

学位論文題名

Proteomic Signature Corresponding to Alpha Fetoprotein Expression in Liver Cancer Cells

(AFP 産生肝癌細胞株に特徴的なタンパク質プロファイルの解析)

学位論文内容の要旨

【緒言】 α -フェトプロテイン (以下 AFP) は 1956 年 Bergstrand によりヒト胎児の血清中に見いだされた分子量 67 kDa の糖タンパクで後に肝細胞癌において再生産されることが発見されて以来、肝細胞癌の腫瘍マーカーとして広く普及している。一方、こうした診断学的マーカー以外に腫瘍径、分化度、門脈侵襲の有無など肝細胞癌の悪性度とも関連することが報告されている。従って AFP が産生されることで変化が起きるタンパク質に着目することでこれらの事象を説明することができる可能性があると考えられることから、AFP 産生肝癌細胞株からタンパク質を抽出、2次元電気泳動法に展開し統計学的手法を用いて AFP と連動する特徴的なタンパク質スポットの同定を試みた。その結果、11 個のタンパク質スポットが同定でき、それらは質量分析器にて全て特定可能であった。機能別にはアポトーシス、細胞骨格、翻訳、糖代謝に関連するものに分けられ従来より悪性度との関係が示唆されているものも含まれていることが判明した。【材料および方法】(材料) ① AFP 産生肝癌細胞株 (JHH-5, HuH-1, PLC/PRL/5, Hep3B, HT-17, JHH-7, HuH-7, HepG2, Li-7, KIM-1, KYN-2) ② AFP 非産生肝癌細胞株 (HLE, JHH-6, Sk-Hep-1, JHH-4, HLE, RBE, SSP-25, KYN-3, PH5-CH, PH5-T) (方法) ① 肝癌細胞株の western blotting : 肝癌細胞株の AFP 発現を確認するため、30 μ g の抽出タンパクを AFP 抗体を用いて western blotting を施行 ② 抽出タンパクの蛍光色素ラベリング : 肝癌細胞株から抽出し 1mg/ml の濃度に調整した sample を cy5 の蛍光色素でラベリング、全 sample を mixture し 1mg/ml に濃度調整したものを cy3 の蛍光色素でラベリングした。③ 二次元電気泳動法 : 一次元目のタンパク分離として固定化 pH 勾配等電点電気泳動 (24cm pI range 3-10) を行った。それを SDS PAGE を用いて 17W 15 時間の条件で二次元に展開しタンパク分離を行った。二次元電気泳動後、スキャナで各スポットを読み取り cy5 を cy3 で補正した。④ 機械学習法と多変量解析 : 80%以上再現性のある 1334 スポットを解析対象とした。機械学習法の統計学的手法を用い、16 細胞株を AFP 産生群と非産生群に分けることのできる特徴的なタンパクスポットの同定を試みた。さらに選り出されたタンパクスポットで階層的クラスタリング、主成分分析を行った。残り 5 細胞株を使ってタンパクスポットを評価した。⑤ 質量分析によるタンパク質の同定 : 各肝癌細胞株から抽出したタンパクを 500 μ g に

調整し二次元電気泳動に展開し SYPRO Ruby で染色。スキャン後スポットランキングで選ばれたスポットを切り出しゲル内消化でペプチドに分解、MALDI-TOF-MASS 法と Swiss-Prot データベースを用いてタンパク質を同定した。【結果】①肝癌細胞株の AFP 発現：21 種類の肝癌細胞株のうち 11 種類が AFP 産生肝癌細胞株であることが判明した。②二次元電気泳動：約 2000 のタンパクスポットが得られ、cy3 イメージで 80%以上再現性のある 1334 スポットを解析対象とした。これらの中には AFP のスポットは認められなかった。③多変量解析による AFP 産生群に特徴的なタンパクスポットの同定：1334 のタンパクスポットの濃度を数値化し、機械学習法による多変量解析を行うと 100%AFP 産生群と非産生群に分けられることがわかった。また、2 群を分けることが出来る特徴的なタンパクスポットは 11 個であった。この 11 個のタンパクスポットの情報を用いて階層的クラスタリング、主成分分析を行うとやはり 2 群のグループに分けることが出来た。さらに分類の構築に用いなかった 5 細胞株は 11 個のタンパクスポットで正しく分類できた。④11 個のタンパクスポットの同定：質量分析器にて全て同定でき、機能別には糖代謝に関わるものが 4、アポトーシスに関わるものが 4、細胞骨格に関わるもの 2、翻訳に関わるもの 1 であった。【考察】AFP は診断的腫瘍マーカー以外に腫瘍径、分化度、門脈侵襲の有無など肝癌細胞癌の悪性度とも関連することが報告されている。しかしながらその機序は十分に解明されていない。今回、AFP と連動するタンパク質が 11 個であることが判明し、その中で糖代謝に関わるものが 4 個あったが 1 個を除いて AFP 産生群で発現が高かった。低分化癌では AFP が産生されているものが多いが、糖代謝が亢進しているとの報告がありこれらを反映しているものと考えられた。アポトーシス関連では AFP 産生群において高発現しているものと低発現しているものがあり、一定した傾向は見られなかった。悪性度の高い腫瘍では抗アポトーシス作用の傾向が強いとの報告が多いが、AFP を産生しているもので悪性度の低いものも存在することからアポトーシス関連タンパクの発現の差があっても矛盾しない結果と思われた。また、今回アポトーシス促進と細胞分化に関わるタンパクである Galectin 1 が AFP 産生肝癌細胞株において低発現している結果が得られた。今までに肝癌との関わりでの報告はないが、悪性度の高いものや低分化癌で AFP が産生されているものが多いことを考えると興味深い。AFP に関連するタンパクを同定出来たことで悪性度との関連を説明することが出来たばかりでなくさらにそのタンパクの機能を追究することによって新しい肝癌の biology の発見につながる可能性があると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 畠 山 鎮 次
副 査 教 授 藤 堂 省

