である。また糖鎖構造のもつ種特異性、細胞特異性、細胞の分化段階特異性という特長を利用して癌化による糖鎖構造改変現象を詳細に解明することは、患者主体の医療を目標とした創薬にも密接に関係しているため、臨床的にも大きな意味を持っており、口腔前癌病変の糖鎖構造改変現象を解明することは急務である。

研究成果の概要(英文)：We comprehensively and quantitatively analyzed the differences in glycosylation phenomena between oral precancerous lesions and normal areas using histopathological specimens of epithelial dysplasia, which is positioned as a precancerous lesion in the oral mucosa, and malignant intraepithelial carcinomas and squamous cell carcinomas. Mass microscopic analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-IMS), a method that enables visualization and quantitative analysis of the mass of substances present on pathological specimens, was used for the analysis. The results revealed the glycan structures that change as the lesion progresses from normal to epithelial dysplasia, intraepithelial carcinoma, and squamous cell carcinoma.

研究分野：病理学

キーワード：口腔がん 口腔上皮性異形成 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

糖鎖生物学の分野では、基礎の研究者のみならず臨床医からも、現在活用されている診断・予後マーカーを凌ぐ糖鎖関連マーカーの開発が望まれており、全身諸臓器における悪性腫瘍について研究がなされている。最近の研究では、産総研・成松らのグループにより、癌細胞の MUC1 における O 型糖鎖構造変化についての報告¹⁾や進行性胃癌のリンパ節転移と糖鎖構造変化の関連についての報告²⁾など、Functional Glycomics と発癌、進展評価および予後に関する研究が活発になされている。また、疾患糖鎖マーカーの先駆けとしては、肝臓の線維化や胆管癌を対象として、血液検査による線維化の進展評価および胆汁や血液を用いた癌関連分子の検出を可能としている³⁾。しかしながら本邦はもとより国際的にも、口腔前癌病変に対して、糖鎖関連遺伝子の検索や新規診断マーカーの開発を目的とした網羅的な糖鎖構造解析は未だなされていない。本研究により口腔前癌病変に特異的な糖鎖構造および糖鎖関連遺伝子を特定し、糖鎖改変現象を解明することは、臨床応用可能でかつ信頼性の高い新規診断マーカー開発のみならず、新規糖鎖創薬につながる研究基盤を確立することができると思われる。

2. 研究の目的

口腔前癌病変の糖鎖構造改変現象解明の重要度

口腔前癌病変の病理診断は、WHO 分類の指針を基準として診断されているが、口腔粘膜の部位特異性を考慮したものではないため、病理医の病理診断基準にも大きな差異がみられ、有力な候補遺伝子・診断マーカー・抗体の確立が期待されている。また糖鎖構造のもつ種特異性、細胞特異性、細胞の分化段階特異性という特長を利用して癌化による糖鎖構造改変現象を詳細に解明することは、新規診断マーカーの確立のみならず、患者主体の医療を目標とした創薬にも密接に関係しているため、臨床的にも大きな意味を持っている。口腔がんの死亡者数は未だ増加傾向にあり、早期発見・早期治療へ導くためにも口腔前癌病変の糖鎖構造改変現象を解明することは急務である。

MALDI-IMS 解析の利点

糖鎖研究は口腔病変においても以前からレクチン染色を用いた比較解析や、癌の浸潤・転移に関する研究が行われてきた⁴⁾⁻⁶⁾が、前癌病変における糖鎖構造やその機能について詳細な解析を行えるだけの研究技術が確立されていなかった。近年、微量な糖鎖構造を解析する技術の進歩によって糖鎖合成、糖鎖構造解析機器の開発が可能となり、バイオマーカーとしての糖鎖が再び見直されてきている。さらに、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法による質量顕微鏡解析 (MALDI-IMS) が開発され⁷⁾、組織標本上で様々な分子の質量分析が可能となり、糖鎖研究においても糖蛋白質だけでなく、糖脂質についても MALDI-IMS を用いた解析法が確立されてきた⁸⁾⁹⁾。最新の解析技術を駆使すれば、糖鎖構造のもつ種特異性、細胞特異性、細胞の分化段階特異性という特長を、癌、免疫、再生医療、生殖医療に応用可能な糖鎖研究となる。特に癌化による糖鎖構造の変化は診断や癌のメカニズム解明、糖鎖創薬とも密接に関係するため、臨床的にも大きな意味を持っている。

