

フォーカス 26 <第 28 回> : 成果事例クローズアップ (NIMS 国際ナノテクノロジーネットワーク拠点)

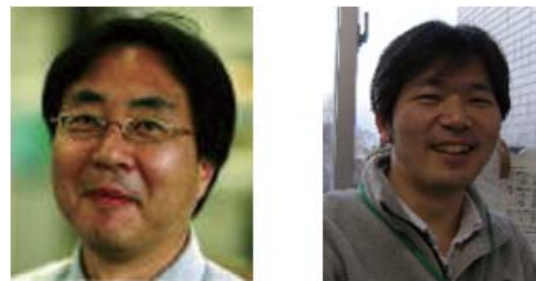
ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を用いた臨床プロテオミクスによる胆道癌・膵臓癌の新規バイオマーカーの探索

^a 東北大学病院 肝胆膵外科, ^b 東北大学大学院 医学系研究科 附属創生応用医学研究センター, ^c 東北大学大学院 医学系研究科 統合がん治療外科学講座

小野川 徹^{a,b}, 前田晋平^a, 高館達之^a, 森川孝則^a, 元井冬彦^a, カ山敏樹^a, 片寄友^{a,c}, 江川新一^a, 海野倫明^{a,b}
NIMS 国際ナノテクノロジーネットワーク拠点 花方信孝, 箕輪貴司



東北大学病院肝胆膵外科研究グループ
前列向かって左から：小野川 徹, 海野倫明, 森川孝則
後列向かって左から：高館達之, 前田晋平, 白崎圭一



NIMS 国際ナノテクノロジーネットワーク拠点
花方信孝 (左), 箕輪貴司 (右)

1. はじめに

東北大学病院肝胆膵外科は肝胆膵外科治療のスペシャリスト集団としてチームで診療に当たり、東北地方はもとより、全国から数多くの患者が集まり、手術数及び成績は全国でも有数である。したがって臨床情報や予後情報の明らかな検体(標本)を多数保存しており、手術標本を使用した研究に最も近い所に位置している。

一方、物質・材料研究機構ナノ融合センターソフトウェアラインでは文科省ナノネットプロジェクトの下、組織標本の微細な領域を切り出しプロテオーム解析を実施する、という技術を提供している。

この両者の共同により「過去の治療によって病院に保存されている臨床情報や予後情報の明らかな検体でプロテオーム解析がどこまでできるか」というテーマの研究が開始された。

*問い合わせ：
NIMS 国際ナノテクノロジーネットワーク拠点
(独) 物質・材料研究機構
〒305-0047 茨城県つくば市千現 1-2-1
電話：029-859-2777
E-mail：nsnet@nims.go.jp

2. 研究の背景と目的

ホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded: 以下 FFPE) 標本は最も普遍的な組織固定法であり、多くの病院で何千から何万の標本が保存されている。FFPE 標本を用いた研究では、膨大な数の試料が予後情報などの臨床データを加えた状態でアーカイブされており、レトロスペクティブな解析が容易ではあるが、FFPE 標本はホルマリンによる分子内および分子間の非特異的クロスリンクによりタンパク質・核酸は固定化・断片化されるため、これら生体分子の解析は不可能と考えられてきた。しかしながら最近の技術革新により FFPE 標本からタンパク質や核酸を抽出する手法が確立され、プロテオミクス・マイクロアレイ等に供することが可能となった。[1][2]

膵臓癌・胆道癌は、それぞれ部位別がん死亡数では国内 5・6 番目に位置し、死亡/罹患比をみてもこの 30 年間で治療成績の大きな改善は得られておらず、消化器系悪性腫瘍のなかで最も予後不良ながんの代表である (図 1)。ともに特異的な臨床症状に乏しいだけでなく、症状が出現した時点で進行癌であることが多く、臨床症状から早期診断することは困難で、現在外科的切除以外に根

