

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791529

研究課題名（和文）新規口腔扁平癌腫瘍マーカー抗 Sideroflexin 3 抗体の臨床的評価および解析

研究課題名（英文）

Clinical analysis of anti-sideroflexin 3-autoantibody as a novel tumor marker for oral squamous cell carcinoma.

研究代表者

村瀬 隆一（MURASE RYUICHI）

愛媛大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70452696

研究成果の概要（和文）：

本研究は、早期発見が可能な新規口腔扁平上皮癌腫瘍マーカーの確立に主眼を置いている。われわれはプロテオーム解析の技術を用いて、口腔扁平上皮癌患者血清中に Sideroflexin 3 (SFXN3) の自己抗体価が特異的に上昇していることを明らかにした。患者 178 名、健常者 145 名を対象にした解析の結果、抗 SFXN3 抗体は 72% の感度、81% の特異度を持つことが明らかとなった。フォローアップマーカーとしては患者 35 例を対象に追跡調査を行った結果、19 例の患者で病勢に一致した抗体価の変化を示した。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to establish a tumor marker that can be applied for the early detection and follow-up oral cancer patients. Employing the proteomic approach using MALDI TOF-MS, 2-DE, patient's sera and culturing cell lines, a mitochondrial membrane protein, sideroflexin 3 (SFXN3), was identified. The serum anti-SFXN3-autoAb levels elevated in patients with oral squamous cell carcinoma significantly: with 72% sensitivity and 81% specificity against control samples. Changes in serum anti-SFXN3-autoAb levels after therapy correlated with the clinical tumor burden.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物系医歯薬学分野

科研費の分科・細目：外科系歯学臨床腫瘍学

キーワード：口腔扁平上皮癌、腫瘍マーカー、早期診断

## 1. 研究開始当初の背景

扁平上皮癌は口腔領域の 85% 以上を占め

る最も頻度の高い癌腫である。5 年生存率は 72.0～74.3% と比較的良好であるが、Stage

1,2 の早期症例に限ってみれば 86.1% とさらに良好な生存率となる。その一方、Stage 4 などの進展症例では 5 年生存率が 50% 程度にとどまることが知られる。従って他の癌腫と同様に早期発見が重要であるが、口腔癌は自覚症状が乏しいため、初診時ですでに進行癌となっているケースが少なくない。口腔癌の早期発見・早期治療を確実にするために、感度の良いスクリーニングマーカーが必要である。

しかし、現在主に使用されている扁平上皮癌の腫瘍マーカーである SCC 抗原値は、検出感度が低いうえ、偽陽性例も数多く報告されており改善の余地は大きい。とりわけ早期症例に対する感度の低さが問題となっている。また外科的切除後の再発時診断には特に難渋することが多く、優れたフォローアップマーカーの出現が望まれている。

## 2. 研究の目的

本研究は新規口腔扁平上皮癌腫瘍マーカーの確立を目的とし、癌患者を高感度に識別する血中自己抗体認識抗原タンパク質の同定を行う。腫瘍マーカーは従来、血中に存在する腫瘍抗原を測定するものがほとんどであるが、容積の小さい早期癌の場合は検出できないことが多い。しかし、血中自己抗体は生体の免疫系がごく微量の腫瘍抗原をも認識して誘導され得るものであり、腫瘍量の少ない病初期において診断上有用である可能性がある。また自己抗体価は、ごく少量の血液サンプルで測定できることから通常の血液検査に併せて行うことができ、キット化することによって手技も簡便となる。本研究では、口腔扁平上皮癌患者血清中で抗体価上昇の見られる自己抗体認識抗原タンパク質の同定を行い、その有用性を検討し、新規の腫瘍マーカーとして確立することが目的である。

## 3. 研究の方法

腫瘍抗原を認識する自己抗体を腫瘍マーカーの標的とする。患者血中に存在する自己抗体は、口腔扁平上皮癌細胞から抽出したタンパク質と患者血清を用いた 2D-Western blotting 法によって検出する。癌患者特異的に抗体価が上昇している腫瘍抗原は、腫瘍マーカーとして有用である可能性がある。この抗原は MALDI-TOF MS を使用し、Peptide mass Fingerprinting 法にて同定する。同定された腫瘍抗原に対する抗体価が、腫瘍マーカーとして有用であるか否か判別するために血清 ELISA 法を用いて評価する。具体的には、腫瘍抗原のリコンビナントタンパク質を作製し、これを固相化させた

ELISA プレートに血清を反応させて自己抗体価を測定する。抗体価の評価は、口腔扁平上皮癌患者、口腔領域の良性腫瘍患者、健常者の 3 群でそれぞれ比較検討を行う。真に腫瘍マーカーとして有用と考えられるものを同定できたら、標準曲線の作成、陽性、陰性を区別する cut off 値の設定などを行うとともに、安定した測定系（キット化）を目指す。また病期（Stage）別に評価し、早期癌における抗体価の評価、治療後の推移も評価する。

## 4. 研究成果

口腔扁平上皮癌細胞株 SAS を用いた実験の結果、癌患者血中では複数の腫瘍抗原に対して抗体価が上昇していることが示唆された。具体的には、Peroxiredoxin 1, Heat shock protein 60, α-enolase, Sideroflexin 3 (以下 SFXN3) などが候補タンパク質として同定された (図 1 参照)。これらのリコンビナントタンパク質を作製し、血清 ELISA による評価を行ったところ、SFXN3 が腫瘍マーカーとして最も有意であることが明らかとなった。SFXN3 は鉄輸送タンパク質のファミリーに属し、鉄代謝に関与することが既に報告されている。(口腔扁平上皮癌腫瘍マーカーとしての抗 SFXN3 抗体は現在特許申請中【特願 2006-096772】である。)

