

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月7日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792385

研究課題名（和文）口腔扁平上皮癌の非侵襲的診断用検査ツールの開発

研究課題名（英文）The development of noninvasive diagnoses tool for oral squamous cell carcinoma

研究代表者

恩田 健志 (ONDA TAKESHI)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：30433949

研究成果の概要（和文）：本研究では口腔扁平上皮癌細胞が発現異常を示す分泌タンパク質を解析し唾液・血液等から分泌異常が検出可能な口腔扁平上皮癌の有力な分子マーカーの同定を試みた。表皮角化細胞株、口腔扁平上皮癌由来細胞株（6株）、および各々の培養液を使用した。2D-DIGE法、LC/MS/MS法を用いて口腔扁平上皮癌由来細胞株およびその培養液に共通して発現異常が認められるタンパク質を解析した。本研究の結果、口腔扁平上皮癌細胞の7種類の分泌タンパク質の異常を検出することに成功した。

研究成果の概要（英文）：This study sought to identify potent molecular markers that may allow detection of secretion abnormality from saliva, blood, etc., by analyzing secreted protein in which oral squamous cell carcinoma derived cell lines express abnormality. We used cell line of epidermal keratinocyte and ones derived from OSCC-derived cell lines (six lines) as well as their respective cell cultures. By using two-dimensional differential in-gel electrophoresis (2D-DIGE) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) methods, the proteins identified with abnormal expressions in both the cell line derived from OSCC-derived cell lines and its culture medium were analyzed. The study detected abnormalities in 7 secreted proteins of oral squamous cell cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：口腔扁平上皮癌、プロテオミクス、2D-DIGE、LC/MS/MS、腫瘍マーカー

1. 研究開始当初の背景

東京歯科大学口腔外科学講座では16年にわたり地域の歯科医師会と協力し口腔癌の集団検診を行い、その早期発見に努めてきた。この検診での口腔癌検出率は0.12%である。しかし集団検診は実施地域や時期・検診できる人数に制限があり検査対象となるのは極めて少ない集団である。これを解決するためには、歯科診療所における個別検診を普及させる必要があるが、現在、視診に加えて一般

歯科診療所でも簡便に行うことができる信頼性の高いスクリーニング方法はない。そこで本研究では非侵襲的に反復して採取可能な唾液および血液に注目し、全唾液・血液を試料とした簡便に行える口腔癌のスクリーニング法の開発ならびに早期診断分子マーカーの探索を行うこととした。本研究のように、非侵襲的に反復して採取可能な唾液・血液に注目し、簡便に行える口腔癌のスクリーニング法の開発ならびに早期診断分子マ

カーの探索を行うことを目的とした唾液・血液の網羅的なタンパク質発現解析については国内外ともに報告は少なく、新たな診断法の開発が期待できると考えている。唾液は喫煙など生活習慣、全身的既往、食事の内容、水素イオン濃度、歯科治療の影響、常在細菌叢の影響からその性状は日々変動し、非常に取扱いにくい材料と敬遠されてきた。しかしながら、無痛に反復して採取可能であり、検査施行者および患者の負担も少なく正しく用いれば検査材料としては最高の材料であり、世界的にも普及が簡単であると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

(1) 正常口腔粘膜表皮角化細胞と口腔扁平上皮癌由来細胞株を蛍光標識二次元電気泳動法(2D-DIGE)を用いて網羅的にタンパク質発現解析を行う。

(2) 口腔扁平上皮癌由来細胞株に共通して発現異常を示すタンパク質スポットをLC/MS/MS法にて質量分析し、同定する。

(3) 正常口腔粘膜由来表皮角化細胞の培養液と口腔扁平上皮癌由来細胞株の培養液を2D-DIGE法を用いて網羅的にタンパク質発現解析を行う。

(4) 口腔扁平上皮癌由来細胞株の培養液に共通して発現亢進しているタンパク質スポットをLC/MS/MS法にて質量分析し、同定する。

(5) (1)～(4)でリストアップした口腔扁平上皮癌細胞に共通して発現異常を示している候補タンパク質群について免疫組織化学染色法を用いた実際の口腔扁平上皮癌組織中の発現状態を確認する。

