

学 位 論 文 題 名

Protein clusters associated with carcinogenesis,
histological differentiation and
nodal metastasis in esophageal cancer

(食道がんのがん化、組織学的分化度および
リンパ節転移に関するタンパク質群の同定)

学位論文内容の要旨

【背景】食道扁平上皮がんは内視鏡の普及による診断技術の発達および放射線化学療法や再建を含めた外科技術の進化にも関わらず、消化管がんの中で最も予後が悪い。そのためより臨床に即した腫瘍マーカーや革新的な治療のターゲットが求められている。それには食道がんのがん化や浸潤、転移のメカニズムにおける分子生物学的背景のより一層の解明が必要である。本研究では従来に無い多数の食道がんの臨床検体から扁平上皮がん組織、正常扁平上皮組織のみを用いて、プロテオーム解析技術によりそのタンパク質の変動を網羅的・定量的に調べた。こうして得られた多量のデータをバイオインフォマティクスアプローチによって解析し、食道がんのがん化や分化度、リンパ節転移に関連したタンパク質群を解明した。

【症例と方法】他がんを含む術前治療を受けておらず、術後 5 年間の経過追跡が可能であった 72 症例の初回手術摘出標本を対象とした。72 症例すべてのがん組織および対となる 57 症例の正常重層扁平上皮組織をレーザーマイクロダイセクション法により採取し、タンパク質を抽出した。新たに分子量方向に拡大し、40cm×20cm と大型化したゲルを用いて、蛍光二次元電気泳動法によるタンパク質分離を行った。すべての標本から得られたタンパク質を混ぜたものを内部標準として Cy3 蛍光色素で標識し、それぞれのサンプルを Cy5 の蛍光色素で標識した。内部標準はゲル一枚あたりタンパク質として 5ug を、それぞれのサンプルはゲル一枚当たり 1mm² の組織切片を使用した。全てのサンプルにつき電気泳動は 2 回行っている。泳動後、それぞれの蛍光色素に合わせた波長でゲルの画像を取り込んだ。組織型や分化度およびリンパ節転移等の臨床情報に関連して統計学上有意に発現および翻訳後修飾が変化する二次元電気泳動のゲル上のスポット群を層別化した。質量分析を用いて、絞り込まれたスポットのタンパク質の同定を行った。各群に代表的なタンパク質については、その発現をウエスタンブロッティング法によって確認した。

【結果】2枚のゲル上でともに発現解析が可能な 1672 スポット中 98%でその発現比が 2 倍以内に含まれ、その相関係数も 0.9406 と高くこの実験系の再現性が確認された。

80%のサンプルで発現の確認された 1730 スポットによる教師なし階層的クラスター分類

では正常組織、がん組織の 2 群に完全に分類され、またがんは分化度に応じた分類がされた。分化度と組織型に応じて有意に ($p < 0.01$) 2 倍以上変化するスポットが 498 スポット認められた。自己組織化写像法により先の 498 スポットを 2 群 (A, B) に分類した。A 群は正常に比べがん組織に強く発現を示すスポットが選ばれ、その数は 221 スポットであった。B 群は正常に比べがん組織で発現が低下するスポット群であり、277 スポットが含まれた。A、B それぞれをさらに自己組織化写像法を用い分類した。A 群からは C、D 群に B 群からは E、F 群に分類された。C 群には高分化と正常で発現差があるものの、分化度が低下するに従い正常との差が少なくなる 72 スポットが分類された。D 群には分化度間で差が少なく、わずかに低分化になるに従い増加する 149 スポットが分類された。E 群にはがん組織で分化度に関わらず低下する 167 スポットが、F 群には正常と高分化ではあまり変わらないものの低分化になるに従い減少する 110 スポットが分類された。これらの 498 スポットは全て質量分析により計 217 種類のタンパク質を同定した。

リンパ節転移数は食道がんの予後に最も関与する因子である。今回の 72 症例においてもリンパ節転移数と 5 年生存率との関連を認め、特に転移数が 5 個以上で有意 ($p < 0.01$) であった。リンパ節転移の無い 17 例と転移数 5 個以上の 15 例との比較で有意差 ($p < 0.01$) のある 41 スポットを同定した。転移数の異なる他検体を加え、41 スポットによる自己組織化写像法による解析を行い、転移数に応じた段階的な変化を認めた。転移に関連した 41 スポットから、33 種類のタンパク質を同定した。またウエスタンブロッティング法による発現変化が二次元電気泳動上のものと同様であることを確認した。またリンパ節転移数につれて増加するタンパク質として同定された Heat shock protein 60 についてもウエスタンブロッティング法にて転移数に応じた段階的な発現の変化を確認した。

A 群、B 群に含まれるタンパク質をその機能によって分類した。両群とももっとも多いのは細胞骨格に関わるタンパク質であったが、それ以降では各群で機能的な分類での差異の大きいタンパク質の数は大きく異なっていた。

