

学 位 論 文 題 名

Plasma proteomics of pancreatic cancer patients by
multi-dimensional liquid chromatography and
two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) :
Up-regulation of leucine-rich alpha-2-glycoprotein
in pancreatic cancer

(多次元液体クロマトグラフィーと蛍光標識ディファレンス二次元電気
泳動法による膵がんの血漿プロテオミクス:膵がん血漿中の
leucine-rich alpha-2-glycoprotein の発現増加)

学位論文内容の要旨

【背景】膵がんは日本におけるがん死の第5位を占めており、年間2万人以上の膵がん患者が死亡している。現在の診断技術でも、診断時に約7割の症例が局所進行例または遠隔転移を有する症例である。膵がん患者全体の5年生存率が4%なのに対し、切除可能であった膵がん症例の5年生存率は13%であり、切除可能な早期の段階で膵がんを診断することが患者の予後改善につながると考えられる。本研究では、多次元液体クロマトグラフィーと蛍光色素標識ディファレンス二次元電気泳動法(2D-DIGE法)を組み合わせた解析法を用い、膵がん患者血漿において発現量が変化している腫瘍マーカーを検索した。

【症例と方法】5人の膵がん患者と5人の健常ボランティアの血漿で解析を行った。各症例の血漿はマルチアフィニティーカラムを用いて高容量タンパク質(albumin, transferrin, haptoglobin, alpha-1-antitrypsin, IgA, IgG)を取り除いた後、陰イオン交換カラムを使用し、NaCl濃度で0 mM、150 mM、200 mM、250 mM、1 Mの5段階で抽出し分画した。各分画において、解析した10症例すべての検体を混合した内部標準を作成し、これをCy3で蛍光標識した。同様に各分画において、がん患者、健常ボランティアの群ごとにすべての症例の検体を混合した解析サンプルを作成しこれらをCy5で蛍光標識した。各分画ごとに5 μgの内部標準と等量の解析サンプルを混合し、2D-DIGE法によりタンパク質分離、発現解析を行った。未分画血漿も同様に解析を行った。未分画血漿においては、10症例すべての検体を混合しCy3で標識した内部標準15 μgとCy5で標識した各症例のサンプル15 μgを混合して2D-DIGE法により解析を行った。群間で比較して統計学的に有意に発現量の異なるスポットに関して質量分析を用いてタンパク質を同定した。特に特徴的なタンパク質に関しては、同施設から提供された検証サンプル(膵がん5症例、健常ボランティア5症例)を追加して未分画血漿によるウエスタンブロッティング法にて確認した。また、他施設から提供された検体17症例(膵がん8例、慢性膵炎4例、健常ボランティア5例)についても未分画血漿を用いたウエスタンブロッティング法にて発現量を検証した。

【結果】未分画血漿の二次元電気泳動ゲル上のタンパク質スポットは290スポット観察さ

れた。一方、分画された血漿では、0 mM NaCl のゲルで 102 スポット、150mM NaCl のゲルで 187 スポット、200mM NaCl のゲルで 240 スポット、250mM NaCl のゲルで 336 スポット、1M NaCl のゲルで 335 スポット観察された。分画後のスポット数の合計は 1200 スポットあり、分画することで観察可能なタンパク質スポットを増加することができた。

健常ボランティア群の血漿と比較して膵がん患者群の血漿で発現の変動が見られるタンパク質スポットを検索した。2 群間で発現量が 2 倍以上の変動を示し、かつ Student's t-test で $p < 0.01$ となる統計学的に有意なスポットに絞り込むと、33 スポットが選択された。この基準を適応した場合、未分画血漿において有意なスポットは観察されなかった。33 スポット中、膵がん患者群で発現量が増加していたのは 27 スポットあり、発現量が低下していたのは 6 スポットであった。これらのスポットを質量分析にて同定し、33 スポットから 10 種類のタンパク質が同定された。10 種類のタンパク質のうち、8 つのタンパク質が合計 31 スポットから構成されており、翻訳後修飾によるものと考えられた。