(6) 健常者の全唾液と口腔扁平上皮癌患者の術前全唾液、術後全唾液を蛍光標識二次元電気泳動法(2D-DIGE)を用いて網羅的にタンパク質発現解析を行う。

(7) 健常者の全唾液から検出されず、口腔扁平上皮癌患者の術前全唾液から検出され、かつ術後全唾液からは検出されないタンパク質の発現異常をLC/MS/MS法にて質量分析し、同定する。

(8) (1)～(7)でリストアップした候補タンパク質が口腔癌患者の唾液から検出可能か検討する。

3. 研究の方法

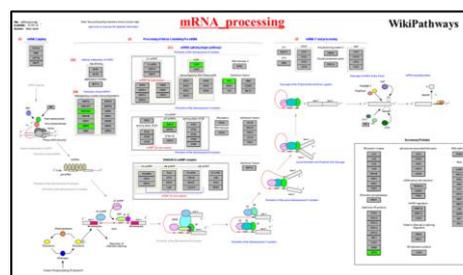
本研究では、唾液中の口腔内常在菌の影響やタンパク質分解酵素による唾液タンパク質の分解・変性の影響、日内変動や精神的要因による成分・量の変化などを考慮して、唾液を検体として解析する前に、培養細胞を用いる実験系を計画した。蛍光標識二次元電気泳動法(2D-DIGE)、LC/MS/MS法を用いて表皮角化細胞(HaCaT)と口腔扁平上皮癌由来細胞株(6株)の網羅的なタンパク質発現解析を行った。次いで、表皮角化細胞(HaCaT)の

培養液と口腔扁平上皮癌由来細胞株の培養液(6株)の網羅的なタンパク質発現解析を行った。発現異常を示すタンパク質は免疫組織化学染色法により実際の口腔扁平上皮癌組織における、抗体を用いた検証実験を行った。最後に同様にプロテオミクス解析を用いて、実際の全唾液を用いた臨床検体を用いた実験を行った。本解析でターゲットとするタンパク質は、健常者の全唾液から検出されず、口腔扁平上皮癌患者の術前全唾液から検出され、かつ術後全唾液からは検出されない口腔扁平上皮癌特異的分泌タンパク質であった。

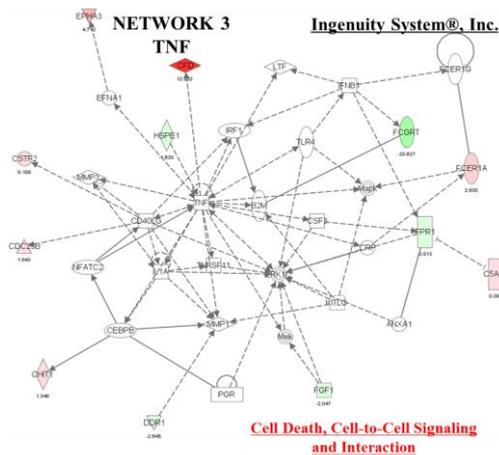
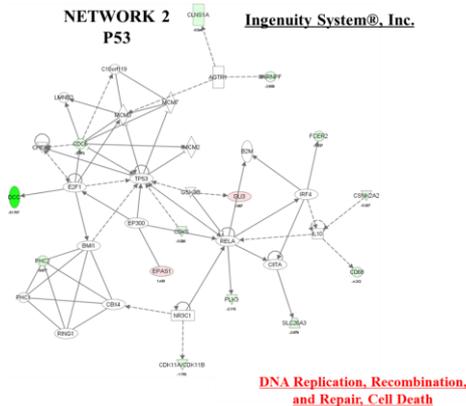
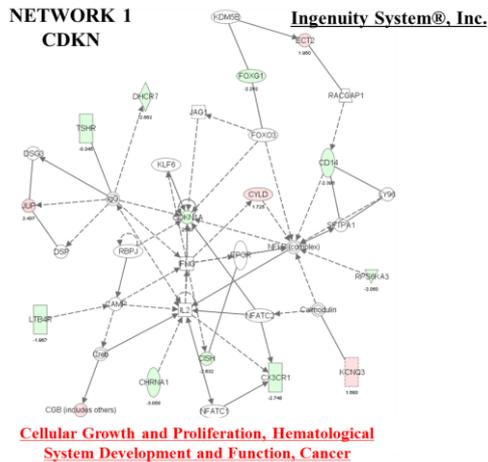
4. 研究成果