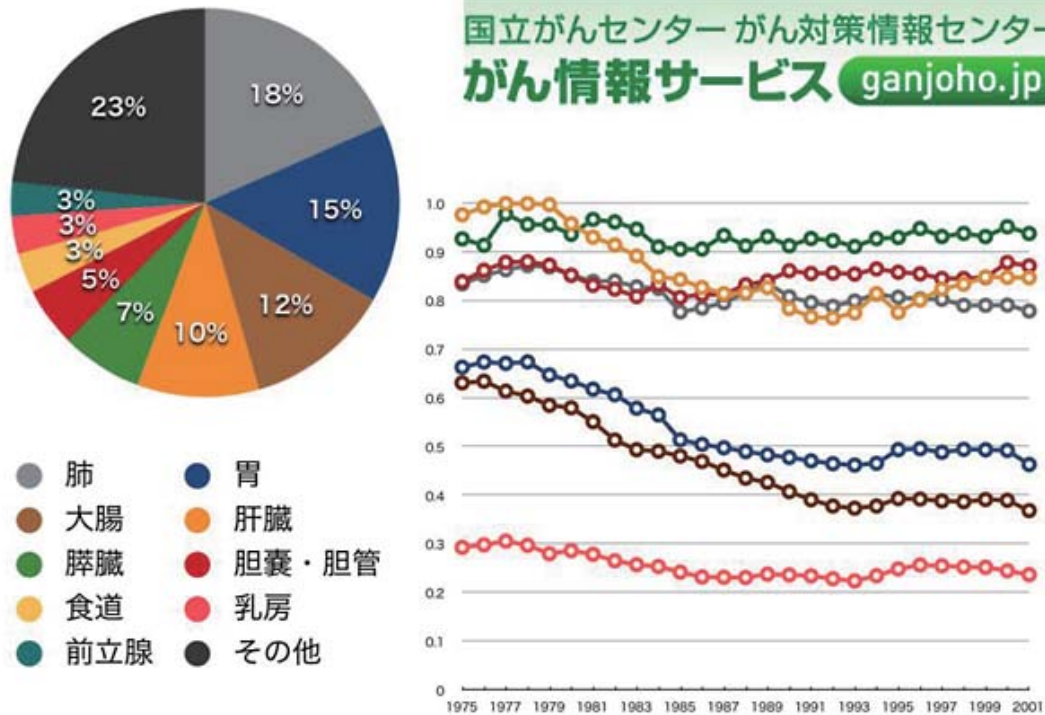


図1 胆道癌・膵臓癌に関する統計

グラフ右：部位別死亡数，左：部位別死亡／罹患比（国立がんセンターがん対策情報センターより引用）

治療が期待できる治療法がない。

ことに診断・治療には十分に経験を積んだ医師による高度な技術が求められるが、治療成績向上には多くの課題が診断の面からも治療の面からも残されており、各施設間で独自の経験に基づく診療内容にばらつきが多いのが日本のみならず、世界での現状である。それゆえ、膵・胆道癌の危険因子（マーカー）を見いだすことは極めて重要である。今日膵臓癌腫瘍マーカーとして測定されるCA19-9やCEAは、その感度・特異度は鋭敏ではなく、決め手となるような特異的腫瘍マーカーは存在しないと言って良い。未だ系統だった診断・治療アルゴリズムのない胆道癌・膵臓癌における罹患や早期診断、将来の疾病への罹患、病態の変動・予後、治療反応の予測に寄与する新規バイオマーカータンパク質を探索することが本研究の目的である。

3. 研究の対象

(1) 胆道癌（進行度予測因子の抽出）

まず早期発見が困難で予後不良な肝外胆管癌に絞って検討することとした。術後残肝容積増大を目的とした門脈塞栓療法導入や画像診断能の向上に伴い、大量肝切除などの術式や手術成績の安定化が得られた1998年～2008年までに当科で手術を施行され、臨床情報や予後情報が明らかで術前放射線照射・化学療法症例、在院死亡例を除いた肝外胆管癌のFFPE組織153例からStage I 7例、Stage IV 7例の計14例を対象とした。コントロール

（非癌部組織）には胆道癌以外の症例から採取された胆管上皮7例を用いた。（図2）

(2) 膵臓癌（予後不良・治療抵抗因子の抽出）

1998～2007年までに、当科でR0（病理学的に癌遺残を認めない）膵切除が行われ、組織学的に浸潤性膵管癌と確定診断されたFFPE組織156例を対象とする。さらに既知の予後因子の影響除外のため、156例の中から、国際がん分類Stage III症例109例を選択、組織型が中分化型腺癌のものでR0切除が行われた65例のうち、術後CA19-9正常値を呈した38症例を抽出、術後外来補助化学療法プロトコールが同一（塩酸ゲムシタビン：1000mg/m³・週1回投与・3週投薬／1週休薬）で、他病死や観察期間が十分でない症例を除いた8例の予後は、4例が術後約2年以内に再発し死亡しており、他の4例はほぼ5年生存が得られていた。これを予後不良群と予後良好群とし、比較検討した。（図3）