また、口腔前癌病変の分子生物学的解析は PCR 法や質量分析法等により解明されることが大部分であるが、解析試料を分離・精製しなければならぬため、病変部での局在や分布状況が不明になる。MALDI-IMS 解析では組織標本上での分布が可視化され、さらに数値化されるため、客観的・定量的に解析することができる。このことは、病変の細胞とその増殖パターンから診断を行う病理医にとって画期的な解析方法で、正確な診断はもちろんの事、患者の治療に直結する創薬につながる成果を期待できる。

本研究の研究代表者は、以前より専門としている糖鎖¹⁰⁾¹¹⁾を用いた新規診断マーカーの開発を目的として新たな研究を立ちあげ、レクチンマイクロアレイ解析等を用いた比較解析により、前癌病変に特異的な糖蛋白質関連糖鎖構造を明らかにしている¹²⁾¹³⁾。この糖蛋白質関連糖鎖構造に関する解析過程において、糖脂質に関する糖鎖改変現象の解明なしでは、口腔前癌病変における糖鎖構造改変現象の詳細を明らかにすることは困難であることが示唆された。また本研究では、患者より採取した病理組織標本を対象としているが、糖鎖は種特異性があり動物実験で代用することが出来ないため、ヒトの組織標本を用いることが必須かつ重要であると考えた。したがって本研究により、MALDI-IMS 解析を用いて口腔前癌病変と正常部における網羅的解析を行い、詳細な糖鎖構造を定量的に解明し、さらに特徴的な糖鎖に関連する遺伝子の局在を可視化することにより、早期にヒトでの臨床応用可能な新規グライコバイオマーカーの確立のみならず、糖鎖創薬の基盤となる糖鎖機能を解明する。

<References>

1. Matsuda, A. *et al.* Lectin Microarray-Based Sero-Biomarker Verification Targeting Aberrant O-Linked Glycosylation on Mucin 1. *Anal. Chem.* 87, 7274–7281 (2015).
2. Ishido, K. *et al.* Chemoradiotherapy for patients with recurrent lymph-node metastasis or local recurrence of gastric cancer after curative gastrectomy. *Jpn. J. Radiol.* 34, 35–42 (2016).

3. Kuno, A. *et al.* Multilectin assay for detecting fibrosis-specific glyco-alteration by means of lectin microarray. *Clin. Chem.* 57, 48–56 (2011).
4. Hyun, K., Nakai, M., Kawamura, K. & Mori, M. Histochemical studies of lectin binding patterns in keratinized lesions, including malignancy. 337–351 (1984).
5. Saku, T. & Okabe, H. Differential lectin-binding in normal and precancerous epithelium and squamous cell carcinoma of the oral mucosa. *J. Oral Pathol. Med.* 18, 438–445 (1989).
6. Kannan, S. *et al.* Expression of lectin-specific cellular glycoconjugates during oral carcinogenesis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 119, 689–694 (1993).
7. Cornett, D. S. *et al.* A novel histology-directed strategy for MALDI-MS tissue profiling that improves throughput and cellular specificity in human breast cancer. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 1975–83 (2006).
8. Powers, T. W. *et al.* MALDI imaging mass spectrometry profiling of N-glycans in formalin-fixed paraffin embedded clinical tissue blocks and tissue microarrays. *PLoS One* 9, e106255 (2014).
9. 山崎文義, 瀬藤光利. トピックス: 質量分析技術の臨床検査応用 (5) 質量分析イメージング法による病理組織解析. *臨床病理* 63, 472–480 (2015).
10. Ehara, M., Ohno, J., Iwahashi, T., Okamura, K. Taniguchi, K. The Influence of Cryopreservation on the Oligosaccharide Expression of Tooth Germ-Sugar Chain Expression of Frozen Tooth Germs-. *J. Hard Tissue Biol.* 14, 103–105 (2005).
11. Ohno, J., Iwahashi, T., Ehara, M. Taniguchi, K. Alterations in PNA binding of keratinocytes in oral keratosis. *Biotech. Histochem.* 86, 168–73 (2011).
12. Michiko Ehara, Motohiko Nagayama, Juna Nakao, Jun-ichi Tanuma. Potential for using lectin sugar chains as diagnostic markers in oral precancerous lesions, *Glycobiology* 24 1214-1215, 2014
13. Michiko Ehara, Kiyoko F. Aoki-Kinoshita, Motohiko Nagayama, Juna Nakao, *et al.* Glycan profiling of oral precancerous lesions using a lectin microarray. 6th Charles Warren Workshop. pp86, 2016