本研究では、唾液中の口腔内常在菌の影響やタンパク質分解酵素による唾液タンパク質の分解・変性の影響、日内変動や精神的要因による成分・量の変化などを考慮して、唾液を検体として解析する前に、培養細胞を用いる実験系を計画した。表皮角化細胞株、口腔扁平上皮癌由来細胞株(6株)、および各々の培養液を使用し、2D-DIGE法、LC/MS/MS法を用いて、口腔扁平上皮癌由来細胞株およびその培養液に共通して発現異常が認められるタンパク質を解析し、同定したタンパク質群からSwiss-Protデータベースを用いて分泌タンパク質をリストアップした。

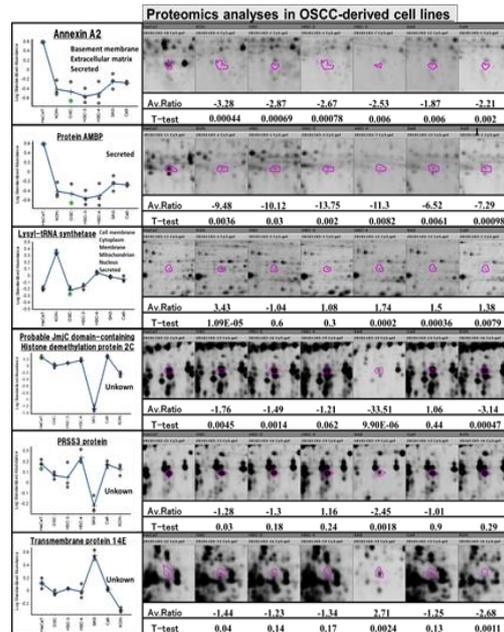
表皮角化細胞と比較して口腔扁平上皮癌由来細胞株に共通して統計学的に有意に発現亢進を示すタンパク質は49種類、発現低下を示すタンパク質は77種類であった。これら126種類のタンパク質スポットをLC/MS/MS法にて質量解析し翻訳後修飾などの影響で重複したタンパク質を除く92種類のタンパク質を同定した。GO Slim機能解析の結果、リストアップされたタンパク質群の局在は細胞全体が最も多く、次いで細胞内、細胞質であった。分子機能では結合に関与するタンパク質が多かった。生物学的なプロセスでは生物学的プロセスの制御、代謝過程、輸送に関与するタンパク質が多かった。またWikiPathwaysを用いて、既知のタンパク質核酸データベースから遺伝子ネットワークにアクセスした結果、29の既知pathwayがヒットした。最も多く標的タンパク質が含まれたpathwayは6種類の発現異常タンパク質を含むmRNAのプロセッシングに関与するネットワークであった。



さらに Ingenuity Pathway analysis softwareにより文献的にPathwayを検索すると、細胞の成長・増殖、細胞周期、細胞死、シグナル伝達に参与するPathwayがヒットした。



これら 92 種類のタンパク質の局在について Swiss-Prot データベースを検索した結果、その中で分泌タンパク質は ANXA2、AMBP、Lysyl-tRNA synthetase の 3 種類のみであった。