同定されたタンパク質のうち、leucine-rich alpha-2-glycoprotein (LRG) は 5 スポットで観察され、すべてのスポットが膵がん患者群において 2 倍以上の発現量の増加を示した。LRG に対する特異抗体を用いて未分画血漿によるウェスタンブロッティング法を行い、LRG の発現量の変化を各血漿サンプルで検証した。二次元電気泳動の解析に用いた 10 検体では、ボランティア血漿と比較して、膵がん患者血漿における LRG 発現の増加が認められた。また同施設から提供された検証サンプル 10 症例に関しても、膵がん患者における LRG 発現の増加が認められた。他施設から提供された検証サンプル 17 症例についても同様にウェスタンブロッティング法を行った。慢性膵炎患者における LRG の発現量は、膵がん患者に比べ低下している傾向がみられた。

【考察】Leucine-rich alpha-2-glycoprotein は leucine を質量の 17% の割合で含有するタンパク質として特徴付けられている。これまで顆粒球の分化や TGF- β 1 pathway に関連があるという報告がある。しかし生体内での生物学的な役割、また産生部位は明らかとなっていない。血漿プロテオミクス研究において、悪性疾患やウイルス感染症といった疾患に罹患した場合、LRG の生体内での発現量が変動するのが観察されており、疾患に対する生体内反応により LRG の産生が増加すると考えられる。

本研究において膵がん患者の血漿中で LRG の産生が亢進されているのが認められた。過去の膵がん血漿に関するプロテオミクス研究において LRG に関する報告はない。LRG に対する特異抗体を使用したウェスタンブロッティング実験では CA19-9 が陰性の膵がん患者においても、LRG の発現量増加が認められた。膵がん患者で発現量が増加していない症例や、慢性膵炎患者で LRG が増加している症例も認められることから、LRG を他の腫瘍マーカーと組み合わせることにより診断の感度、特異度を向上させることができると考えられる。また、さらに多くの症例数を用いて、LRG の発現量の変動を検証する必要がある。

最後に、本研究では、多次元液体クロマトグラフィーと 2D-DIGE 法を組み合わせた解析法を用い、膵がん患者の血漿タンパク質と健常ボランティアの血漿タンパク質を比較し、膵がん患者において発現量が変化している腫瘍マーカーを検索した。本研究で用いた解析法の血漿プロテオミクスにおける有用性を確認し、膵がん患者において LRG を測定することの臨床的意義が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 福 田 諭
副 査 教 授 藤 堂 省

学位論文題名

Plasma proteomics of pancreatic cancer patients by
multi-dimensional liquid chromatography and
two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) :
Up-regulation of leucine-rich alpha-2-glycoprotein
in pancreatic cancer

(多次元液体クロマトグラフィーと蛍光標識ディファレンス二次元電気
泳動法による膵がんの血漿プロテオミクス:膵がん血漿中の
leucine-rich alpha-2-glycoprotein の発現増加)

膵がんは予後不良な疾患であり、切除可能な早期の段階で膵がんを診断することが患者の予後改善につながると考えられる。本研究では、多次元液体クロマトグラフィーと蛍光色素標識ディファレンス二次元電気泳動法 (2D-DIGE 法) を組み合わせた解析法を用い、膵がん患者血漿において発現量が増加している腫瘍マーカーを検索した。

5 人の膵がん患者と 5 人の健常ボランティアの血漿で解析を行った。各症例の血漿はマルチアフィニティーカラムを用いて高容量タンパク質 (albumin, transferrin, haptoglobin, alpha-1-antitrypsin, IgA, IgG) を取り除いた後、陰イオン交換カラムを使用し、NaCl 濃度で 0 mM、150 mM、200 mM、250 mM、1 M の 5 段階で抽出し分画した。各分画において、解析した 10 症例すべての検体を混合した内部標準を作成し、これを Cy3 で蛍光標識した。同様に各分画において、がん患者、健常ボランティアの群ごとにすべての症例の検体を混合した解析サンプルを作成しこれらを Cy5 で蛍光標識した。各分画ごとに 5 μ g の内部標準と等量の解析サンプルを混合し、2D-DIGE 法によりタンパク質分離、発現解析を行った。群間で比較して統計学的に有意に発現量の異なるスポットに関して質量分析を用いてタンパク質を同定した。特に特徴的なタンパク質に関しては、同施設から提供された検証サンプル (膵がん 5 症例、健常ボランティア 5 症例) を追加して未分画血漿による western blotting 法にて確認した。また、他施設から提供された検体 17 症例 (膵がん 8 例、慢性膵炎 4 例、健常ボランティア 5 例) についても未分画血漿を用いた western blotting 法にて発現量を検証した。