学位論文題名

Proteomic Signature Corresponding to Alpha Fetoprotein Expression in Liver Cancer Cells

(AFP 産生肝癌細胞株に特徴的なタンパク質プロファイルの解析)

α -フェトプロテイン (以下 AFP) は 1956 年 Bergstrand によりヒト胎児の血清中に見いだされた分子量 67 kDa の糖タンパクで後に肝細胞癌において再生産されることが発見されて以来、肝細胞癌の腫瘍マーカーとして広く普及している。一方、こうした診断学的マーカー以外に腫瘍径、分化度、門脈侵襲の有無など肝細胞癌の悪性度とも関連することが報告されている。しかし、AFP と悪性度との関係は十分解明されていない。AFP と関連するタンパク質の存在について未だ報告はなく、関連タンパクを調べることで悪性度と関係する候補タンパク質を同定出来る可能性がある。

肝癌細胞株の AFP 発現を確認するため、AFP 抗体を用いて western blotting を施行。AFP 産生肝癌細胞株 (JHH-5, HuH-1, PLC/PRL/5, Hep3B, HT-17, JHH-7, HuH-7, HepG2, Li-7, KIM-1, KYN-2)、AFP 非産生肝癌細胞株 (HLE, JHH-6, Sk-Hep-1, JHH-4, HLF, RBE, SSP-25, KYN-3, PH5-CH, PH5-T) に分類できた。肝癌細胞株から抽出した sample を cy5 の蛍光色素でラベリング、全 sample を mixture したものを cy3 の蛍光色素でラベリングし、両者混合したものを二次元電気泳動に展開した。二次元電気泳動後、スキャナで各スポットを読み取り cy5 を cy3 で補正した。80% 以上再現性のある 1334 スポットを解析対象とし、機械学習法の統計学的手法を用い、16 細胞株を AFP 産生群と非産生群に分けることのできる特徴的なタンパクスポットの同定を試みた。機械学習法による多変量解析を行うと 100% AFP 産生群と非産生群に分けられることがわかった。また、2 群に分けることが出来る特徴的なタンパクスポットは 11 個であった。この 11 個のタンパクスポットの情報を用いて階層的クラスタリング、主成分分析を行うとやはり 2 群のグループに分けることが出来た。さらに分類の構築に用いなかった 5 細胞株は 11 個のタンパクスポットで正しく分類できた。これらの 11 個のタンパク質は質量分析器にて全て同定でき、機能別には糖代謝に関わるものが 4、アポトーシスに関わるものが 4、細胞骨格に関わるもの 2、翻訳に関わるもの 1 であった。タンパクレベルでの網羅的解析方法を示したばかりでなく AFP に関連するタンパクを同定出来たことでそのタンパクの機能を追究することによって新しい肝癌の biology の発見につながる可能性がある。

公開発表後、副査の畠山教授より 1) 同定したタンパク質の western blot での確認、2) 同定されたタンパクが AFP の変動で変化が起きるかについての質問があった。それに対して 1) 発現量を western では確認していないが、二次元上で確認していること。2) RNAi などの

手法を用いないと確認できない、などの回答があった。また、主査の浅香教授から 1)胎児抗原なので胎児でも同じような結果が得られるか 2) 予後に影響するのは AFP か、AFP 関連タンパクか 3) アルブミン産生との関係についての質問があった。それに対して 1) 同じような結果が得られる可能性 2) この実験系からは判断不能 3) アルブミンのスポット発現量との比較検討必要、との回答があった。藤堂教授からは 1)複数の AFP 抗体での確認の有無、2)AFPmRNA 陰性症例の存在の理由、ついでに質問があった。それに対して、1) 単一の AFP 抗体のみ使用 2) 転写因子、並びにプロモーター領域の変異により発現しなくなった可能性、との回答がなされた。

この論文は AFP 産生肝癌細胞株と非産生細胞株とを分ける特徴的なタンパク質が存在することを二次元電気泳動法で初めて示した論文であり、この方法論で臨床検体への応用も期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。