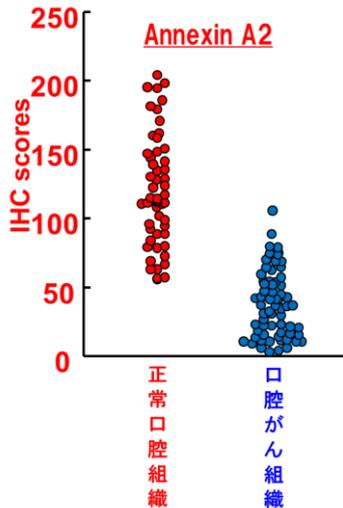
培養液中のタンパク質の比較では統計学的に有意な発現異常タンパク質は 39 種類認められ、そのうち 36 種類はウシ血清由来でありヒト由来のタンパク質は JHD2C、PRSS3、TM14E の 3 種類のみであった。

次に同様にプロテオミクス解析を用いて、実際の全唾液を用いた臨床検体を用いた実験を行った。本解析でターゲットとするタンパク質は、健康者の全唾液から検出されず、口腔がん患者の術前全唾液から検出され、かつ術後全唾液からは検出されない口腔がん特異的分泌タンパク質であった。その結果、口腔癌患者の術前唾液のみで検出される Enolase1 がリストアップされた。

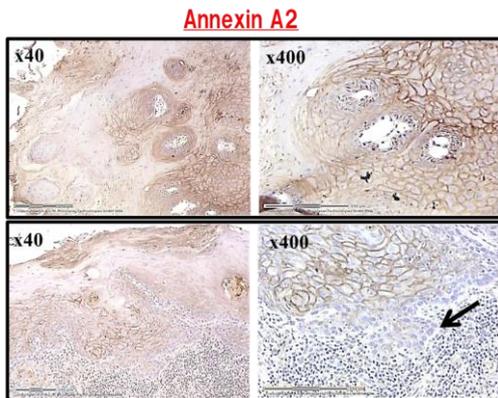
以上の結果、口腔扁平上皮癌細胞が発現異常を示す 7 種類の分泌タンパク質をリストアップすることが可能であった。そのうち ANXA2 についてさらに解析を行った。ANXA2 は、口腔扁平上皮癌細胞が共通して発現低下を示す分泌タンパク質としてわれわれが注目している候補タンパク質である。ANXA2 に関して文献を検索すると、2011 年に Rodrigo JP らが、免疫組織化学染色法を用いた口腔扁平上皮癌での ANXA2 タンパク質の発現低下を報告している。その中で ANXA2 タンパク質の発現低下と組織分化度との間に統計学的有意差が認められたとし、中分化型および低分化型扁平上皮癌組織で高頻度に ANXA2 タンパク質の発現低下が認められたと報告している。その他、腎細胞がん、膵臓がん、直腸がん、脳腫瘍、肺がん、乳がんなどで ANXA2 タンパク質の発現異常が報告されている。これらは主に ANXA2 の発現異常は浸潤能の獲得や転移との関連を示唆するものであった。

そこで口腔扁平上皮癌の手術時切除標本

80症例を用いて免疫組織化学染色法にてANXA2の検証実験を行った。免疫組織化学染色の評価方法は、Carl Barrettらの方法に準じて半定量的に行った。その結果、80症例中51症例64%においてANXA2タンパク質の発現低下が認められた。



しかしながら、ANXA2の発現低下とRodrigo JPらが報告した組織分化度をはじめとする、各種臨床指標との相関は認められなかった。一方で、ANXA2タンパク質は免疫組織化学染色法により、正常上皮細胞では細胞膜および細胞間隙が染色されるが、上皮内癌の状態では正常上皮と変わらない発現状態を示し、基底細胞層を超える段階で発現が低下し、粘膜固有層に浸潤すると発現が消失する症例が比較的多く認められた印象がある。統計学的有意差は認められなかったが、他の報告と同様に細胞の浸潤能と関連している可能性が考えられた。



現在、口腔扁平上皮癌患者の唾液からANXA2タンパク質の発現異常が検出できるか検証中である。

研究代表者は、ANXA2をはじめとする今回リストアップできた7つのターゲットタンパク質群候補について、検証実験を行いデータベース化し、マイクロ流体デバイス化することで、唾液を試料とした口腔がんのスクリー

