

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591956

研究課題名（和文） プロテオミクス解析による子宮頸癌の放射線治療抵抗性予測

研究課題名（英文） Proteomic prediction of radiotherapy outcome in cervical cancer

研究代表者

安里 剛 (ASATO TSUYOSHI)

国立大学法人琉球大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：40253950

研究成果の概要（和文）：

本研究は子宮頸癌症例の放射線治療効果を予測するためのマーカー分子を探索する基礎研究である。具体的には、化学療法放射線療法同時併用療法（CCRT）に対して感受性の高かった症例群と、抵抗性を示した症例群について、治療前生検標本のタンパク質発現プロファイルを網羅的に比較し、発現に差のあるタンパク質を同定した。その結果、感受性群のみで発現するタンパク質が8種類、抵抗性群のみで発現するタンパク質が16種類見出された。

研究成果の概要（英文）：

The present study was conducted in order to obtain data that serve as a basis for developing novel molecular markers for prediction of the outcome of radiotherapy in patients with cervical cancer. Subjects were selected from cases that were sensitive or resistant to the concurrent chemoradiotherapy (CCRT). Comprehensive protein expression profiles of pre-therapy biopsy specimen were compared between the sensitive and resistant cases. Eight proteins were identified that were expressed only in sensitive cases, while 18 proteins were identified that were expressed only in resistant cases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
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：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：子宮頸癌、放射線治療

## 1. 研究開始当初の背景

琉球大学病院では常に年間150例を越える子宮頸癌の治療を行ってきたが、FIGO分類III期症例の放射線治療抵抗例は切実な問題であった[“子宮頸癌”戸板、長井 他「早期のがん治療法の選択-放射線治療」山田章吾 編 pp.169-179. 金原出版 2006]。

III期症例の8割（年間～30例）に化学療法放射線療法同時併用療法（concurrent chemoradiotherapy, CCRT）を施行し、50 Gyの外部照射、18 Gyの腔内照射を行っていた。症例はCCRTへの治療応答性から下記の3群に分類できた。

(A) complete responder：外部照射の間、即ち腔内照射前にMRI検査上病巣が消失する

(局所制御の達成)。

(B) partial responder : 腔内照射前に病巣の遺残はあるが、腔内照射により完全に消失する。

(C) poor responder : 外部照射の施行にもかかわらず、腔内照射が可能な大きさまで縮小せず、腔内照射を断念する。

症例の約9割は (B) または (C) 群に属し、(C) 群の予後は厳しい。しかし、(C) 群症例を生検標本の病理組織像に基づいて判別することは現在も出来ていない。一方、何らかの分子マーカー (遺伝子もしくはタンパク質) により生検標本を解析して (C) 群症例を CCRT 前に予知出来れば、術前化学療法により癌の縮小をはかった上で手術を行い良好な予後が得られる症例もあると考えられる。

代表者の安里は発癌リスクを念頭に子宮頸癌症例に見られる HPV の型とバリエーションを解析してきた [Asato *et al.*, A large case-control study of cervical cancer risk associated with human papillomavirus infection in Japan, by nucleotide sequencing-based genotyping. *J Infect Dis* 189, 1829-32, 2004 など]。その過程で HPV 56 型がその発癌リスクに不釣り合いな CCRT 抵抗性を示すことに気づき、HPV 型との直接的関係を安易に想定しないものの、抵抗性の要因を解明したいと考えていた。

連携研究者の長井や稲嶺は CCRT 後の局所における HPV DNA の残存が局所再発の予測因子となること、治療後の血中 squamous cell carcinoma antigen (SCC) 濃度高値が遠隔再発の予測因子となることなどを見出していた [Nagai *et al.*, Persistence of human papillomavirus infection as a predictor for recurrence in carcinoma of the cervix after radiotherapy. *Am J Obstet Gynecol* 191, 1907-13, 2004; Hirakawa *et al.*, Predictive factor of distant recurrence in locally advanced squamous cell carcinoma of the cervix treated with concurrent chemoradiotherapy. *Gynecol Oncol.* 108, 126-9, 2008]。

また、本研究の主たる方法論はプロテオミクス解析であるが、連携研究者の苅谷の研究室はプロテオミクス解析システムの立ち上げを終え、臨床科と共同で組織サンプルを用いた解析を始め病態の理解に資する知見を得ていた [Shinzato *et al.*, Proteomic analysis of the trabecular meshwork of rats in a steroid-induced ocular hypertension model: down-regulation of type I collagen C-propeptides. *Ophthalmic Res* 39, 330-7, 2007; Miyara *et al.*, Proteomic analysis of rat retina in a steroid-induced ocular hypertension model: potential vulnerability to

oxidative stress. *Jpn J Ophthalmol.* 52, 84-90, 2008]。特に、研究協力者の山城はプロテオミクス解析に注力していた [Yamashiro, A study on proteome analysis methods: Two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry, 2007, University of the Ryukyus]。

