

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591907

研究課題名（和文）質量顕微鏡による甲状腺癌未分化転化の網羅的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of the thyroid undifferentiated conversion by using a mass spectrometry

研究代表者

北村 守正（KITAMURA MORIMASA）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60543262

研究成果の概要（和文）：

質量顕微鏡を用いることで甲状腺乳頭癌は正常甲状腺組織と比較して2種類のホスファチジルコリンと1種類のスフィンゴミエリンが多く発現していることが明らかになった。ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリンはそれぞれのリン脂質を構成している脂肪酸により分類されているが、脂肪酸の違いによりどのような癌の特徴や生物学的意味があるのかは現時点では不明である。

また甲状腺未分化癌では10種類の脂質が正常甲状腺組織より多く発現していた。その分布状況を甲状腺乳頭癌と比較すると、脂質分布強度のバラつきは乳頭癌の方が未分化癌よりも多い傾向があった。従来、甲状腺未分化癌では乳頭癌と比較して多くの遺伝子変異があるため、脂質分布の症例間の差は未分化癌では大きいと予想されていたが、実際は未分化癌の脂質分布の症例間の差はより少ない傾向であった。

研究成果の概要（英文）：

It was revealed that one type of Sphingomyelin and two types of phosphatidylcholine in thyroid papillary carcinoma are more expressed as compared with normal thyroid tissue by using a mass spectrometry. Sphingomyelin or phosphatidylcholine is a type of phospholipid, and it is classified by each lipid acid constituting each phospholipid. But it is not known whether there is a biological meaning or a characteristic of the cancer due to the differences in fatty acid.

Ten types of lipid were expressed in undifferentiated carcinoma more than in normal thyroid tissue. It is generally known that undifferentiated carcinoma has much gene mutation as compared with papillary carcinoma. Therefore each difference in lipid distribution was expected to be large in undifferentiated carcinoma. But in fact the difference in undifferentiated carcinoma was smaller than that in papillary carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	900,000	270,000	1,117,000
2012 年度	900,000	270,000	1,117,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	950,000	4,350,000

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：質量顕微鏡、甲状腺癌、未分化転化

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 甲状腺未分化癌は非常に進行が早く、予後は極めて悪い。一般的に1年生存率は数%、5年生存率は限りなく0に近く、根治できる例はひじょうにまれである。甲状腺癌の未分化転化の原因遺伝子はp53などが報告されているが詳しいことはわかっていない。また、最近マイクロアレイなどの網羅的解析手法が発達し未分化癌に関する知見も出てきている (ITCH is a putative target for a novel 20q11.22 amplification detected in anaplastic thyroid carcinoma cells by array-based comparative genomic hybridization. Ishikawa T, et al. *Cancer Sci.* Oct; 99(10):1940-9, 2008)。しかし、マイクロアレイ得られる情報は mRNA の段階の情報であり、mRNA はさらに翻訳後修飾など多くの修飾をされてタンパクとなるので、実際の最終産物の動きを必ずしも反映していない。実際の最終産物を解析するにはタンパクなどの解析が必要 (ポストゲノム時代) であり、質量分析を行うことが有用となる。

(2) 2002年、田中耕一氏がタンパク質の質量分析手法 (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization : MALDI 法) の開発によりノーベル賞を受賞したのは記憶に新しい。MALDI 法を用いた質量分析計により数千の既知あるいは未知のタンパクの解析・同定が可能となり、発癌機構の解明、腫瘍マーカーの開発のみならずポストゲノム時代におけるプロテオーム解析の中心的手法として広く用いられている。しかし、質量分析計では物質の同定は可能であっても、その物質が体内 (組織上) のどこに分布するのか位置情報を解析することは不可能であった。

2006年、現浜松医科大学分子解剖学講座教授である瀬藤光利氏と島津製作所の共同研究により質量顕微鏡が開発された。質量顕微鏡は顕微鏡下に2次元でレーザーのスポットを走査することで任意の分子の切片上での位置情報を同定することが可能である。この方法により数十 $\mu\text{m}$ の解像度で数千から数万の分子 (タンパク、糖鎖、脂質) の組織分布 (位置情報) を一度に得ることが可能となった。