4. 解析のワークフロー

目的のFFPEブロック組織から通常の病理プレパラート作製と同様にレーザーマイクロダイセクションシステム用に開発されたエネルギートランスファーコーティングスライドガラス上に10μm厚の薄切標本を抽出用プレパラートとして作製する。病理医とのディスカッションを経て目的とする細胞特異的なマイクロダイセクションを行う。NIMSナノ融合センターのLeica LMD 6000を

用い最小幅 1 ~ 2µm と高精度で完全なコンタミフリーで UV レーザーにて切り抜き，サンプルを重力落下方式により抽出用 Buffer に直接回収する．サンプルからタンパク質を可溶化後トリプシンによりペプチド化する．厚さ

10µm の切片のおよそ 2 × 4mm の範囲を採取すればおよそ 30,000 個の細胞が得られると考えられ，約 2 ~ 4µg のタンパク質が得られると期待される．(LC-MS/MS による解析 10 回分に相当)

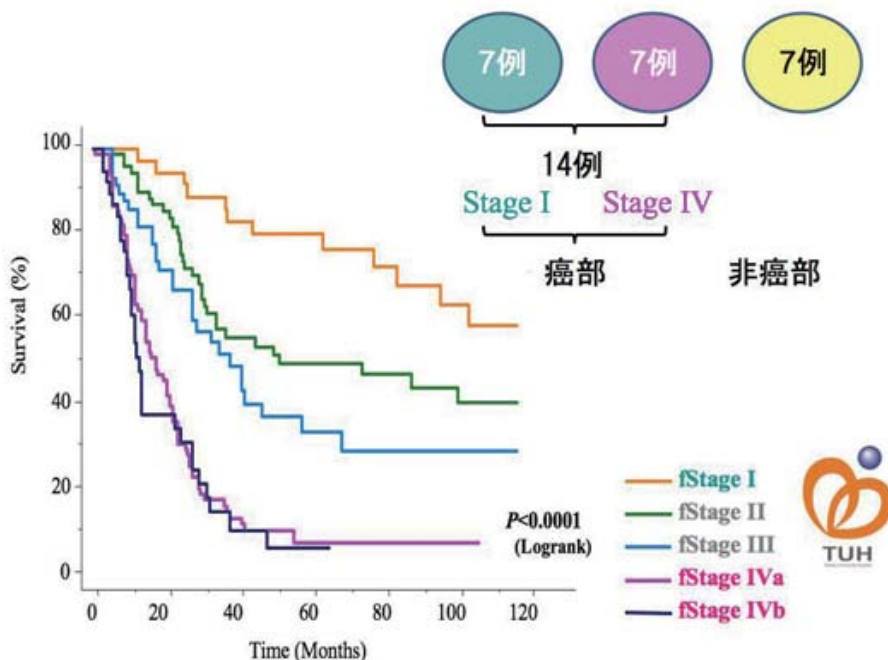


図 2 当科における胆道癌切除症例の治療成績（進行度予測因子の抽出）

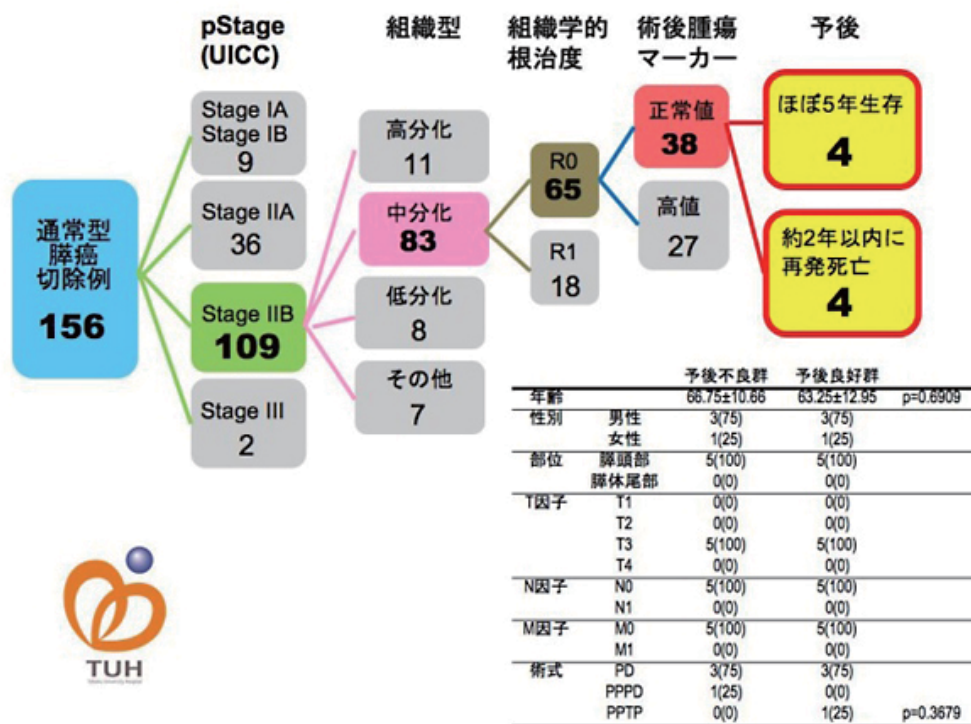


図 3 当科における通常型膵癌切除症例の治療成績（予後不良・治療抵抗因子の抽出）

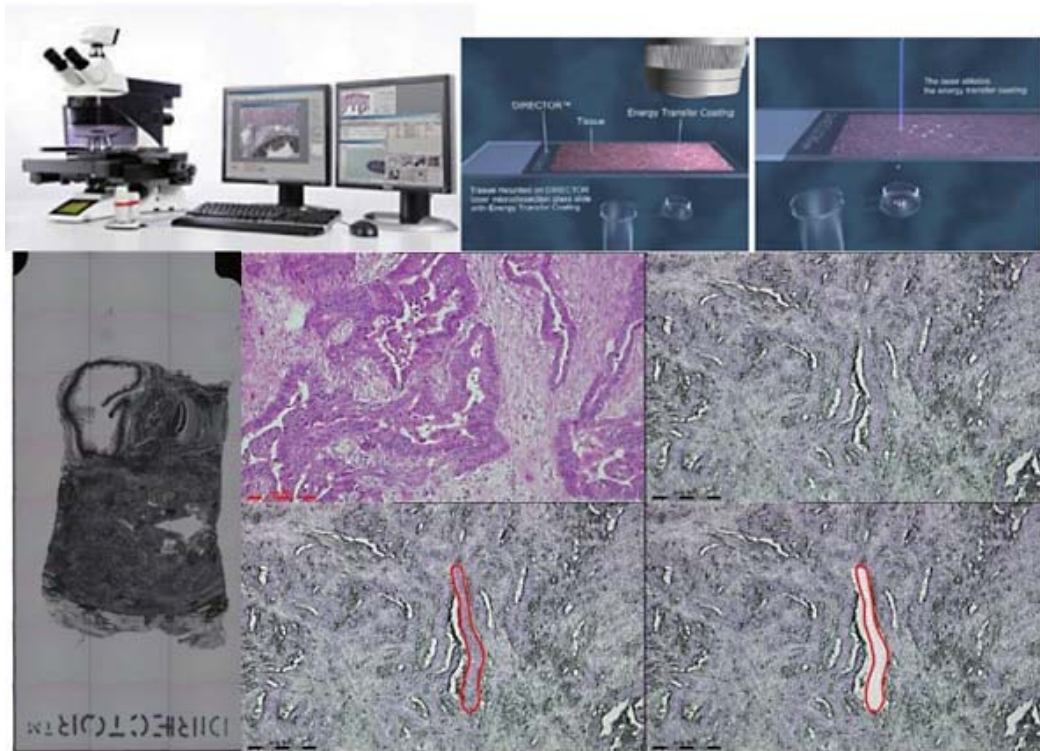
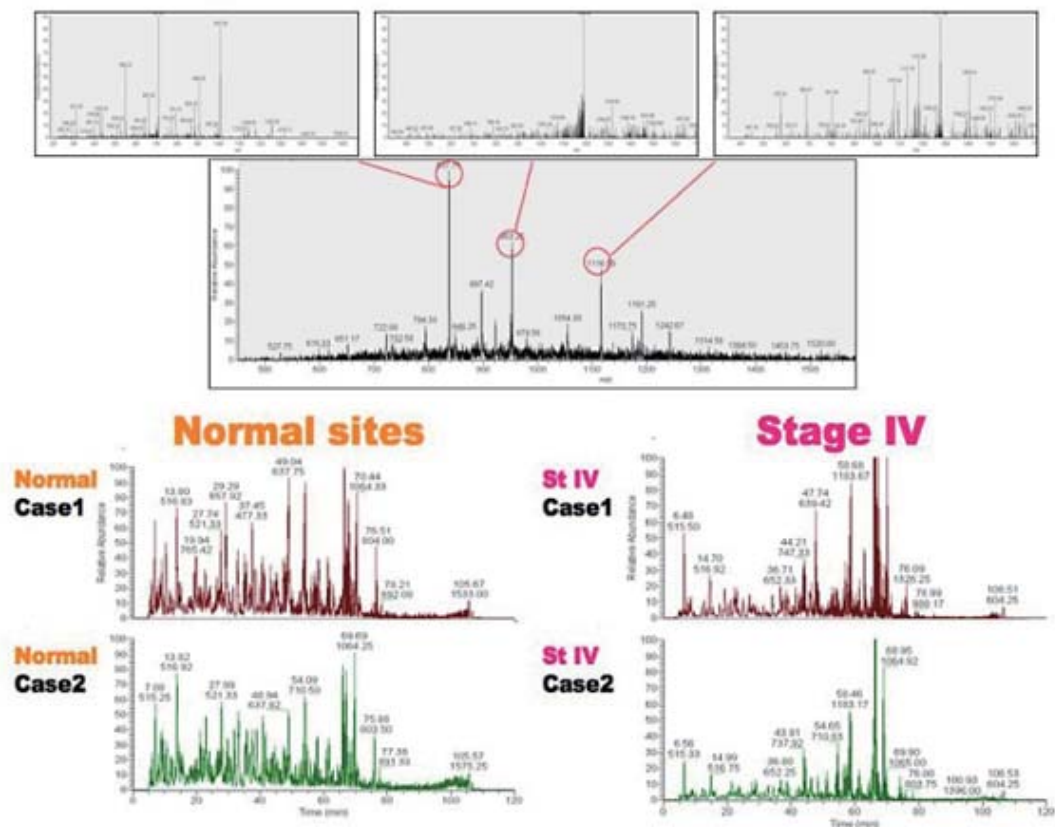


