

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861516

研究課題名(和文) 高感度糖鎖解析システムを用いた新たな子宮頸癌診断・治療バイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Glycan profiling using formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: Hippeastrum hybrid lectin is a sensitive biomarker for squamous cell carcinoma of the cervix

研究代表者

戸澤 晃子 (Tozawa-Ono, Akiko)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：90569865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：子宮頸癌は世界的に発生頻度の高いがんであるが細胞診などの検診以外に有効な発見のツールはない。診断、治療に有効なバイオマーカーの開発が必要とされている。

手術などで採取された16人の子宮頸部のホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いてがん部と非がん部をレクチンマイクロアレイによって比較解析した。結果はマイクロアレイの45種類のうち、Hippeastrum hybrid lectin (HHL) が特徴的に存在していた。組織のレクチン染色においてもがんにHHLが存在していることが明らかになった。子宮頸癌の診断のマーカーまたは治療のターゲットになり得るか糖鎖解析などをすすめ、今後も検討を継続する。

研究成果の概要(英文)：Cervical cancer is an aggressive malignancy for which useful diagnostic markers are not presently available. Altered protein glycosylation is a universal feature of cancer cells. Distinctive glycan structures are associated with specific types of cancer, but little is known about the complete glycan profile of each tumor and progress has been hindered by a lack of available techniques. Formalin-fixed, paraffin-embedded tumor and non-tumor tissues were obtained from 16 patients with cervical cancer. Sections that included both tumor and non-tumor tissues were examined to detect alterations of glycans from the lectin-binding patterns. As a result, we found that Hippeastrum hybrid lectin was the best marker for distinguishing cervical cancer from normal squamous epithelium. Histochemistry confirmed specific staining of squamous cell carcinoma by Hippeastrum hybrid lectin in the 16 tissue specimens.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：レクチンマイクロアレイ 子宮頸癌

## 1. 研究開始当初の背景

近年、子宮頸癌は世界で新規罹患患者が年間30-50万人、女性の悪性腫瘍では世界で第2位にランクされるほど頻度の高い疾患であり、その原因のほとんどが Human papilloma virus (HPV)であることが知られてきた。しかし、HPV感染は診断根拠にならず、現在も最終診断は病理組織検体で判定される。前癌病変である cervical intraepithelial neoplasia(CIN)は数カ月に一度の経過観察が必要とされるため医療経済的に効率が悪く、また病理組織診断は施設間、診断者間で差があり、over diagnosisが生じるため over surgeryになる場合がある。一方、浸潤癌においても標準治療である広汎子宮全摘や放射線治療後の再発症例の予後は、治療をおこなっても5年生存率が30~70%と低い。よって、①前癌病変の正確かつ早期の診断、②子宮頸癌再発の早期診断マーカー・治療法が求められている。

レクチンマイクロアレイは平成15~22年に独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発(NEDO)による健康安心プログラム「糖鎖機能活用技術開発」プロジェクトで開発された糖鎖プロファイリング・システムで、世界初の糖鎖解析システムとして、2005年に Nature Methods に発表された(A. Kuno et al. 2005)。この技術の構成要素であるレクチンマイクロアレイ(LecChip® Ver.1.0)には、天然型レクチン45種類(図1)が搭載されており、微弱な糖鎖とレクチンの相互作用も逃さず捉えることの出来るエバネッセント波蛍光励起プロファイラー(GlycoStation® Reader 1200)と組み合わせられることで、世界で最も高感度でハイスループットな糖鎖プロファイリング・システムとなっている(図2)。さらにレクチンマイクロアレイでは45種類の特異性の異なるレクチン(糖鎖結合性タンパク質)を組合せることで、複雑な糖鎖構造であっても、そのバイオリジカルな糖鎖のエピトープ像を検出することができる。質量分析法やHPLC法とは異なり、糖鎖の微細構造を完全同定することはできないが、その高感度で簡便な操作性により、微量サンプルでハイスループットな糖鎖のプロファイリング解析が可能である。本技術の特徴は数十ng程度の糖タンパク質を生体成分から簡易精製し、比較解析できることにある。既存技術である質量分析や液体クロマトグラフィーを用いての比較糖鎖解析の場合、少なくとも10mgの精製糖タンパク質が必要であるが、本システムが開発されたことで、血清や組織などに微量にしか存在せずに分析が不可能であった糖タンパク質の比較糖鎖解析が始めて可能になった。肝疾患の分野ではこのシステムを活用し、マーカー候補分子である糖タンパク質分子(α1酸性糖タンパク質(AGP))の糖鎖構造変化が、肝線維化の進展をマーカーとなるかどうかを検証した結果、最終的に血清より検出した2種のレクチ