子宮頸癌組織のプロテオミクス解析はすでに二つの研究が報告されていた [Hellman *et al.*, Protein expression patterns in primary carcinoma of the vagina. *Br J Cancer* 91, 319-26, 2004; Bae *et al.*, Two-dimensional gel analysis of protein expression profile in squamous cervical cancer patients. *Gynecol Oncol* 99, 26-35, 2005]。特に前者では頸癌と膣上部癌の蛋白質発現プロファイルの差異を詳細にクラスター解析し、パターン認識で両者を明確に区別していた。いずれの研究も生検標本で蛋白質発現プロファイルを観察しており、本研究が遂行可能であることを示す前例といえた。ただ、これらの解析で前述の SCC など正常組織と発現の異なる複数の分子が同定されているにせよ、それは頸癌組織の特徴を示したにすぎず、治療感受性とは無関係であった。

一方、トランスクリプトーム解析では、実際に放射線治療抵抗性と遺伝子発現との関係を調べた報告も一つあった [Kitahara *et al.*, Classification of sensitivity or resistance of cervical cancers to ionizing radiation according to expression profiles of 62 genes selected by cDNA microarray analysis. *Neoplasia* 4, 295-303, 2002]。しかし、この場合の放射線治療は CCRT ではなく、化学療法剤の併用はなかった。従って、主流を占めつつある CCRT 症例を検討することで、新たな知見を得る余地もあると考えられた。

## 2. 研究の目的

CCRT に対する抵抗性症例に特有の蛋白質発現プロファイル情報を集積し、それとの照合により CCRT 前に抵抗性症例を割り出す事前特定システムを構築する。

さらに、生検組織の免疫染色で治療抵抗性を予測する因子は、HIF-1 を含め現時点では未だ実用的なものが知られていないので、上記解析の成果から抵抗性症例もしくは感受性症例にのみ見られる蛋白質を候補分子をマーカー蛋白質と定め、抗体を作製して、生検標本の免疫組織染色により抵抗性症例を割り出す簡便なシステムを構築する事を目的とした。

その成果は臨床現場に直接還元される上、生物学的にも頸癌の悪性形質を解明する端緒となる可能性があると考えた。

### 3. 研究の方法

まず CCRT 症例の病理組織、HPV 型やバリアントの解析により、扁平上皮癌症例から、年齢や腫瘍径をマッチさせた CCRT 抵抗性症例と感受性症例の 2 つの母集団を作成した。

次に、CCRT 抵抗性症例に特有の蛋白質発現プロファイル情報を得るため、CCRT 前生検標本の蛋白質を (i) 蛍光ディフュージョン二次元電気泳動法 (2-D DIGE) により二次元展開後、抵抗性症例と感受性症例で強弱の差のあるスポット群を絞り込み、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF/MS) 等を用いてスポット蛋白質群を同定するか、(ii) 高速液体クロマトグラフィーとタンデム質量分析法の組み合わせ (LC-MS/MS) により全発現蛋白質を同定し、抵抗性症例と感受性症例で発現に差のある蛋白質群を同定するアプローチを検討した。その結果、最終的には (ii) のうち、特に前生検標本から抽出した全ペプチドをショットガン解析するアプローチを採った。

最後に、蛋白質発現プロファイル情報の照合により抵抗性症例を特定するシステムを構築すると共に、マーカー候補蛋白質を選定し、各症例での発現量を免疫染色で検証した。

### 4. 研究成果

CCRT 抵抗性症例と感受性症例の CCRT 前生検標本から抽出した全ペプチドの LC-MS/MS ショットガン解析を行い、各標本毎におよそ 400 種の蛋白質を同定するとともに発現量を半定量スコアリングした表を作成した。このデータより、意外にも CCRT 抵抗性症例と感受性症例の蛋白質発現プロファイルに大差ないことが判明したが、一方で、抵抗性症例群と感受性症例群で完全排他的に検出された蛋白質をそれぞれ 8、16 種見出した。また、両群間で相対的発現量の異なる蛋白質を 1 種見出した。