図4 目的細胞のダイゼクションの実際（膵癌）
 集積したサンプルを NIMS ナノ融合センターの nano flow ESI- イオントラップ型 LC/MS (ZAPLOUS Discovery LC/MS) を用い、
 同一サンプルを 3 回測定し、網羅的にプロテオーム解析する。
 各群でのタンパク質発現を半定量的に比較して、群特異的な発現タンパク質の同定を行う。 [3][4][5][6]



5. これまでの進捗状況と成果

① FFPE 組織切片のプロテオーム解析に関する基礎検討

FFPE 作製までの標準的プロセスは次の通りである。手術にて剥離・血行遮断を行い標本を摘出、郭清リンパ節の提出、マクロ写真撮影、家族への説明の終了後、ホルマリンに(ある時間後)一定時間(1~2日程度)浸漬する。その後病変部を切出し、剖面撮影、脱脂・脱水パラフィン浸透、包埋し FFPE ブロックが完成する。手術検体に対するホルマリン処理の実際は、医療機関の間で同一ではなく、同一施設内の対象症例間でも厳密にはばらつきがある。FFPE 作製開始時間・包埋までの時間・薄切までの時間・伸展時間を一致させた7種類の固定処理後サンプルと未固定凍結サンプルを用いて、ホルマリン固定処理方法の違いが、同定ペプチド数や同定タンパク数等、プロテオーム解析結果に与える影響につき検討した。

実臨床に沿って摘出後1時間放置(仮想標本整理時間)、7種類のホルマリン組成・浸漬温度・浸漬時間の条件で、同定タンパク質数、同定ペプチド数を比較すると、放置1時間で同定タンパク質数が未固定凍結標本の8割以上は同定可能であった。また、いったん固定された後は、固定時間が短くても長くても(1週間浸漬してしまったとしても)、ホルマリン濃度に関係なく、同定タンパク質数はほぼ同程度であり、その Gene ontology 分布にも変化はないと考えられた。[9]

② 胆道癌 FFPE 組織からのバイオマーカー探索(進行度予測因子)

