

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792179

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唾液腺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 salivary gland 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・非常勤講師

研究者番号：70549972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は唾液腺がんのプロテオーム解析を行い、予後予測などに有用な新規バイオマーカーを見出すことを目的とした。唾液腺がん患者から得られたホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織からタンパク質をペプチドとして抽出し、質量分析装置での測定を行ったが、非特異的タンパクとしてのHistonが多く認められ、目的とするようなマーカータンパクは同定されなかった。同様にHistonが多く認められた口腔扁平上皮癌の解析を先行し、ペプチド抽出の処理を変更したところ、化学療法や放射線療法などの術前補助療法の抵抗性を予測する分子の候補として galectin-7タンパクを同定した。

研究成果の概要(英文)：To identify prognostic factor of salivary gland cancers, the protein expression profiles of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue samples from salivary gland cancer patients were analyzed by quantitative proteomics. However, the histon proteins, abundant proteins, were mainly detected, and the expected protein markers were not detected. Therefore, we have changed the methods for extraction of peptides and performed quantitative proteomics for oral squamous cell carcinoma samples in which we also detected many abundant proteins. Then, we identified galectin-7 as a potential predictive marker of chemotherapy and/or radiotherapy resistance.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

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

東京医科歯科大学顎口腔外科学分野では、口腔がんの中でも頻度の高い扁平上皮癌を中心に、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。しかし、唾液腺がんについては、化学療法や放射線療法に抵抗性を示すものが多く、また手術療法により原発を制御したかに見えても、転移により予後不良となる症例が多い。

しかし、症例数が少ないことや切除標本のアーカイブの問題、ホルマリン固定パラフィン包埋組織からの RNA 抽出が不可能であったことなどから、現在まで微量な組織中の様々な細胞集団を個別に解析することは、非常に困難であった。

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、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。

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。

2. 研究の目的

口腔がんの中でも最も頻度の高い扁平上皮癌のプロテオーム解析と平行して、唾液腺がんのプロテオーム解析を行うことにより、唾液腺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全体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当施設で得られた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・唾液腺がんのホルマリン固

定パラフィン包埋組織 (FFPE: Formalin-Fixed Paraffin-Embedded tissue) を用いて詳細なプロテオーム解析を行い、口腔がん・唾液腺がんの予後や遠隔転移を予測できる新規バイオマーカーを見出すことを目的としている。

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生検または手術で口腔扁平上皮癌・唾液腺がんの診断がついた患者で、同患者の生検または切除標本の FFPE 組織を検体とした。

はじめに、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。その後、デオキシコレートを含むバッファーから変更し、Liquid Tissue MS Protein Partitioning Kit (Expression Pathology) を用いた。液体クロマトグラフィーは日立ハイテック 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

はじめに、唾液腺がん患者から得られた FFPE 組織の 30 検体からタンパク質をペプチドとして抽出し、質量分析装置での測定を行った。得られたペプチドの質量とイオン強度を、独自に開発した高速計算用並列コンピュータシステムを用いて定量化し検討したが、非特異的タンパクとしての Histon が多く認められ、目的とするようなマーカータンパクは同定されなかった。また、唾液腺がんの検討と平行して実施していた口腔扁平上皮癌の解析でも同様に Histon が多く認められたため、ペプチド抽出の処理を、デオキシコレートを含むバッファーから Liquid Tissue MS Protein Partitioning Kit (Expression Pathology) へ変更し、口腔扁平上皮癌症例の解析を先行して、再度質量分析装置での測定を行った。

その結果、口腔扁平上皮癌の解析において、化学療法や放射線療法などの術前補助療法の抵抗性を予測する分子の候補として galectin-7 タンパクを同定した。

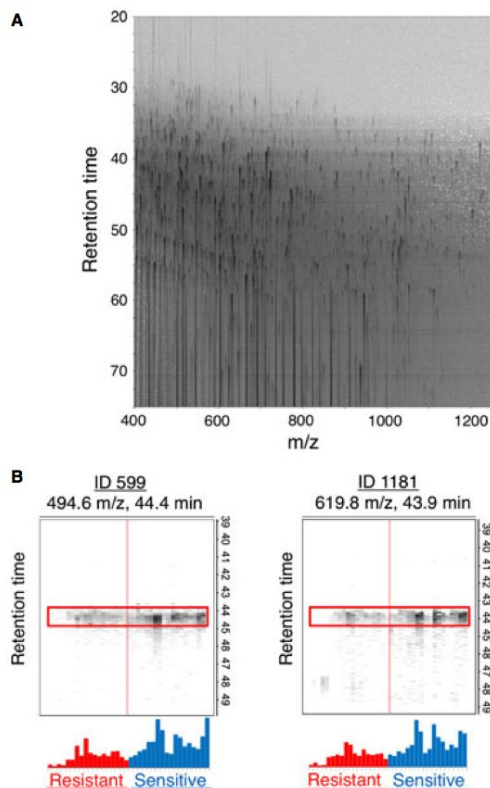


図1 総ピークの2次元プロットと galectin7 のピーク

そこで galectin-7 の免疫組織染色を行い、galectin-7 の染色面積を生検サンプルの組織全体の面積で割ったものを galectin-7 stained area (G7S)とした。核における galectin-7 の染色様式について、核が染色されている面積を galectin-7 で染色されている面積で割ったものを galectin-7 nuclear staining area (G7N)とした。また、G7Nの値が0.15より小さいものを弱 (G7NL=0)、0.15から0.40のものを陽性 (G7NL=1)、0.40より大きいものを強陽性 (G7NL=2) とするクラス分けを行い、galectin-7 nuclear staining level (G7NL)とした。ここで、G7SとG7NLを用いて判別分析を行い、以下の口腔扁平上皮癌に置ける術前治療抵抗性に関する予測式を得た。

Prediction score (G7PS) = 5.812 G7S - 1.246 G7NL - 1.96 (cutoff point: 0).

