

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592526

研究課題名(和文) 頭頸部表在癌の発現プロファイリングによる治療戦略の確立

研究課題名(英文) Expression profiling of superficial head and neck cancer

研究代表者

楯谷 一郎 (TATEYA, ICHIRO)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20526363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：咽頭表在癌の予後は一般に良好であるが、特に不幸な転機を取ることがある。咽頭表在癌は癌の微小浸潤解析の良いモデルであり、咽頭表在癌の分子発現解析を行うことが予後因子の同定、癌の浸潤機構の解明につながることを期待される。質量顕微鏡は切片上の任意の既知あるいは未知の分子発現を網羅的に解析する手法であり、本研究において下咽頭表在癌5例を対象に質量顕微鏡法を用いて表在癌病変の上皮部と上皮下浸潤部の分子発現を比較した。結果、上皮下浸潤部にはアラキドン酸を含むホスファチジルコリンが多く発現していることが明らかとなり、癌浸潤の先端部では細胞膜の構造変化が起きている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The number of cases of superficial-type pharyngeal squamous cell carcinoma (STPSCC) has increased recently. An exploration of the biological characteristics of STPSCC could uncover the invasion mechanism of this carcinoma. Phosphatidylcholine (PC) is the most abundant component of cell lipid bilayers. However, the distribution of PC in early invasive carcinomas has not been determined. Imaging mass spectrometry (IMS) can be used to visualize the distribution of biomolecules on a tissue section, and is especially suitable for phospholipids. We conducted an IMS analysis to elucidate the distribution of PC species in STPSCC tissues from five patients. We determined by tandem mass spectrometry that three kinds of PC species with arachidonic acid, were expressed at significantly higher levels in the submucosal invasive region than in the superficial region of STPSCC. These distributional differences could be associated with the mechanism of hypopharyngeal carcinoma invasion.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

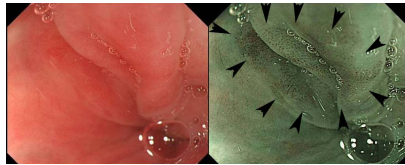
キーワード：耳鼻咽喉科学 頭頸部外科学 表在癌 質量顕微鏡 アラキドン酸 上皮下浸潤

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は発見された時点ですでに病期が進行していることが多く、そのため手術により嚥下や発声の機能を犠牲にすることを余儀なくされるケースが多かった。嚥下や発声の機能を温存しつつ癌を治療するには早期発見・早期診断が欠かせない。我々は NBI (narrow band imaging) の技術を用いることで従来の内視鏡では見つかることの出来なかった微細な頭頸部表在癌を検出できることを明らかにした (図1)。NBIとは観察光の分

図1

光特性を最適化設計させることにより粘膜表面



NBI で見た下咽頭表在癌(右、矢頭)。通常光(左)では病変の認識が困難である。

の微細な血管構築を観察する技術である。これにより癌に特徴的な微細な血管異常を見出し、微細な表在癌を早期に診断して内視鏡下あるいは直達喉頭鏡下で経口的に小侵襲で切除することが可能となってきた。

頭頸部表在癌に対する経口的切除例の生存率はほぼ100%と非常に予後良好である。我々は2007年より頭頸部表在癌に対する内視鏡下手術を行なっている。すでに手術件数は50件を越え全国で有数の症例数であるが、手術件数はさらに増加傾向にある。

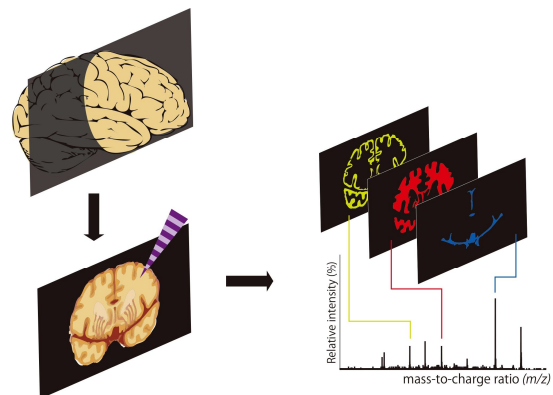
一方、症例の蓄積により問題点も明らかとなってきている。表在癌の発見により特に咽頭癌の症例数が飛躍的に増えているが、これらすべてが放置すると浸潤癌に移行し予後に関わるものであるかは不明であり、over indication な症例が含まれている可能性は否定できない。表在癌は多発例が多く、特に飲酒により顔が赤くなるアルデヒド脱水素酵素2型のヘテロ欠損者において、咽喉頭・食道で表在癌が多発しやすいことが知られ

ている。表在癌に対する内視鏡下切除は侵襲の小さい治療ではあるが、下咽頭などの多発病変を切除した場合に狭窄を来し嚥下障害を生じる症例が出てきており、不要な手術を避ける方策が必要である。また一方で、表在癌の内視鏡手術後に後発頸部リンパ節転移を来す予後不良な症例も経験されている。

表在癌の予後を予め予測できれば、後発リンパ節転移など予後不良と予想される症例には予防的頸部郭清などを追加し、また予後良好な多発病変に対しては経過観察を行なうなどの症例に応じた治療戦略を取ることが可能になる。