Discovery stage として21症例(癌部 Stage I 7例, 癌部 Stage IV 7例, 非癌部 7例)の網羅的 MS 解析を行い、Stage I: 1266種類, Stage IV: 1143種類, 非癌部: 1095種類(癌部: 1664種類, 全体: 1993種類)のタンパク質を同定した。

タンパク質同定の根拠となった同定ペプチド数・ペプチド総数・アミノ酸数・サンプル数等の数値化データから、質量分析理論に基づき提唱される近似定量法であるスペクトラル・カウント(半定量比較解析)法により、スペクトラルインデックス(SI), 相対発現量(NSAFk), 相対変化量(Rsc)を算出し、統計検定(G検定)により、癌部で有意に高発現している160種類のタンパク質をバイオマーカー候補として同定した。これら152種類のバイオマーカー候補の Gene Ontology 解析及び文献検索を行い、構造タンパク質やハウスキーピングタンパク質などを除外したタンパク質77種類を選定した。(タンパク質名のリストや数値化データは特許化に向けて非公開)[7][8][10]

③ 膵臓癌 FFPE 組織からのバイオマーカー探索(予後予測因子)

予後不良群: 924種類, 予後良好群: 845種類のタン

パク質, 全体で1099種類のタンパク質を同定した。胆道癌と同様の手法を用いて群間で発現に有意差のあるタンパク質73種類を選定した。これら73種は予後良好群で優位に発現するもの36種, 予後不良群で優位に発現するもの37種であった。さらにそれぞれのタンパク質について Gene Ontology 解析及び文献検索を行い、予後不良群4例と予後良好群4例との比較で8種類, 正常膵管5例と膵癌10例の比較で23種類を候補として選定した。[11]

6. 今後の予定と展望

消化器癌医療は過去における膨大な科学データに基づき発展を遂げてきたが、進行症例では、医療の限界を感じざるを得ない。癌研究は、基礎研究から臨床研究を経て医療現場における普及、普遍化へと繋がっていくことが標準的なプロセスであるが、その流れは一方方向ではなく、癌の医療現場より基礎研究へとの流れがあることも重要と考えられる。本研究は、外科医として自ら得た臨床検体で、臨床医の観点から、最先端の技術をもって基礎的解析を目指すものであり、胆道悪性腫瘍の効率的診断・治療を目指したトランスレーショナル研究として具体性と可能性の高さを持っているといえる。さらに、本研究成果が即座に臨床にフィードバックされるという特色を有しており、多くのがん患者に福音がもたらされることから、その全容解明は急務である。

今後症例を集積し、Geneontology 解析を行うなどすることで、候補の中で「血液や胆汁に現れる可能性がある」漏洩・分泌蛋白質などに絞り込み、術前に採取できる血液や胆汁を用いて選択的に検出・定量して候補マーカーを検証する新規研究戦略や、従来の形態学を超えた分子病理学的診断への応用、候補マーカーをターゲットした分子標的治療や分子イメージング技術開発等、産業や臨床医学上のイノベーションや肝胆膵診療のプレイクスルーにつながるような成果を生み出したいと考えている。

謝辞

本報告の一部は、物質・材料研究機構(NIMS)において、文部科学省の「ナノテクノロジー・ネットワーク」の一貫として行われた。また、本研究遂行にあたり共同研究者らによる技術支援・指導をいただいたことに深く感謝申し上げたい。

(敬称略)

1. 独立行政法人 物質・材料研究機構 ナノテクノロジー融合センター

竹村太郎, 船場康司, 梶原祥子, 箕輪貴司, 花方信孝

2. ライカマイクロシステムズ株式会社

前田めぐみ, 山田誠子, 西山隆太郎

3. エーエムアール株式会社
三上紗弥香, 遠藤洋子, 碓井史彦
4. 株式会社 バイオシス・テクノロジーズ
福田哲也, 板東泰彦
5. 東京医科大学 第一外科学講座
西村俊秀
6. 東北大学病院 肝胆膵外科
渋谷恵美子, 稲部景子

