博士（歯 学） 守 屋 信 吾

学 位 論 文 題 名

「Differential expression of HSP90, gelsolin and GST-π in human gastric carcinoma cell lines」

学位論文内容の要旨

胃癌の頻度は減少傾向にあるものの、日本では他の国々に比べ高率である。特に、スキルス胃癌は癌細胞の急速な増殖と深部への浸潤を特徴としている。臨床的には、スキルス胃癌はBorrmann Ⅳ型に属する場合が多く、他の胃癌に比べ予後がより不良と考えられている。胃癌でも他の癌と同様に、幾つかの癌遺伝子及び癌抑制遺伝子の量的あるいは質的な異常があるとの報告がある。しかしながら、スキルス胃癌の機序は十分に分かっていない。そこで、私は正常胃粘膜上皮に比べ、特に低分化型胃癌及びスキルス胃癌で、異常に発現している新たな蛋白質の同定を試みた。

正常胃粘膜上皮及び各組織型の胃癌細胞株より蛋白質を抽出した。正常胃粘膜上皮からの蛋白質抽出法は、以下のように行った。手術時に得た正常胃粘膜より血液及び付着物などを取り除き、さらに筋層を除去した。次に、30mM EDTA-Hanks溶液に約30分間浸した後、上皮層のみを機械的に剥離した。これらの蛋白質をO'Farrellの二次元電気泳動法に従い分離展開し、蛋白質スポットを銀染色法により検出た。

その結果、分子量90キロダルトン、等電点4.9(p90-4.9)の蛋白質の発現が、正常胃粘膜上皮に比べ、胃癌細胞株で亢進していた。また、分子量92キロダルトン、等電点5.7(p92-5.7)の蛋白質の発現が、正常胃粘膜上皮に比べ胃癌細胞株で低下していた。さらに、分子量25キロダルトン、等電点5.6(p25-5.6)の蛋白質の発現が、正常胃粘膜上皮及び分化型胃癌細胞株に比べ、低分化型胃癌細胞株およびスキルス胃癌

細胞4株中2株で亢進していた。

等電点及び分子量より、Celisらの報告した two-dimensionl gel data baseを参考にして推定し、これらの蛋白質に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。その結果、p90-4.9は 90キロダルトン熱ショック蛋白質(HSP90)、p92-5.7はアクチン調節蛋白質の一つであるゲルゾリン、p25-5.6はグルタチオン S-トランスフェラーゼ-π(GST-π)と同定された。

次に、これらの蛋白質の発現量をより正確に比較するために、蛋白質を一次元的に展開した。HSP90は、下槽buffer及びgel中にはSDSを加えず上槽bufferのみに、0.03%のSDSを加えるというMendelらの方法に従い分離した。さらに、ゲル濃度を5%にすることによりHSP90α及びHSP90βフォームに分離することができた。正常胃粘膜上皮に比べ、HP90α及びHSP90βの発現が、各種胃癌細胞株で亢進していた。ゲルゾリンの発現量は、スキルス胃癌細胞株HSC-39では、正常胃粘膜上皮に比べ、僅かに低下していた。他の胃癌細胞株では、組織型に拘わらずゲルゾリンの発現量は著しく低下してた。GST-πの発現量は、正常胃粘膜上皮及び分化型胃癌細胞株に比べ、低分化型胃癌細胞株TMK-1で亢進し、スキルス胃癌細胞株KATOⅢ及びHSC-39では、著しく亢進していた。

さらに、GST-πの発現量と各細胞株の生物学的性質の相関性を解析するために、各細胞株の倍加時間と軟寒天培地での増殖能を測定した。その結果、各細胞株のGST-πの発現量と増殖速度との間には、相関性は認められなかった。軟寒天培地中でのコロニー形成率は、低分化型胃癌細胞株TMK-1では56.0%、スキルス胃癌KATOⅢ及びHSC-39では、それぞれ67.8%及び100.0%であった。一方、分化型胃癌細胞株の軟寒天培地中でのコロニー形成率は数%程度であった。また、スキルス胃癌細胞株でもGST-πの発現量の低いNKPS及びNTASでは、十数%程度であった。このように、GST-πの発現量が高い細胞株ほど、より軟寒天培地中でのコロニー形成能が高いという相関性が認められた。

HSP90は、物理的あるいは化学的ストレスにより、強く誘導されることが分かっている。HSP90は、ステロイドホルモン受容体やv-srcな

どのチロシンキナーゼ癌遺伝子産物、翻訳開始因子eIF2-αをりん酸化するeIF2キナーゼなどに結合する性質がある。さらに、HSP90は細胞骨格蛋白質アクチンに結合する性質があり、HSP90高発現細胞では細胞の運動性が亢進することが、報告されている。したがって、胃癌細胞株におけるHSP90の発現亢進が、胃癌の癌化の過程や癌細胞の運動性に関与することが示唆された。

