

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24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791959

研究課題名（和文）パラフィン包埋組織からのプロテオーム解析による新規口腔がんマーカーの開発

研究課題名（英文）Quantitative proteomics using formalin-fixed paraffin-embedded tissues of oral cancer

研究代表者

根岸 綾子（NEGISHI AYAKO）

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：70549972

研究成果の概要（和文）：口腔がんの化学療法の奏効性を治療開始前に正確に予測できれば、口腔がん医療のオーダーメイド化が可能になり、最終的には口腔がんの治療成績と患者のQOLの向上をもたらすことが期待される。術前化学療法を施行した口腔扁平上皮癌患者の生検時ホルマリン固定パラフィン包埋組織から抽出したタンパクをLC/MS測定を行い、無標識ペプチドの定量解析が可能な2DICAL法を用いてプロテオーム解析を行い、口腔がんの化学療法奏功性関する新規バイオマーカーを探索した。

研究成果の概要（英文）：Neoadjuvant chemotherapy is used to treat oral cancer however chemo-resistance is a major obstacle. The ability to predict tumour response would allow chemotherapy administration to be directed towards patients who would most benefit, thus maximising treatment efficacy. This study aimed to identify protein biomarkers associated with response to neoadjuvant chemotherapy using formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue blocks of oral squamous cell carcinoma samples and analyzed by 2-dimensional image-converted analysis of liquid chromatography and mass spectrometry (2DICAL), a label-free quantitative proteomics method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1600000	480000	2080000
2011年度	1400000	420000	1820000
年度			
年度			
年度			
総計	3000000	900000	3900000

研究分野：外科系歯学

科研費の分科・細目：外科系歯学・臨床腫瘍学

キーワード：プロテオーム、口腔がん、バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

口腔がんの化学療法の奏効性やリンパ節転移を治療開始前に正確に予測できれば、口腔がん医療のオーダーメイド化が可能になり、最

終的には口腔がんの治療成績と患者のQOLの向上をもたらすことが期待される。今回計画する研究は詳細な臨床病理情報が付随しているアーカイブの口腔がんのホルマリン固定パラフィン

包埋組織を用いて大規模なプロテオーム解析を行い、口腔がんのリンパ節転移、化学療法奏効性、患者の予後が予測できる新規バイオマーカーなどを見出すことを目的としている。

口腔扁平上皮がんは、診断・治療技術の進歩により、早期発見・早期治療を行うことにより比較的良好な治療成績を残すことが可能である。東京医科歯科大学顎口腔外科学分野では、現在までに口腔がんにおけるセンチネルリンパ節概念の検証やマイクロアレイ解析による転移リンパ節予測遺伝子の同定を通じて、*minimum invasive surgery* に向けて積極的な研究を続けてきた (Tomioakaら *J Oral Pathol Med.*, Kozakiら *Cancer Sci.*, Nguyen STら *Cancer Sci.*)。しかし、いまだに後発リンパ節転移や初診時からリンパ節転移をとまうようなステージが進んだ症例があつとを絶たない。そのような症例においても、その解剖学的位置関係と患者の術後 QOL の関係から極端な拡大手術は行えないという現状から、化学療法や放射線療法の併用が行われているが、満足いく治療成績が得られているとは言い難い。

口腔扁平上皮がんでは、5-FU や CDDP を用いた術前化学療法が比較的奏効することが知られているが、非感受性群に術前化学療法が施行された場合は、患者に対して、口内炎、悪心、下痢、免疫抑制などの無意味な負担を強いるだけでなく、切除範囲の誤りや適切な治療時期を逃す可能性まででてくる。そのため潜在的リンパ節転移の存在や術前化学療法の奏効性を治療開始前に予想できれば、口腔がん患者のオーダーメイド医療に大きく貢献するものである。

近年、マイクロアレイ技術の進歩により遺伝子の網羅的な発現解析はほぼルーチンに行われるようになって来た。しかし遺伝子の発現量とタ

ンパク質の発現量はかならずしも相関しないことが知られており (Chen ら *Mol Cell Proteomics*)、より直接に病態を反映すると考えられるタンパク質の発現解析が重要であると考えられる。従来網羅的なタンパク質の発現解析 (プロテオーム解析) は定量再現性などの点で技術的に困難であり、臨床検体を用いた大規模な解析には向かないと考えられてきた。