G7PSを用いた抵抗性予測の感度は100%、特異度は39.5%であった。

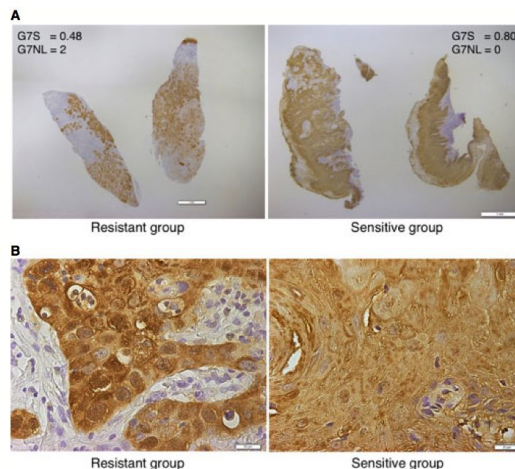


図2 galectin-7の免疫組織染色

次に疾患特異的累積5年生存率を検討したところ抵抗性予測群 (G7PS<0) で75.2%、感受性予測群 (G7PS≥0) で100%と有意差を認めた。

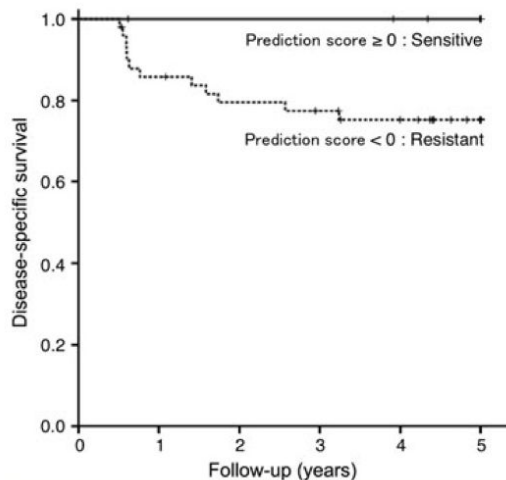


図3 生存曲線

口腔扁平上皮癌における galectin-7 発現の意義を検討するため、アデノウイルスベクターによる galectin-7 の強制発現系を構築し、口腔扁平上皮癌由来培養細胞に galectin-7 を強制発現させたところ、細胞増殖の抑制が認められたが、抗がん剤による増殖抑制に相乗的に作用することはなかった。

galectin-7 の強制発現による細胞増殖抑制がアポトーシスによるものかを検討するために caspase-3 の活性化を観察したが、ごく軽度の活性化しか認めなかったことより、

galectin-7 による細胞増殖抑制はアポトーシスによるものではなく細胞増殖を停止するような働きによるものと推察された。galectin-7 は細胞増殖を停止するような働きを持つと推察された。

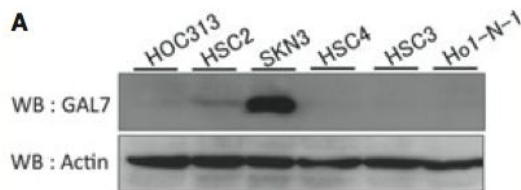


図4 口腔扁平上皮癌細胞での galectin-7 の発現

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)

1. Matsukawa S, Morita KI, Negishi A, Harada H, Nakajima Y, Shimamoto H, Tomioka H, Tanaka K, Ono M, Yamada T, Omura K: Galectin-7 as a potential predictive marker of chemo- and/or radio-therapy resistance in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Medicine*. 3(2):349-61, 2014. doi: 10.1002/cam4.195. 査読あり

〔学会発表〕(計3件)

1. 松川 祥, 森田圭一, 根岸綾子, 原田浩之, 中島雄介, 島本裕彰, 富岡寛文, 田中香衣, 尾野雅哉, 山田哲司, 小村 健: The potential predictive marker of chemotherapy and/or radiotherapy resistance in patients with oral SCC. 第72回日本癌学会学術総会 2013年10月3-5日 横浜市
2. 松川 祥, 森田圭一, 根岸綾子, 原田浩之, 中島雄介, 島本裕彰, 富岡寛文, 田中香衣, 尾野雅哉, 山田哲司, 小村 健: 定量的プロテオーム解析による口腔扁平上皮癌の術前治療抵抗性予測因子の同定. 第37回日本頭頸部癌学会 2013年6月13-14日 東京
3. 松川 祥, 森田圭一, 根岸綾子, 尾野雅哉, 山田哲司, 小村 健: 口腔癌のFFPEサンプルを用いた化学療法感受性予測因

子に関するプロテオーム解析. 第31回口腔腫瘍学会総会 2013年1月24-25日 東京

〔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

根岸 綾子 (NEGISHI AYAKO)

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号: 70549972

(2)研究分担者

(3)連携研究者