3. 研究の方法

MALDI-IMS を用いた病理組織切片上での糖鎖発現および局在の解析

朝日大学医科歯科医療センターにて生検および切除され口腔上皮性異形成 (OED), 上皮内癌 (CIS) および扁平上皮癌 (SCC) と診断した症例のホルマリン固定パラフィン標本 (FFPE) を用いて, MALDI-IMS による解析を行なった. MALDI-IMS 解析機器には, 浜松医科大学「原子・分子の顕微イメージングプラットフォーム(令和2年度まで)」共同利用により MALDI-TOF/TOF 型質量分析イメージング装置 (iMScope 機, 島津製作所, 京都) と, コロナ禍により浜松医科大学における解析が困難となったため, 株式会社ミルイオンへの受託解析によりイメージング質量顕微鏡 iMScope TRIO (島津製作所, 京都) を用いた. なお, 本研究では糖鎖構造の網羅的解析を予定していたが, 前処理の条件によっては再現性が得られなかったため, 予備実験により最も糖鎖構造が変化していることが示唆されている N 型糖鎖に着目して解析を行った. 試料は 8 μm の厚さにて FFPE 切片を作製した. スライドガラスは抵抗値 ITO コートスライドガラス(松浪硝子工業株式会社, 岸和田市) 用いた. FFPE 切片は脱パラフィン後に賦活化処理を施し, PNGase F により N-結合型糖鎖切断反応を行い前処理とした. 質量分析は, 真空蒸着後, マトリックスをマニュアルスプレー (20mg/ml 70%MeCN-0.1%TFA) にて噴霧した. マトリックスには a-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (-CHCA) を用いた. 測定モードはポジティブ, 質量範囲は 1000-2500, データ解像度は 40 μm で測定した. データの解析には IMAGEREVEAL (島津製作所) を用いた. イメージング解析後, 標本は H-E 染色を施し解析領域を同一切片により指定した.

インフォマティクス解析による口腔粘膜前癌病変に特徴的な糖鎖構造の解明

MALDI-IMS 解析の結果を用いて, 病変部と正常部それぞれより定量的に測定された値の比較およびインフォマティクス解析を行い, 病変に特徴的な糖鎖構造に優先順位をつけた. データベースは研究分担者である木下らが開発した GlyCosmos Portal (The Japanese Society for Carbohydrate Research; <https://glycosmos.org>) を用いた.

本研究で用いたすべての標本について患者の同意を得ており, 研究内容については朝日大学歯学部倫理審査委員会の審査により承認されている (承認番号: 26172 号, 題名: 口腔疾患の発生機構を解明するための病理組織学および分子生物学的検索). また個人情報保護を遵守することも, 患者の同意および倫理審査委員会の審査にあたり適正な手続きを経て行った. また, 浜松医科大学設置の機器使用については, 「文部科学省: 先端研究基盤共用促進事業 (共用プラットフォーム形成支援プログラム) 原子・分子の顕微イメージングプラットフォーム」および浜松医科大学倫理委員会による承認を経て実施した.