ニング検査へ応用できる可能性を期待している。

唾液は、唾液採取の簡便性、非侵襲性に加え、有用な因子を多く含んでいることから、比較的近い将来、口腔がんのスクリーニングあるいは確定診断の手段として一役を担うであろうことが予測される。

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1件)

(1) 恩田健志、柴原孝彦、高野伸夫、片倉朗、唾液中のバイオマーカーを用いた早期診断の可能性、日本口腔腫瘍学会誌、査読あり、24巻3号2013

[学会発表] (計17件)

- ① 恩田健志、唾液中のバイオマーカーを用いた早期診断の可能性、第31回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会(招待講演)、2013年01月24日～2013年01月25日、東京都
- ② 恩田健志、口腔扁平上皮癌関連遺伝子のPathway解析、第31回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会、2013年01月24日～2013年01月25日、東京都
- ③ 恩田健志、口腔扁平上皮癌におけるAMB Pの発現異常、第31回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会、2013年01月24日～2013年01月25日、東京都
- ④ 恩田健志、口腔扁平上皮癌におけるHNRNPの発現異常、第31回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会、2013年01月24日～2013年01月25日、東京都
- ⑤ 恩田健志、口腔扁平上皮癌におけるOCIAD1の発現異常、第31回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会、2013年01月24日～2013年01月25日、東京都
- ⑥ 恩田健志、インプラント周囲に発生した扁平上皮癌の分泌タンパク質解析、第16回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会、2012年12月01日～2012年12月02日、福岡県
- ⑦ 恩田健志、口腔扁平上皮癌細胞の新規分子マーカー解析、第57回日本口腔外科学会総会・学術大会、2012年10月19日～2012年10月21日、神奈川県
- ⑧ 恩田健志、口腔扁平上皮癌におけるKu86の発現異常、第57回日本口腔外科学会総会・学術大会、2012年10月19日～2012年10月21日、神奈川県
- ⑨ 恩田健志、口腔扁平上皮癌におけるDDX3Xの発現異常、第57回日本口腔外科学会総会・学術大会、2012年10月19日～2012年10月21日、神奈川県
- ⑩ 恩田健志、蛍光診断機器Velscopeを用いた口腔癌の切除範囲設定の有用性について

て、第36回日本頭頸部癌学会総会・学術大会、2012年06月07日～2012年06月08日、島根県

- ⑪ 恩田健志、口腔扁平上皮癌におけるOCIAD1の発現異常、第66回NPO法人日本口腔科学会学術集会、2012年05月17日～2012年05月18日、広島県
- ⑫ 恩田健志、当院における過去10年間の口腔癌手術症例の臨床統計、第66回NPO法人日本口腔科学会学術集会、2012年05月17日～2012年05月18日、広島県
- ⑬ 恩田健志、東京歯科大学千葉病院手術室における手術症例の臨床統計、第45回NPO法人日本口腔科学会関東地方部会、2012年11月19日～2012年11月19日、東京都
- ⑭ 恩田健志、Low-grade dysplasiaを伴う口腔白板症の臨床統計的検討、第56回日本口腔外科学会総会・学術大会、2011年10月21日～23日、大阪府
- ⑮ 恩田健志、口腔扁平上皮癌の分泌タンパク質解析、第56回日本口腔外科学会総会・学術大会、2011年10月21日～23日、大阪府
- ⑯ 恩田健志、蛍光光学機器を用いた悪性・前癌病変におけるSurgical marginの設定、第56回日本口腔外科学会総会・学術大会、2011年10月21日～23日、大阪府
- ⑰ Takeshi Onda, Takumi Sakuma, Hiroki Bessho, Takashi Yakushiji, Nobuharu Yamamoto, Takeshi Nomura, Nobuo Takano and Takahiko Shibahara, Proteomics based Identification of Differentially Expressed Proteins in Human Oral Squamous Cell Carcinoma, 20th International Conference on Oral and Maxillofacial surgery, Santiago, Chile, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

恩田 健志 (ONDA TAKESHI)
東京歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：30433949

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

