

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462595

研究課題名(和文) 質量分析計を用いた新規頭頸部癌唾液、血液マーカーの検出

研究課題名(英文) Identification of serum and salivary markers of head and neck cancers by mass spectrometer

研究代表者

小川 武則(Ogawa, Takenori)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：50375060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究結果として、1、頭頸部扁平上皮癌組織、正常頭頸部粘膜組織からRNAを抽出し、miRの精製を行った後、マイクロアレイを行いました。結果として、miR21,miR200ファミリーを中心とした、一部新規頭頸部癌高発現miRを含む候補miRを抽出しました。2、Real time PCRを用い、これらの候補miRを検証し、確認を行いました。3、血清よりエクソソーム内miRを抽出し、一部はcirculating miRであることを確認しました。4、質量分析計を用い、血清中の新規がん関連蛋白の検出を行い、ガレクチン3結合蛋白などの新規性のあるバイオマーカーの検出に成功しました。

研究成果の概要(英文)：Currently, no reliable serum biomarkers for head and neck squamous cell carcinoma exists as they do for serum SCC using Cyfra levels. The aim of this study is identification of new biomarkers using microRNA microarray and mass spectrometry. We compared normal mucosa to head and neck squamous cell carcinoma samples using MicroRNA analysis which allowed us to identify 8 microRNA candidates including those in the miR21 and miR200 families. These microRNA candidates were then validated using real time PCR. Two of the eight microRNA were identified in serum circulating microRNA. Further analysis of the microRNA candidates using mass spectrometry identified a new Galectin-3 binding protein serum marker. These new biomarkers may be useful in head and neck cancer diagnosis and treatment.

研究分野：頭頸部外科

キーワード：頭頸部癌 血清マーカー マイクロRNA 質量分析計

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部がんは、本邦発生癌の約 5% を占めるが、上中下咽頭、口腔、喉頭などの亜部位別にリスク因子も予後も異なる多臓器癌の集合体である。従来、頭頸部癌の 90% を占める扁平上皮癌の腫瘍マーカーとして、SCC や Cyfra などの血清マーカーが知られているが、頭頸部癌においてその特異性は低く、有力な診断マーカーは未発見であり、近年中咽頭癌のリスク因子であるヒトパピローマウイルス感染が予後良好因子であるなど新しい報告も散見される。一般的に腫瘍マーカーの価値として、一つは癌スクリーニング、二つ目に治療効果判定や再発などの治療マーカーとしての意義があるが、頭頸部癌においては、約 60% が初回治療時進行癌であること、再発診断も標準化された治療効果判定、経過観察方法がないことから、有効な腫瘍マーカーの検出が切望されている現状がある。頭頸部癌治療の特異性として、生命予後と共に重要である咀嚼・嚥下機能、呼吸・発語機能、聴覚・嗅覚・視覚・味覚などの感覚機能、顔貌・容姿などの機能温存治療の実現も重要であることから、頭頸部癌の早期発見、再発発見による恩恵は大きく、もし、頭頸部癌の有力な診断マーカーが検出されれば、がん検診はさることながら、癌治療においても非常に重要な側面を持つ重要な発見となる。

一方、他臓器固形癌のマーカー検索において、質量分析計を用いた唾液中のメタボローム解析、血清中のマイクロ RNA 解析など (Hennessey 2012) は注目を集めている。しかし、頭頸部癌における唾液診断、血清診断としては DNA のメチル化などのいくつかの有力なマーカーは知られているものの (Carvalho 2010) その実用化はまだいくつかの研究が必要な段階である。

近年、質量分析計を用いた癌診断は非常

に有用な手段として報告されており、今後マーカー検索においても期待される解析手法である (Zhou 2006, Huang 2009)。そこで、今回、臨床サンプルを用いたトランスレーショナルリサーチにて、頭頸部癌診断に有力な血清・唾液マーカーについて質量分析計を用いた研究を行いたく申請する。

本研究申請者は Johns Hopkins University, Division of Head and Neck Cancer Research との共同研究の中で、唾液検体、血清、パラフィン検体からのマイクロ RNA 検出を行い、腫瘍マーカーの探索を行ってきた。さらに、本研究においては、研究分担者として、東北大学医学系研究科分子病理学分野の堀井明教授の協力をいただく。この研究室は膀胱癌を中心とした各種癌の発がん、薬剤耐性を中心とした基礎的研究を多数報告しており、分子生物学的手法を用いた癌研究の中心的研究室である。頭頸部癌研究においても申請者との共同研究の中で、cDNA マイクロアレイ解析を行い、CDDP 高感受性予測遺伝子群 (52 遺伝子群) を発見し、これらの遺伝子群は CDDP 高感受性細胞株を抽出できる可能性を示した。また、CDDP 耐性株を作成し、CDDP 耐性獲得関与遺伝子群の同定にも成功し、さらに CDDP 獲得耐性に対し、RNA 干渉により CDDP 耐性を解除できる可能性を示した。さらに CDDP 体制細胞はタキサン系抗がん剤に感受性を持つこと、鼻副鼻腔扁平上皮癌のシスプラチン耐性の重要なマーカーとして、has-miR-34a を同定した。

以上、本研究により、頭頸部癌においても診断、治療に応用できるバイオマーカーを検出できる可能性が高く、さらに検出されたバイオマーカーの発現解析、機能解析を行うことにより、頭頸部癌診断のみならず、将来の頭頸部癌固有のターゲット遺伝子となる可能性も秘めた将来発展性のある研究テーマとして、研究を開始した。