未分画血漿の二次元電気泳動ゲル上のタンパク質スポットは 290 スポット観察された。一方、5 分画

後のスポット数の合計は 1200 スポットあり、分画することで観察可能なタンパク質スポットを増加することができた。

健常ボランティア群の血漿と比較して膵がん患者群の血漿で発現の変動が見られるタンパク質スポットを検索した。2 群間で発現量が 2 倍以上の変動を示し、かつ Student's t-test で $p < 0.01$ となる統計学的に有意なスポットに絞り込むと、33 スポットが選択された。33 スポット中、膵がん患者群で発現量が増加していたのは 27 スポットあり、発現量が低下していたのは 6 スポットであった。これらのスポットを質量分析にて同定し、33 スポットから 10 種類のタンパク質が同定された。

同定されたタンパク質のうち、leucine-rich alpha-2-glycoprotein (LRG) は 5 スポットで観察され、すべてのスポットが膵がん患者群において 2 倍以上の発現量の増加を示した。未分画血漿による western blotting 法を行い、LRG の発現量の変化を各血漿サンプルで検証した。二次元電気泳動の解析に用いた 10 検体では、ボランティア血漿と比較して、膵がん患者血漿における LRG 発現の増加が認められた。また同施設から提供された検証サンプル 10 症例に関しても、膵がん患者における LRG 発現の増加が認められた。他施設から提供された検証サンプル 17 症例についても同様に western blotting 法を行った。慢性膵炎患者における LRG の発現量は、膵がん患者に比べ低下している傾向がみられた。

本研究において膵がん患者の血漿中で LRG の産生が亢進されているのが認められた。過去の膵がん血漿に関するプロテオミクス研究において LRG に関する報告はない。膵がん患者で発現量が増加していない症例や、慢性膵炎患者で LRG が増加している症例も認められることから、LRG を他の腫瘍マーカーと組み合わせることにより診断の感度、特異度を向上させることができると考えられる。また、さらに多くの症例数を用いて、LRG の発現量の変動を検証する必要がある。

以上の内容の発表後、副査の福田教授から 1) LRG と炎症の関係について、2) 膵がんの stage や volume と LRG の関係について、3) LRG の isoform について、4) 血清ではなく血漿を使用した理由についての質問があった。続いて主査の浅香教授から 5) 膵がんをプロテオミクスの研究対象とした理由について質問があった。また、副査の藤堂教授からは、6) 施設間で LRG の western blotting の結果にばらつきがあることについて、7) プロテオミクスの展望について質問があった。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返答した。福田教授の質問に対しては 1) 急性期炎症タンパク質と LRG の乖離した実験結果、2) LRG の発生部位は膵がんではなく stage や volume とのはっきりした相関がないこと、3) isoform の違いによる膵がん診断能力向上の可能性、4) 血清に処理することによるタンパク質の喪失の可能性を述べ、浅香教授の質問に対しては 5) 臨床における膵がん腫瘍マーカーの重要性について返答した。また藤堂教授の質問には、6) 施設間の違いは検体の保存方法による可能性、7) プロテオミクスの展望については、タンパク質のパターン分析で終わらず、いかに臨床に応用するかを考えて常に実験を行うことの重要性について返答した。

この論文は、多次元液体クロマトグラフィーと 2D-DIGE 法を組み合わせた解析法の血漿プロテオミクスにおける有用性を確認し、また膵がん患者において LRG を測定することの臨床的意義が示唆されたことで高く評価され、今後、LRG が膵がんの腫瘍マーカーとして臨床応用されることが期待される。

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。