マーカー候補蛋白質を選定して抗体作成を計画すると同時に、市販抗体の入手性や抗体の特異性から、2 種類のマーカー候補蛋白質について CCRT 抵抗性症例と感受性症例の標本の免疫組織染色を先行して行った。1 つの蛋白質はある種の癌抑制遺伝子産物であるが、これまで放射線感受性との関係を結びつける報告がないもので、ナンセンス変異による C 末端側欠損がしばしば発癌に関係することから、この蛋白質については N 末端側と C 末端側に近いエピトープを認識する 2 種のポリクローナル抗体を用いて免疫組織染色を行った。感受性群と抵抗性群で染色度合いを 3 段階に分類し比較したところ、差がみられた。統計的評価のため母集団をさらに増やし

ている。

免疫組織染色を行ったもう 1 つの蛋白質は、細胞周期の M 期に特異的にリン酸化されることが最近わかった蛋白質であり、同様にポリクローナル抗体を用いて解析し母集団を増やしている。

また、前述の抵抗性症例群と感受性症例群の両群間で相対的発現量の異なる蛋白質として見出した 1 つの蛋白質は、腫瘍血管新生に関与する遺伝子が得られた。適切なポリクローナル抗体を選定して解析中である。上記 3 種以外のマーカー候補遺伝子については免疫組織染色には至っていない。

### 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 4 件)

① Yoshito Yamashiro, Kimiko Takei, Masato Umikawa, Tsuyoshi Asato, Minoru Oshiro, Yukiko Uechi, Takahiro Ishikawa, Kiyohito Taira, Hiroshi Uezato and Ken-ichi Kariya, Ectopic coexpression of keratin 8 and 18 promotes invasion of transformed keratinocytes and is induced in patients with cutaneous squamous cell carcinoma., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 399, 365-372, 2010.

② Jannatul Ferdousi, Yutaka Nagai, Tsuyoshi Asato, Makoto Hirakawa, Morihiro Inamine, Wataru Kudaka, Ken-ichi Kariya and Yoichi Aoki, Impact of human papillomavirus genotype on response to treatment and survival in patients receiving radiotherapy for squamous cell carcinoma of the cervix., *Experimental and Therapeutic Medicine*, 査読有, 1, 525-530, 2010.

③ Yukiko Uechi, Maitsetseg Bayarjargal, Masato Umikawa, Minoru Oshiro, Kimiko Takei, Yoshito Yamashiro, Tsuyoshi Asato, Shogo Endo, Ryo Misaki, Tomohiko Taguchi and Ken-ichi Kariya, Rap2 function requires palmitoylation and recycling endosome localization., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 378, 732-737, 2009.

④ Hideo Nonaka, Kimiko Takei, Masato Umikawa, Minoru Oshiro, Kouichi Kuninaka, Maitsetseg Bayarjargal, Tsuyoshi Asato, Yoshito Yamashiro, Yukiko Uechi, Shogo Endo, Tatsuo Suzuki and Ken-ichi Kariya,

MINK is a Rap2 effector for phosphorylation of the postsynaptic scaffold protein TANC1., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 377, 573-578, 2008.

〔学会発表〕(計 2 件)

① Yoshito Yamashiro (代表発表者), Kimiko Takei, Masato Umikawa, Tsuyoshi Asato, Kiyohito Taira, Hiroshi Uezato, and Ken-ichi Kariya, The proteomic search for prognosis markers of cutaneous squamous cell carcinoma.: MBSJ2009(第 32 回日本分子生物学会年会) プログラム: 3P-0743: 418, 2009 年 12 月 11 日: パシフィコ横浜

② Maitsetseg Bayarjargal (代表発表者), Yukiko Uechi, Shogo Endo, Kimiko Nonaka-Takei, Minoru Oshiro, Masato Umikawa, Tsuyoshi Asato, Yoshito Yamashiro, Tomohiko Taguchi, and Ken-ichi Kariya, Localization of Rap2 in recycling endosome in a palmitoylation-dependent manner.: *Biochemistry Molecular Biology (BMB)* 2008(第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会) プログラム: 1P-0444: 219, 2008 年 12 月 9 日: 神戸国際展示場

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安里 剛 (ASATO TSUYOSHI)  
琉球大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 40253950

### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号:

### (3) 連携研究者

長井 裕 (NAGAI YUTAKA)  
琉球大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 70305209

稲嶺 盛彦 (INAMINE MORIHIKO)  
琉球大学・医学研究科・助教  
研究者番号: 90437989

苅谷 研一 (KARIYA KEN-ICHI)  
琉球大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 40263371

### (4) 研究協力者

山城 義人 (YAMASHIRO YOSHITO)  
琉球大学・医学研究科・博士課程