ン(AOL, MAL)が慢性肝炎(F3)と肝硬変(F4)の鑑別が可能であることが明らかになった(A. Kuno et al. 2011)。

申請者は、この世界初の高感度糖鎖解析システムを用いて、世界初の臨床検体を用いた子宮頸部腫瘍解析による新規バイオマーカーの探索に着目した。子宮頸部腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織のレクチン解析によって①CINの病変進行度に関連する糖鎖構造が存在するかを明らかにし、CINの確定診断を可能にするか。②子宮頸部浸潤癌の再発リスクマーカーさらに治療標的となる標的タンパク質の検出は可能か。を明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究の目的

本研究は、世界初の高感度糖鎖解析システムであるレクチンマイクロアレイを用いた子宮頸部上皮内病変および浸潤癌における診断・治療における新規バイオマーカーの探索を目的としている。子宮頸部腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織のレクチン解析によって①cervical intraepithelial neoplasia (CIN)の病変進行度に関連する糖鎖構造が存在するかを明らかにし、CINの確定診断を可能にするか。②子宮頸部浸潤癌の再発リスクマーカーさらに治療標的となる標的タンパク質の検出は可能か。また、同様の検討が③臨床細胞診検体、血清において可能かを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

子宮頸部腫瘍におけるサンプル調整、レクチンマイクロアレイ測定条件設定  
我々はこれまでに行ってきたプロテオミクス解析の経験から対象組織によってFFPE組織からのタンパク抽出率が異なり抽出条件の調整が必要であることがわかっていく。

(1)レーザーマイクロダイセクション  
CIN1~3、子宮頸部扁平上皮癌、およびその再発・転移性腫瘍組織のFFPE組織より病変の直径1.5mm、5mm厚をレーザーマイクロダイセクションにて採取する。

(2)子宮頸部腫瘍FFPE組織からレクチンマイクロアレイに適したタンパク抽出条件の調整を行う。基本プロトコールは以下の通りである。

①FFPE組織を脱パラフィン化し、10mM citrate buffer (pH6.0) 200μL とかき取った組織片を入れ、95°C、60分間インキュベートする。(抗原賦活化)

②組織片にPBS 200μLを加え、20,000×g、5分間、4°Cで遠心して上清を除く洗浄操作を2~3回繰り返す。

③0.5%(v/v)NP40を含むPBSに、Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-Free(100×)3を1%(×

1 になるように) 加えて混合する。組織片に②のプロテアーゼインヒビターを加え PBS-NP40 (0.5%) 20  $\mu$ L を加えて超音波処理で破碎する。

④③の組織懸濁液を氷上で 60 分間インキュベートする。

⑤20,000 $\times$ g、5 分間、4 $^{\circ}$ C で遠心し、上清を回収する。上清は界面活性剤で可溶化した糖タンパク質溶液試料として扱うことができ、レクチンマイクロアレイ測定可能となる。

以上の処理でレクチンマイクロアレイ測定可能を行い、検出不良なら以下の条件調整を行う。

①バッファー組成 (蒸留水、クエン酸、EDTA、グリシン、トリス:種類と濃度について)、②pH (pH2.0~9.0 での最適値の検討)、③変性剤 (SDS、尿素、 $\beta$ メルカプトエタノール:種類と濃度について)、界面活性剤 (NP-40、Tween 20、Triton X-100:種類と濃度について) ④加熱 (60~100 $^{\circ}$ C、時間、単一温度か多段階温度設定か)。の各項目を微調整し、最も効率的にタンパク質を抽出できる条件を検索する。