アクチン調節蛋白質の一つであるゲルゾリンは、細胞の増殖に関与するリン脂質であるPIP_2にも結合する性質があることが報告されている。したがって、ゲルゾリンは細胞骨格だけではなく、細胞内情報伝達機構にも深く関係する可能性がある。さらに、ras癌遺伝子により癌化させた細胞からの正常復帰細胞では、変異型ゲルゾリンHis-321が特異的に発現し、His-321に腫瘍抑制効果があることが、北大医学部癌研分子遺伝部門の葛巻らにより証明されている。これらのことより、ゲルゾリンの発現低下が胃癌において、癌化に伴う細胞の形態変化や癌細胞の増殖に重要な役割を果たしていることが、示唆された。現在、ゲルゾリンの胃癌細胞株における腫瘍抑制効果を解析している。

GST-πは、薬物などの解毒機構に関係した多機能酵素であり、ラットの肝化学発癌過程で発現が亢進したり、ヒトの癌においても正常組織に比べ発現が亢進していることが報告されている。したがって、GST-πの発現亢進が細胞の癌化の過程に関与することが、示唆されている。さらに、今回の我々のデータからは、GST-πの発現亢進が一部の低分化型及びスキルス胃癌細胞の特異性に、何か重要な役割を果たしていることが、示唆された。今後は、GST-πの発現亢進のメカニズム並びに、その発現亢進が低分化型胃癌及びスキルス胃癌の特異性にどのように関係しているのかを、解析していこうと考えている。

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　福　田　　博
副　査　教　授　松　本　　章
副　査　教　授　雨　宮　　璋
副　査　教　授　葛　巻　　暹

学位論文題名

Differential expression of HSP90, gelsolin and GST-π in human gastric carcinoma cell lines.

ヒト正常胃粘膜上皮および分化型、低分化型、スキルスなど種々な組織型の胃癌細胞株を用いて、正常胃粘膜上皮に比べて胃癌で異常に発現している蛋白質を検出し、それらの蛋白質について検討した。

正常胃粘膜上皮および各組織型の胃癌細胞株より蛋白質を抽出した。これらの蛋白質をO'Farrellの二次元電気泳動法に従い分離展開し、蛋白質スポットを銀染色法により検出した。その結果、分子量90キロダルトン、等電点4.9(p90-4.9)の蛋白質の発現が、正常胃粘膜上皮に比べて、胃癌細胞株で亢進していた。また、分子量92キロダルトン、等電点5.7(p92-5.7)の蛋白質の発現が胃癌細胞株で低下していた。さらに、分子量25キロダルトン、等電点5.6(p25-5.6)の蛋白質の発現が、低分化型胃癌細胞株及びスキルス胃癌細胞株で亢進していた。

これらの3種の蛋白質について、分子量および等電点より、Celis等の報告を参考にして推定し、これらの蛋白質に対する抗体を用いウエスタンブロッティングを行い、p90-4.9は90キロダ

ルトン熱ショック蛋白質(HSP90)、p92-5.7はゲルゾリン、p25-5.6はグルタチオン S-トランスフェラーゼπ(GST-π)と同定された。

さらに、これらの蛋白質の発現量を詳細に調べるとともに、増殖能、コロニー形成能などの生物学的性質との関連について、検討した。

1) HSP90の発現量は正常胃粘膜に比べ、各種胃癌細胞株で亢進していた。

2) ゲルゾリンの発現量は、スキルス胃癌細胞株HSC-39で僅かに低下し、他の胃癌細胞株では組織型に拘わらず、著しく低下していた。

3) GST-πの発現量は、正常胃粘膜上皮および分化型胃癌細胞株に比べて、低分化型胃癌細胞株で亢進し、スキルス胃癌細胞株4株中2株で著しく亢進していた。

次に、生物学的性質との関連については、

1) GST-πの発現量と胃癌細胞株の増殖能との間には相関性はなかった。

2) GST-πの発現が高い細胞株ほど、軟寒天中でのコロニー形成能が、より高いという相関性が認めれれた。

以上の結果を考察すると、

1) HSP90の発現亢進が、胃癌の癌化の過程や癌細胞の運動性に関与することが、示唆された。

2) ゲルゾリンの発現低下が、胃癌において癌化に伴う細胞の形態変化や癌細胞の増殖に重要な役割を果たしていることが、示唆された。

3) GST-πの発現亢進が、細胞の癌化の過程に関与することがす