プロテオーム解析の中心施設である国立がんセンター研究所では、高精度の四重極搭載型の質量分析器を使用することで、血清や血漿のタンパク質の再現性のよい発現定量解析を可能としている。さらに定量値から機械学習を行い、新たなマーカーを抽出するコンピュータシステムを独自に開発し、食道がん患者の術前化学放射線療法の感受性群を高い正診率で予測することが可能なタンパク質の同定に成功している (Hayashidaら *Clin. Cancer Res.*)。さらに低流速の液体クロマトグラフィーと質量分析 (LC/MS) で得られる無標識ペプチドのデータを用い、1時間で6万から15万ものペプチドを比較定量解析するシステム *2DICAL(2-Dimensional Image Converted Analysis of Liquid chromatography and mass spectrometry)* 法を開発し (Ono ら *Mol Cell Proteomics*)、膵癌の血漿マーカー探索、子宮体癌のマーカー探索 (Negishi ら *Can Sci*) などの臨床研究に応用している。

また、今回の研究計画において特徴的な点は、口腔がんの凍結組織でなく、FFPE 組織切片を用いる点である。FFPE 組織は、各施設に膨大な症例のアーカイブがあり、病理診断のみならず、治療の効果や患者の予後といった詳細な臨床データの裏付けがあり、オーダーメイド医療のためのバイオマーカー探索に最も適した材料である。これまでは免疫組織染色、DNA マイクロアレイ等で研究がすすめられていたが、ホル

マリン架橋の影響からプロテオームには用いられてこなかった。

近年 FFPE 組織からタンパク質をペプチドとして抽出する方法が開発され (Prieto ら Bio Techniques.)、凍結組織が保存されていない過去の疾患でも、質量分析装置での解析が可能になってきている (Negishi ら Can Sci)。

2. 研究の目的

今回計画している研究は、臨床経過の明らかになった口腔扁平上皮がん症例の治療前の生検標本を多数症例解析し、化学療法奏効性を予測できるマーカーを同定することを目的としている。化学療法抵抗性が予測される症例に対しては別の治療法を選択し、無駄な副作用発現を防げるなど、口腔がん医療のオーダーメイド化に大きく寄与するものである。

3. 研究の方法

対象は東京医科歯科大学顎口腔外科学分野において口腔扁平上皮癌の診断がつき、術前化学療法を施行した患者のうち、治療が奏功した奏功群 10 例と、非奏功群 11 例を対象とした。各群の化学療法施行前の生検材料 (FFPE 組織) を検体とした。

21 症例の FFPE 組織からデオキシコレートを含むバッファーでペプチドとしてタンパク質抽出を行った。液体クロマトグラフィは日立ハイテク NaniFrontier nLC、質量分析装置は、AB SCIEX Triple TOF 5600 System を用いて各検体 2 回ずつ重複測定しペプチドピークのデータを得た。LC/MS 測定時に LC/MS/MS も取得した。

検出ピークは、多数検体の無標識ペプチドピークの定量解析が可能な 2DICAL (2-dimensional image-converted analysis of

liquid chromatography and mass spectrometry) を用いて統計解析を行った。

4. 研究成果

全 21 サンプルの総ピーク数は 42,677 ピークであった。2DICAL を用いた統計学的解析を行い、化学療法奏功群と、非奏功群の 2 群間で有意差のあるピークを約 198 ピーク選出し、そのうち 32 ピークは LC/MS/MS での同定が可能であった。今後はそれらのピークについてさらなる検証が必要である。

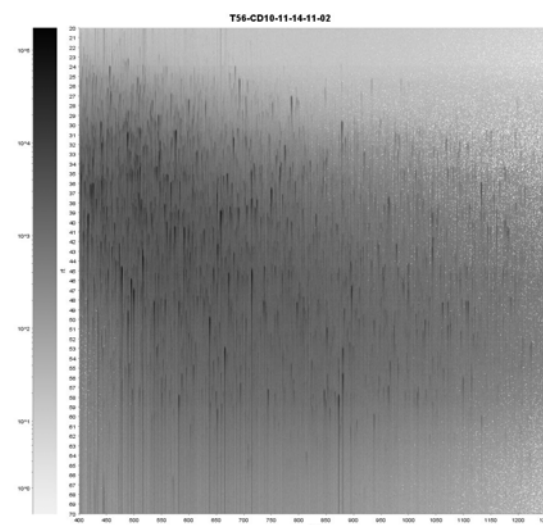


図 1 代表サンプルの総ピークを 2 次元にプロットした図。縦軸は LC の RT。横軸は m/z。色の濃淡はピーク強度を示す。

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 件)

〔学会発表〕 (計 件)

〔図書〕 (計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 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◇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

根岸 綾子 (Negishi Ayako)
東京医科歯科大学・歯学部・医員
研究者番号：70549972

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：