CIN1~3、子宮頸部扁平上皮癌、およびその再発・転移性腫瘍組織 (各 20 例) でのレクチンマイクロアレイを施行する。

(3) タンパク質溶液を蛍光標識 (Cy3 Mono-Reactive dye pack: GE Healthcare) する。

- ① 室温、暗所で 1 時間反応させ、脱塩カラム 6 を 2.0mL チューブにのせて、1,500 $\times$ g、1 分間、4 $^{\circ}$ C で遠心する。脱塩カラムに TBS8300  $\mu$ L をアプライし、1,500 $\times$ g、1 分間、4 $^{\circ}$ C で遠心し、廃液を廃棄する。(カラム洗浄 3 回)
- ② 標識試料の全量をアプライし、その上から TBS 25  $\mu$ L を加え、1,500 $\times$ g、2 分間、4 $^{\circ}$ C で遠心する。脱塩カラムを捨て、試料を回収する。(標識試料 1  $\mu$ g/45  $\mu$ L) レクチンマイクロアレイに反応させたい濃度のうち最も高い濃度に合わせて、サンプルを調整する。
- (4) レクチンマイクロアレイの反応
- ① 96 ディープウェルプレート上で、各標識試料を Probing Solution で反応させる濃度に調製する。
- ② アレイをフリーザー (-20 $^{\circ}$ C) から取り出し、遮光、室温に戻す。
- ③ 各ウェルに 100  $\mu$ L ずつ Probing Solution を加える。アレイを軽くゆすって裏返し、加えた Probing Solution を捨て、ウェル内を乾燥させないようにすぐに、アレイの各ウェルに 100  $\mu$ L ずつ Probing Solution を加える。この操作は、アレイウェル内を乾燥させないように、アレイ 1 枚ずつ行う (アレイ洗浄は計 3 回)。
- ④ 通常、1 種類の試料につき LecChip<sup>®</sup>

1 枚使用して、ウェル 1 から 7 にかけて、2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 (ng/mL) をアプライする。20 $^{\circ}$ C のインキュベータ内で、15 時間以上、攪拌させながら反応させる。

(5) レクチンマイクロアレイの測定

① 100% エタノールを含ませた布でアレイの裏面及び側面を拭き、スキャナーにアレイにセットし、測定する。

(7) 新規バイオマーカー候補の選出

候補マーカーあげ (3~10 種程度)、症例数を増やし、CIN の鑑別に有用な候補、子宮頸癌再発症例に特異的マーカーを選定する。

(8) FFPE 組織以外の検体への応用

低侵襲でえられる子宮頸部細胞診検体や血清でも同様にレクチンマイクロアレイ測定条件を調整し、レクチンマイクロアレイ解析を行う。

#### 4. 研究成果

手術などで採取された 16 人の子宮頸部ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いてがん部と非がん部をレクチンマイクロアレイによって比較解析した。結果はマイクロアレイにおける 4 5 種類のうち、Hippeastrum hybrid lectin (HHL) が統計学的に有意に存在していた。その他にも約 3 種類のレクチンが候補としてあげられた。局在の確認では組織のレクチン染色においてもがん HHL が存在していることが明らかになった。子宮頸癌の診断のマーカーまたは治療のターゲットになり得るか糖鎖解析などをすすめ、今後も検討を継続する。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

(1) 子宮頸部扁平上皮癌におけるレクチンマイクロアレイを用いた糖タンパク質解析  
第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会  
戸澤 晃子

2013 年 5 月 12 日 ロイトン札幌 (北海道札幌市)

(2) **Glycan profiling using formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: Hipppeastrum hybrid lectin is a sensitive biomarker for squamous cell carcinoma of the cervix**  
The 18th International Meeting of the European Society of Gynaecological Oncology  
Akiko Tozawa

2013 年 10 月 20 日

Liverpool (UK)

〔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〕

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

戸澤 晃子 (TOZAWA, Akiko)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：90569865

### (2) 研究分担者 該当なし

### (3) 研究協力者

小泉 宏隆 (KOIZUMI, Hirotaka)

聖マリアンナ医科大学・医学部・

准教授

研究者番号：10215155

熊井 俊夫 (KUMAI, Toshio)

聖マリアンナ医科大学・医学（系）研究科（研究  
院）・教授

研究者番号：40139671

西川 裕之 (NISHIKAWA, Hiroyuki)

聖マリアンナ医科大学・医学（系）研究科  
（研究院）・研究技術員

研究者番号：90387077