## 2. 研究の目的

頭頸部癌患者（口腔癌、鼻副鼻腔癌、咽頭癌、喉頭癌、唾液腺癌、頸部食道癌、原発不明頸部癌などで疑い例を含む）を対象とし、治療前の唾液、血液、癌組織と正常粘膜を解析する。手術を行う症例においては、手術中にサンプル採取を行う。まず、唾液、血清を質量分析計で解析を行い、頭頸部癌癌検体、正常粘膜より核酸、蛋白を抽出し、マイクロRNAを含めたRNA発現解析をマイクロアレイ法にて行う。その結果、特徴的な発現変化が見られたマイクロRNA、メッセンジャーRNAに対し、その上流、下流のパスウェイ解析を行うとともに、血清、唾液中のRNA発現を定量PCR法にて同定する。また、これらのサンプルを用いたPCR法、免疫染色、場合によりDNA sequencing法などにより、分子生物学的手法を用いた頭頸部癌診断の新規分子マーカーの同定を目指す。

## 3. 研究の方法

頭頸部癌患者（口腔癌、鼻副鼻腔癌、咽頭癌、喉頭癌、唾液腺癌、頸部食道癌、原発不明頸部癌などで疑い例を含む）を対象とし、治療前の唾液、血液、癌組織と正常粘膜を解析する。手術を行う症例においては、手術中にサンプル採取を行う。サンプルよりRNA、蛋白を抽出し、島津製作所にてマイクロRNA、蛋白発現解析を行う。その結果、特徴的な発現変化が見られたマイクロRNAに対し、その上流、下流のパスウェイ解析を行う。その場合、DNA sequence法により、塩基配列の検索を行う可能性がある。また、これらのサンプルを用いたマイクロアレイ、PCR法、免疫染色などにより、分子生物学的手法を用いた頭頸部癌診断の分子マーカーの同定を目指す。また、これら対象患者において、治療後、再発時も唾液、血清採取を行い、腫瘍再発診断に有用なマーカーの検索もあわせて行う。

## 4. 研究成果

本研究においては、臨床還元可能な新規バイオマーカー検出のために臨床サンプルを用いたトランスレーショナルリサーチにて、マイクロRNA (miR)解析特に質量分析計を用いた解析を行った。結果として、正常粘膜、頭頸部扁平上皮癌組織、血液を用いた検討にて、以下の結果を得た。

(1) 頭頸部扁平上皮癌組織、正常頭頸部粘膜組織からRNAを抽出し、miRの精製を行った後、マイクロアレイを行った。結果として、miR21, miR200ファミリーを中心とした、一部新規頭頸部癌高発現miRを含む候補miRを抽出した。

(2) Real time PCRを用い、これらの候補miRを検証し、確認を行った。

(3) 血清よりエクソソーム内miRを抽出し、一部はcirculation miRであることを確認した。

(4) 質量分析計を用い、血清中の新規がん関連蛋白の検出を行い、ガレクチン3結合蛋白などの新規性のあるバイオマーカーの検出に成功した。

Currently, no reliable serum biomarkers of head and neck squamous cell carcinoma exists compared to serum SCC and Cyfra level. The aim of this study is identification of new biomarkers using microRNA microarray and mass spectrometer. As a result, we identified 8 microRNAs including miR21 and miR200 family, as candidate microRNAs from head and neck squamous cell carcinoma samples compared to normal mucosa by microRNA microarray. These microRNAs were validated by real time PCR. Two microRNAs of these eight microRNAs were identified in serum circulating microRNAs.

Furthermore, mass spectrometer was identified new serum marker Galectin-3-binding protein. These new biomarkers may help a head and neck cancer diagnosis and treatment.

#### 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5件)

1. Begum S, Hayashi M, Ogawa T, Jabboue FJ, Brait M, Izumchenko E, Tabak S, Ahrendt SA, Westra WH, Koch W, Sidransky D, Hoque MO., An integrated genome-wide approach to discover deregulated microRNAs in non-small cell lung cancer: Clinical significance of miR-23b-3p deregulation., Sci Rep. (査読あり), 2015, Aug 28;5:13236. doi: 10.1038/srep13236.

2. Okumura Y, Nomura K, Kikuchi T, Suzuki T, Hidaka H, Ogawa T, Katori Y., Clinical factors indicating the presence of malignant lymphoma before lymph node dissection., Acta Otolaryngol. (査読あり), 135, 513-8, 2015.

3. Maejima R, Iijima K, Koike T, Ara N, Uno K, Hatta W, Ogawa T, Watanabe KI, Katori Y, Shimosegawa T., Endoscopic balloon dilatation for pharyngo-upper esophageal stricture after treatment of head and neck cancer., Dig Endosc. (査読あり), 27, 310-6, 2015.

4. Sakamoto M, Iikubo M, Kojima I, Sasano T, Mugikura S, Murata T, Watanabe M, Shiga K, Ogawa T, Takahashi S., Diagnostic value of capsule-like rim enhancement on magnetic resonance imaging for distinguishing malignant from benign

parotid tumours.

Int J Oral Maxillofac Surg. (査読あり), 43, 1035-41, 2014.

5. Guerrero-Preston R, Ogawa T, Uemura M, Shumulinsky G, Valle BL, Pirini F, Ravi R, Sidransky D, Keidar M, Trink B., Cold atmospheric plasma treatment selectively targets head and neck squamous cell carcinoma cells., Int J Mol Med. (査読あり), 34, 941-6, 2014.

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 武則 (Ogawa, Takenori)

東北大学・病院・講師

研究者番号: 50375060

(2) 研究分担者

堀井 明 (Horii, Akira)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 40249983

齋木 由利子 (Saiki, Yuriko)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 80311223