参考文献

- [1] Prieto DA, Hood BL, Darfler MM, Guiel TG, Lucas DA, Conrads TP, Veenstra TD, Krizman DB. : Liquid Tissue: proteomic profiling of formalin-fixed tissues. *Biotechniques*. 2005 Jun ; Suppl:32-5.
- [2] Hood BL, Darfler MM, Guiel TG, Furusato B, Lucas DA, Ringeisen BR, Sesterhenn IA, Conrads TP, Veenstra TD, Krizman DB. : Proteomic analysis of formalin-fixed prostate cancer tissue. *Mol Cell Proteomics*. 2005 Nov ; 4(11) : 1741-53.
- [3] Old WM, Meyer-Arendt K, Aveline-Wolf L, Pierce KG, Mendoza A, Sevinsky JR, Resing KA, Ahn NG. : Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2005 Oct ; 4(10):1487-502.
- [4] Powell DW, Weaver CM, Jennings JL, McAfee KJ, He Y, Weil PA, Link AJ. : Cluster analysis of mass spectrometry data reveals a novel component of SAGA. *Mol Cell Biol*. 2004 Aug;24(16):7249-59.
- [5] Paoletti AC, Parmely TJ, Tomomori-Sato C, Sato S, Zhu D, Conaway RC, Conaway JW, Florens L, Washburn MP. : Quantitative proteomic analysis of distinct mammalian Mediator complexes using normalized spectral abundance factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Dec 12 ; 103(50) : 18928-33.
- [6] Fu X, Gharib SA, Green PS, Aitken ML, Frazer DA, Park DR, Vaisar T, Heinecke JW. : Spectral index for assessment of differential protein expression in shotgun proteomics. *J Proteome Res*. 2008 Mar ; 7(3) : 845-54.
- [7] 小野川徹, 前田晋平, 岡上能斗竜, 森川孝則, 高館達之,

石田和之, 前田めぐみ, 竹村太郎, 三上紗弥香, 遠藤洋子, 山田誠子, 西山隆太郎, 箕輪貴司, 花方信孝, 板東泰彦, 碓井史彦, 西村俊秀, 力山敏樹, 片寄友, 江川新一, 海野倫明: 胆道癌ホルマリン固定パラフィン包埋組織からのディスカバリープロテオミクス, 第5回日本臨床プロテオーム研究会 (JSCP): (シンポジウム・指定演者発表) 2009年5月9日・東京

[8] 小野川徹, 前田晋平, 岡上能斗竜, 森川孝則, 高館達之, 石田和之, 前田めぐみ, 竹村太郎, 三上紗弥香, 遠藤洋子, 山田誠子, 西山隆太郎, 箕輪貴司, 花方信孝, 板東泰彦, 碓井史彦, 西村俊秀, 力山敏樹, 片寄友, 江川新一, 海野倫明: 胆道癌ホルマリン固定パラフィン包埋切片からのディスカバリープロテオミクス, 日本ヒトプロテオーム機構 (JHUP) 第7回大会: (シンポジウム・指定演者発表) 2009年7月27日・東京

[9] 小野川徹, 高館達之, 三上紗弥香, 竹村太郎, 前田めぐみ, 吉田寛, 乙供茂, 前田晋平, 福田哲也, 板東泰彦, 碓井史彦, 箕輪貴司, 花方信孝, 西村俊秀, 海野倫明: ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織切片の臨床プロテオーム解析における基礎パラメータの検討, 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会・第6回日本臨床プロテオーム研究会連合大会: 2010年7月26・27日・宮崎

[10] 前田晋平, 小野川徹, 三上紗弥香, 竹村太郎, 前田めぐみ, 福田哲也, 遠藤洋子, 山田誠子, 西山隆太郎, 板東泰彦, 碓井史彦, 高館達之, 森川孝則, 力山敏樹, 片寄友, 江川新一, 箕輪貴司, 花方信孝, 西村俊秀, 海野倫明: 胆道癌 FFPE 組織を用いた網羅的プロテオーム解析による新規バイオマーカーの探索と検証, 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会・第6回日本臨床プロテオーム研究会連合大会: 2010年7月26・27日・宮崎

[11] 高館達之, 小野川徹, 藤井清永, 元井冬彦, 前田晋平, 森川孝則, 竹村太郎, 箕輪貴司, 三上紗弥香, 前田めぐみ, 山田誠子, 福田哲也, 板東泰彦, 碓井史彦, 力山敏樹, 片寄友, 江川新一, 花方信孝, 西村俊秀, 海野倫明: FFPE 組織を用いたレトロスペクティブプロテオミクスによる膀胱癌新規予後予測マーカーの探索, 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会・第6回日本臨床プロテオーム研究会連合大会: 2010年7月26・27日・宮崎

(NIMS 国際ナノテクノロジーネットワーク拠点 箕輪貴司)