【考察】タンパク質回収にレーザーマイクロダイセクション法を用いることで組織ごとの構成するタンパク質の特徴をより鮮明にすることが出来た。またプロテオーム解析の改良によって網羅性を高め、より多種のタンパク質を定量的に解析することを可能にした。得られた膨大なデータはバイオインフォマティクスアプローチにより系統的に分類した。最新の質量分析技術により正常食道粘膜、分化度の異なる癌組織それぞれに特徴的な 217 種類以上のタンパク質を明らかにし、更には食道癌の予後に最もかかわるリンパ節転移に関連する 33 種類のタンパク質を同定することができた。この同定したタンパク質群にはこれまでも癌化や増殖に関連すると報告されてきた分子の他、CYFRA や SCC 抗原等の実際に臨床応用されているタンパク質も含まれていた。従来報告の無かった新たな分子も多数同定され、これまでに報告のない遺伝子配列からの想定上のタンパク質の関連も明らかになった。今後の臨床応用に当たって、これらのタンパク質は腫瘍マーカーとして期待されるだけではない。タンパク質の相互作用の解明が進み、各分子の機能が明確化されていくことで新たな分子標的治療のターゲットとなる可能性を持っている。豊富な臨床情報をもつ 129 ものサンプルによるプロテオーム解析技術から得られたこの研究結果は、がん化や転移機構の解明への礎となるだけでなく、診断・治療におけるブレイクスルーとなることが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 畠 山 鎮 次
副 査 教 授 福 田 諭
副 査 教 授 近 藤 哲

学位論文題名

Protein clusters associated with carcinogenesis, histological differentiation and nodal metastasis in esophageal cancer

(食道がんのがん化、組織学的分化度および
リンパ節転移に関するタンパク質群の同定)

食道扁平上皮癌は消化管癌の中で最も予後が悪いため、臨床に即した腫瘍マーカーや革新的な治療のターゲットが求められている。それには食道癌の癌化や浸潤、転移のメカニズムにおける分子生物学的背景のよる一層の解明が必要となる。本研究では従来にない多数の食道癌の臨床検体から、プロテオーム解析技術によりそのタンパク質の変動を網羅的・定量的に調べられている。得られた多量のデータはバイオインフォマティクスアプローチによって解析され、食道癌の癌化や分化度、リンパ節転移に関連したタンパク質群が同定された。

食道癌 72 症例の初回手術摘出標本を対象とされ、すべての癌組織および対となる 57 症例の正常重層扁平上皮組織がレーザーマイクロダイセクション法により採取され、そこに含まれるタンパク質が抽出された。新たに分子量方向に拡大した大型化したゲル (40cm×20cm) を用いて、蛍光二次元電気泳動法によるタンパク質分離を行った。すべての標本から得られたタンパク質を混ぜたものを内部標準として Cy3 蛍光色素で標識し、それぞれのサンプルを Cy5 の蛍光色素で標識した。泳動後、それぞれの蛍光色素に合わせた波長でゲルの画像を取り込んだ。組織型や分化度およびリンパ節転移等の臨床情報に関連して統計学上有意に発現および翻訳後修飾が変化する二次元電気泳動のゲル上のスポット群を屈別化した。その後、質量分析を用いて、絞り込まれたスポットのタンパク質の同定を行った。各群に代表的なタンパク質については、その発現をウエスタンブロッティング法によって確認した。

全スポットによる階層的クラスター分類では正常組織と癌組織の 2 群に完全に分類され、また癌は分化度に応じた分類がなされた。そこにおいて、分化度と組織型に応じて有意に変化する 498 スポットを認められた。自己組織化写像法により先の 498 スポットを 4 群 (C, D, E, F) に分類した。C 群には高分化と正常で発現差があるものの、分化度が低下するに

従い正常との差が少なくなる 72 スポットが分類された。D 群には分化度間で差が少なく、わずかに低分化になるに従い増加する 149 スポットが分類された。E 群には癌組織で分化度に関わらず低下する 167 スポットが、F 群には正常と高分化ではあまり変わらないものの低分化になるに従い減少する 110 スポットが分類された。これらの全 498 スポットから質量分析により計 217 種類のタンパク質を同定した。

リンパ節転移数は食道癌の予後に最も関与する因子である。今回の 72 症例においてもリンパ節転移数と 5 年生存率との有意な関連を認めた。リンパ節転移のない 17 例と転移数 5 個以上の 15 例との比較で有意差 ($p < 0.01$) のある 41 スポットを同定した。転移数の異なる他検体を加え、41 スポットによる自己組織化写像法による解析を行い、転移数に応じた段階的な変化が確認された。そして転移に関連した 41 スポットから、33 種類のタンパク質を同定された。またウエスタンブロッティング法による発現変化が二次元電気泳動の結果と同様であることが確認された。

以上の結果より、癌化や分化に関わるタンパク質群を明らかにし、さらには食道癌の予後に最も影響するリンパ節転移と相関関係を有するタンパク質群が同定された。また、従来報告のない遺伝子配列から想定されるタンパク質との関連も明らかになった。多くの臨床情報を有する 129 サンプルによるプロテオーム解析技術から得られたこの研究結果は、癌化や転移機構の解明への礎となるだけでなく、診断・治療におけるブレイクスルーとなることが期待される。

以上の発表後、副査の近藤教授からトランスクリプトームと比較したプロテオーム解析の利点と欠点、マイクロダイセクションの実際の手技、今後の臨床応用への発展について質問があった。続いて副査の福田教授から本研究結果の頭頸部癌分野への応用について質問があった。また、主査の畠山教授からはタンパク抽出における標本作製の工夫点、二次元電気泳動法の問題点、iTRAQ 法、ICAT 法との比較についての質問があった。申請者は、これらの質問に対し、自己の研究結果と文献的知識に基づき、タンパク質サンプル回収におけるマイクロダイセクションの実際と染色法の工夫、プロテオーム解析の特にタンパク質分離技術における各方法の再現性と定量性、頭頸部分野では食道癌と臨床的類似性のある下咽頭癌への応用の可能性、放射線化学療法への臨床応用の可能性を回答した。

この論文は、従来にない大規模なプロテオーム解析により、食道癌の分化や癌化、さらにはリンパ節転移、予後に関連するタンパク質群を明らかにし、腫瘍マーカーや分子標的治療等の臨床応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（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。