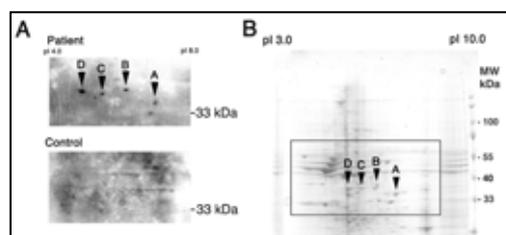
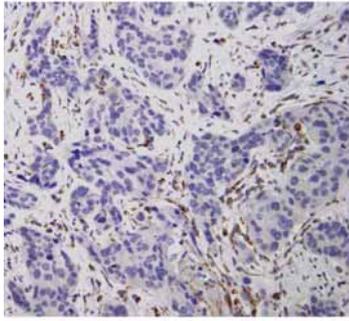


図 1: 口腔癌患者と健常者の血清を用いて抗体反応を比較した二次元電気泳動 (矢印 A が SFXN3)

患者 178 名、健常者 145 名を対象にした解析の結果、抗 SFXN3 抗体は 72% の感度、81% の特異度を持つことが示され、従来の腫瘍マーカーである SCC 抗原値を大きく上回る診断精度を得た。また早期癌 (T1 症例) の検出感度が 88% であり、従来問題とされてきた早期診断において特に有用である可能性が示された。免疫組織染色の結果、SFXN3 は主に癌細胞周囲の間質結合組織に強発現するとともに、比較的低下した癌細胞や腫瘍血管内皮細胞、正常上皮の基底細胞層にも若干の発現を認めた。これらのことより SFXN3 は口腔扁平上皮癌細胞の増殖が活性化されることによって組織中の発現量が増し、抗体価上昇を惹起すると推察された。(写真参照)



写真：SFXN3 の免疫組織染色の結果、SFXN3 は腫瘍周囲の間質結合組織に強発現していた。

また患者 35 例を対象に追跡調査を行った結果、19 例の患者で病勢に一致した抗体価の変化を示した（図 2 参照）。以上の結果からフォローアップマーカーとしての有用性も示唆されている。

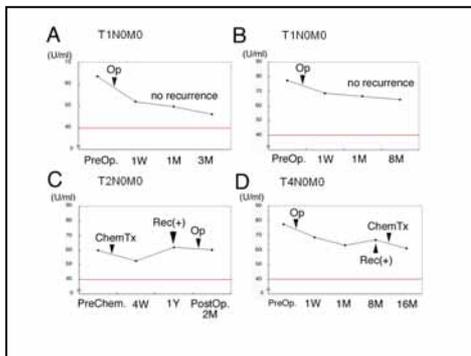


図 2：口腔扁平上皮癌患者の抗 SFXN3 抗体価の推移

SFXN3 の抗原認識部位を特定し、より高精度な抗体価測定キットを確立するために、SFXN3 を 3 つの fragment に断片化させて、検討を行った。この結果、N 末端側の fragment に特異的な抗体価の上昇を認め、抗原認識部位の存在が示唆された（図 3 参照）。抗体価上昇を惹起する詳細なメカニズムについては現在検討中である。

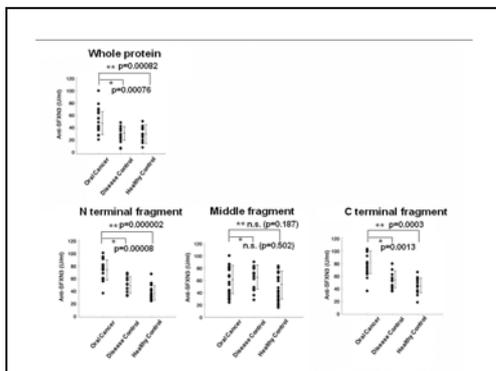


図 3：SFXN3 を 3 つの fragment に断片化させた検討。

## 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)

Serum autoantibody to sideroflexin 3 as a novel tumor marker for oral squamous cell carcinoma

Murase R, Abe Y, Takeuchi T, Imai Y, Kamei Y, Kagawa M, Ueda N, Sumida T, Hamakawa H, Kito K

*Proteomics*, 2008,2,517-527

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Serum autoantibody to sideroflexin 3 as a novel tumor marker for oral squamous cell carcinoma.

R Murase, Y Abe, T Sumida, K Nakashiro, H Hamakawa.

12<sup>th</sup> International Congress on Oral Cancer, Shanghai, China 2008

2. Functional restoration with dental implant after the treatment of oral cancer.

T Yoshimura, T Sumida, R Murase, K Nakashiro, H Hamakawa.

12<sup>th</sup> International Congress on Oral Cancer, Shanghai, China 2008

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

取得状況 (計 1 件)

名称：腫瘍マーカー、腫瘍診断キットおよび腫瘍マーカーの測定方法

発明者：阿部康人、浜川裕之、村瀬隆一

権利者：愛媛大学

種類：特許

番号：特願 2006-096772

出願年月日：2006 年 3 月 31 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村瀬 隆一 (MURASE RYUICHI)

愛媛大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70452696

(2)研究協力者

住田 知樹 (Sumida Tomoki)

愛媛大学・大学院医学系研究科・大学院生

研究者番号：50314951

天野 善之 (Amano Yoshiyuki)

三洋化成工業医療産業分社長

研究者番号：