質量顕微鏡は顕微鏡下にレーザーのスポットを2次元的に走査することで組織切片上の任意の分子の位置情報を同定するものであり(図2)、次世代の解析器機としてここ数年国内外で開発が進められている。この方法により数十 μm の解像度で数千 数万の既知あるいは未知の分子(タンパク、糖鎖、脂質)の発現分布を一度に得ることが可能となった。質量顕微鏡法を用いれば、例えば同一切片上で上皮浸潤部分と非浸潤部分の分子発現を網羅的に比較することが可能となる。この手法を用いて表在癌の上皮内部分と上皮浸潤部分を比較することで、上皮浸潤のメカニズムや表在癌の予後規定因子を同定することを計画した。

図2



2. 研究の目的

本研究の目的は表在癌のプロファイリングを行い予後不良症例や浸潤癌と比較することで予後に関わる因子を同定し、治療戦略につなげていくことにある。

3. 研究の方法

京都大学医学部附属病院において下咽頭表在癌に対して手術加療を行った手術標本の内、上皮浸潤を認めた5例よりサンプルを採取した。採取組織は速やかに液体窒素を加えたのち-80℃に保管した。さらに10μmの厚みの凍結切片を作成し、実験に使用した。70%メタノールと20mMの酢酸カリウム溶液に2, 5-でヒドロキシベンゾ酸50mgを溶かし、質量顕微鏡解析に必須のマトリックス溶液を作成した。

切片にマトリックス溶液を散布し、Ultraflex II TOF/TOFを用いてMALDI-TOF/TOF法によりイメージングマスペクトロメトリー解析を行った。データポイントの間隔は50μmとし、各データポイントに100回のレーザービーム照射を行った。m/z値は500から900の範囲に設定し、パラメータを最適化したのちにデータを採取した。

イメージングマスペクトロメトリー解析を行った後、解析に用いた切片の隣の切片でHE染色を行い、上皮浸潤部を同定した。HE染色結果によって上皮浸潤部と上皮内部の範囲を決定し、各部分で関心領域を選択した。各ROIにおいて強く発現している上位50ピークを選択し、統計学的解析を行った。さらに有意差を認めたピークについてMS/MSを施行し、分子同定を行った。

4. 研究成果

解析した5症例において癌の上皮部に比べて上皮浸潤部で発現の多いm/zを解析した。(図3)。さらにMS/MSによりアラキドン酸を含むホスファチジルコリン3分子が同定された(図4)。癌や炎症とアラキドンサンの関

連は従来より知られているが、アラキドン酸の分布を直接調べる方法は存在しなかったため、アラキドンサンの分布は不明であった。ホスファチジルコリンは細胞膜の主要構成要素であり、癌の浸潤部において細胞膜の構成要素であるホスファチジルコリンにアラキドン酸が多く含まれている事は、癌の浸潤部先端では細胞膜の構造変化が起きていることを示唆する所見であった。他の癌領域も含め、これまで癌浸潤部における細胞膜の構造変化を指摘した報告はなく、これは全く新しい知見である。

図3

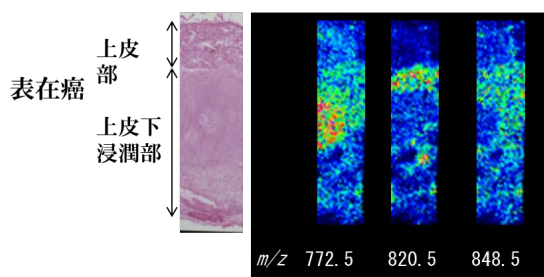
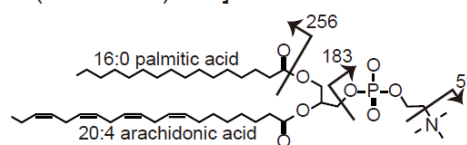
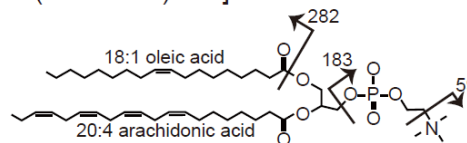


図4

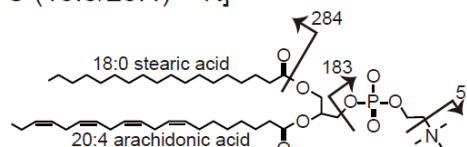
[PC (16:0/20:4) + K]⁺



[PC (18:1/20:4) + K]⁺



[PC (18:0/20:4) + K]⁺



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1) 石川征司、楯谷一郎、他、第 64 回日本

気管食道科学会、東京、2012

2) 楯谷一郎、第64回日本気管食道科学会、
東京、2012

3) 石川征司、楯谷一郎、他、第12回頭頸
部表在癌研究会、東京、2014

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楯谷 一郎 (TATEYA Ichiro)

京都大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：20526363

(2) 研究分担者

平野 滋 (HIRANO Shigeru)

京都大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：10303827

武藤 学 (MUTO Manabu)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40360698

北村 守正 (KITMURA Morimasa)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：60543262

嘉田 真平 (KADA Shinpei)

独立行政法人国立病院機構 京都医療セン
ター臨床研究センター・研究員

研究者番号：70543263

(3) 連携研究者

瀬藤 光利 (SETOU Mitsutoshi)

浜松医科大学・教授

研究者番号：20302664