(3) 未分化癌は乳頭癌の一部が未分化転化して発症すると言われている。未分化癌患者の乳頭癌の部分と乳頭癌患者の乳頭癌を比較することで、同じ乳頭癌でも将来未分化癌になりやすいものとそうでないものを鑑別することができる可能性がある。また組織中に乳頭癌の部分と未分化癌の部分が混在している場合には、それらの組織を比較することで未分化転化の発生機序を解析できる可

能性がある。これらが可能であれば、未分化転化する前に甲状腺を全摘出し、予防的に放射性ヨード治療で治療することも可能となる。このように質量顕微鏡を用い、未知の分子の分布を見出し解析することで、未分化転化の発生機序を明らかにすることが可能となるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

甲状腺未分化癌、乳頭癌・濾胞癌などの分化癌、甲状腺正常組織を質量顕微鏡により解析を行うことで、腫瘍組織の構成物質や物理的変化を解明し、腫瘍部位の物質的背景が何であるかを明確にする。そして、1) 発病メカニズム、2) 診断マーカーの検索、3) 組織学的な悪性度、4) 予後と相関する分子を同定する。切片の作成、全処理をした後は1検体につき約1時間で解析が可能であり、将来的には病理診断の際に質量顕微鏡を導入し、予後判定や治療方針決定に役立てることを目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 甲状腺癌の初回手術は年間約50件行っており、うち未分化癌に関しては2-3件程度ある。質量顕微鏡での解析は共同研究をおこなっている浜松医科大学解剖学講座 (瀬藤光利教授) にて全て施行する。

(2) 甲状腺癌手術を施行後、得られたサンプルを液体窒素により凍結した後、クライオスタットで10 $\mu\text{m}$ の切片を作成し、ITO (Indium Thin Oxide) コートされたスライドガラス上に接着させ、DHB (2, 5-Dihydroxy benzoic acid) に10mMの酢酸カリウムを添加した溶液を塗布し、質量顕微鏡分析に供した。質量顕微鏡分析にはNd:YAG レーザー (波長355nm、周波数200Hz) を搭載した UltraflexII (Bruker Daltonics) を使用した。質量分析の測定範囲は400-900 $m/z$  する。

(3) 正常部は一般的な手術標本や診断的検査標本の末端を用い、本研究の対照群 (正常部) の採取を目的とした診断的検査や拡大的な手術は実施しない。

## 4. 研究成果

(1) 研究の対象 ; 京都大学医学部附属病院で行われた甲状腺未分化癌3症例および甲状腺乳頭癌7症例を研究の対象とした。対照群として未分化癌もしくは乳頭癌と隣接する正常甲状腺組織を使用した。

(2) 質量顕微鏡により得られたデータ (図1) をSIM tools (Shimadzu Corporation) を用いて統計処理を行った。癌と正常部分を比較し



Spring Meetings. April27-May1, 2011.  
Chicago

- ③ 石川征司、楯谷一郎、早坂孝宏、瀧澤義徳、大野 覚、児嶋 剛、木谷芳晴、北村守正、平野 滋、瀬藤光利、伊藤壽一.  
質量顕微鏡による甲状腺癌の観察. 第112回日本耳鼻咽喉科学会. 2011年5月19-21日、京都

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北村 守正 (KITAMURA MORIMASA)  
京都大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：60543262

### (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  
楯谷 一郎 (TATEYA ICHIROU)  
京都大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：20526363  
嘉田 真平 (KADA SHINPEI)  
京都大学・大学院医学研究科・医員  
研究者番号：70543263

### (3) 連携研究者

瀬藤 光利 (SETOU MITSUTOSHI)

浜松医科大学・解剖学講座 細胞生物学  
分野・教授

研究者番号：20302664