4. 研究成果

MALDI-IMS を用いた病理組織切片上での糖鎖発現および局在の解析

MALDI-IMS 解析では, 60 種類の N 型糖鎖が検出された. 検出された糖鎖構造を Symbol Nomenclature for Glycans (SNFG) にて表記し, 表 1 に示す. 正常部で最も蓄積されている糖鎖は H5N2F0 で, OED および CIS では正常と比較してより多く蓄積されており, SCC ではさらに高くなっていった (図 1). また, H5N4F0 も蓄積量は異なっているが, H5N2F0 と同様に, 正常部より OED, CIS および SCC で高値を示していた. また H5N4F1 も正常と比較して病変部で高値を示しており, 特に浸潤最先端部ではより高値を示していたが, 浸潤部周囲間質においてもさらに著名な蓄

表 1 検出された代表的な糖鎖構造

| No. | symbol | theoretical mass [M+H] ⁺ | detected mass m/z | error(ppm) | average intensity SCC | average intensity OED&CIS |
|-----|--------|-------------------------------------|-------------------|------------|-----------------------|---------------------------|
| 1 | H5N2F0 | 1257.4231 | 1257.418 | 4.4 | 15709.803 | 44839.814 |
| 10 | H4N4F0 | 1501.5291 | 1501.499 | 20.1 | 109208.734 | 27173.888 |
| 20 | H5N4F1 | 1809.6398 | 1809.648 | -4.6 | 77668.611 | 13751.72 |
| 6 | H6N2F0 | 1419.4759 | 1419.464 | 8.2 | 77447.804 | 13560.788 |
| 2 | H3N3F1 | 1282.4548 | 1282.440 | 11.2 | 70915.932 | 32274.673 |
| 15 | H5N4F0 | 1663.5819 | 1663.584 | -1.3 | 66327.282 | 10483.433 |
| 7 | H4N3F1 | 1444.5076 | 1444.501 | 4.8 | 63964.928 | 17308.961 |
| 3 | H4N3F0 | 1298.4497 | 1298.444 | 4.2 | 61485.705 | 21065.32 |
| 8 | H5N3F0 | 1460.5025 | 1460.498 | 2.9 | 31416.627 | 19556.35 |
| 14 | H4N4F1 | 1647.587 | 1647.582 | 2.9 | 22285.019 | 6410.3 |

H:Hex, N:HexNAc, F:Fuc

積を認めた(図1)。

また、OED および CIS 直下の間質や浸潤部周囲の間質にて、H5N2F0、H5N4F1、H4N3F0 および H6N2F0 が高度の蓄積を認めた。

以上より、正常から OED、CIS および SCC へ腫瘍性に变化するとともに、糖鎖構造改変が生じるとともに、間質成分と関連する可能性が示唆された。

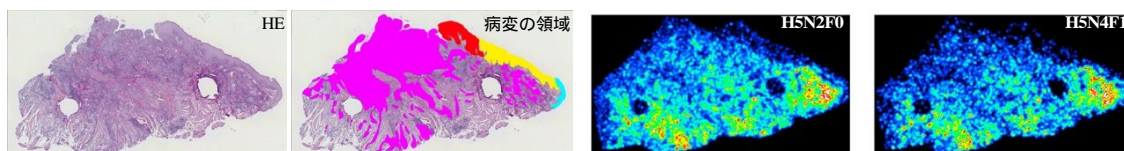


図1 MALDI-IMS 解析画像(SCC, CIS, OED, 正常部)

インフォマティクス解析による口腔粘膜前癌病変に特徴的な糖鎖構造の解明

MALDI-IMS 解析の結果を用いて、病変部と正常部それぞれより定量的に測定された値より、糖鎖構造が改変されている可能性が高い N 型糖鎖について、それぞれ具体的な構造について、GlyCosmos Portal を用いて検索した結果の一部を図2に示す。

H5N2F0 は結合部位が不明であるが、IUPAC 表記で Man [Man]Man[Man]ManGlcNAcGlcNAc- で表記される GlyTouCan ID が G44147IO の構造や、ManMan[ManMan]ManGlcNAcGlcNAc (G74524AQ) などの構造が考えられた。

H5N4F0 は GlcNAcMan[Man]Man[GlcNAc][Man]ManGlcNAcGlcNAc- (G74951ME) の bisecting GlcNAc 結合を持つ構造などが考えられた。

H5N4F1 は GalGlcNAcMan [GalGlcNAcMan]ManGlcNAc [Fuc]GlcNAc- (G52069SB) などの構造が考えられた。

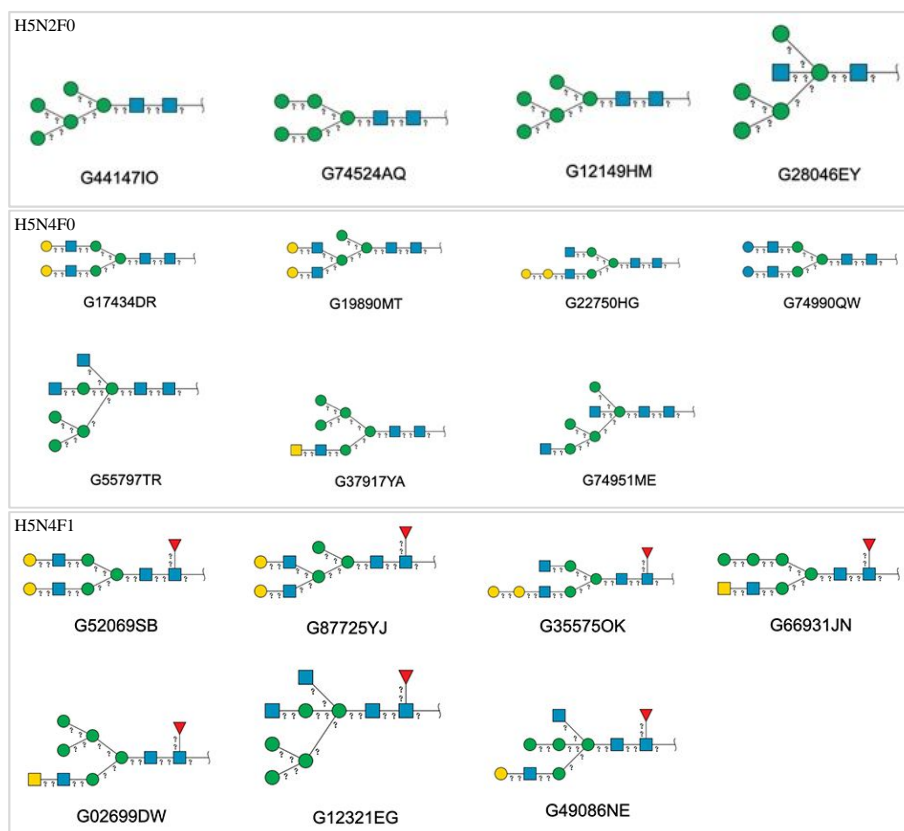


図2 GlyCosmos Portal 解析結果(抜粋)

これらの結果より、正常な粘膜上皮細胞が腫瘍性増殖能を獲得し、増殖、浸潤する過程において、N-acetylglucosamine や fucose の付加が重要な役割を担っている可能性が示唆された。本研究課題の研究期間において、MALDI-IMS 解析における前処理方法の再現性に最も時間を要したが、MALDI-IMS 解析を用いた N 型糖鎖の解析方法が確立されたことは、FFPE 切片において局在を確認しながら定量的解析を可能にしたことで、今後の発展が期待できると考える。また正常から OED、CIS および SCC への変化に伴って改変すると考えられる糖鎖構造およびその改変の流れが多経路にわたっているため、今後は病理組織学的に再現性を確認していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 中尾 寿奈 (Nakao Juna) (30734173) | 朝日大学・歯学部・助教 (33703) | |
| 研究分担者 | 永山 元彦 (Nagayama Motohiko) (50298436) | 朝日大学・歯学部・教授 (33703) | |
| 研究分担者 | 木下 聖子 (Aoki-Kinoshita Kiyoko F.) (50440235) | 創価大学・糖鎖生命システム融合研究所・教授 (32690) | |

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|----------------------------------|----|
| 研究協力者 | 瀬藤 光利 (Setou Mitsutoshi) (20302664) | 浜松医科大学・医学部・教授 (13802) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|