

学位論文題名

Proteomic profiling reveals the prognostic value of  
Adenomatous Polyposis Coli-End-Binding Protein 1 in  
hepatocellular carcinoma

(肝細胞癌のプロテオーム解析による  
予後因子 APC-binding protein EB1の解明)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】肝細胞癌は世界における癌死の第3位を占め、予後不良な癌として知られている。予後不良の主要な要因として術後の高い再発率があげられ、再発予測のためのバイオマーカーはより適切な治療戦略を立てる上で重要である。肝細胞癌の分化度は予後に関係する主要な臨床病理学的な指標であり、その分子学的背景は重要な予後因子を含むと推察される。肝細胞癌の分子学的な予後因子に関する網羅的解析については、ゲノム、トランスクリプトームの分野では少数の報告が見られるが、プロテオームの分野での報告は極めて少なく、なかでも分化度と関連づけたプロテオーム解析は皆無である。本研究では肝細胞癌の分化度の背景にあるタンパクを網羅的に解析し、その中で予後に関係するタンパクを同定することを目的とした。

【材料と方法】プロテオーム解析には患者同意を得た外科切除検体45例(正常肝7例、肝細胞癌症例の背景肝11例、高分化肝細胞癌6例、中分化肝細胞癌14例、低分化肝細胞癌7例)を使用した。それぞれの検体を薄切した後、レーザーマイクロダイセクションを使用して肝細胞、癌細胞を1検体につき厚さ10 $\mu$ m、面積1mm<sup>2</sup>の量で回収した。解析したすべての検体を混合した内部標準をCy3で蛍光標識し、各検体はCy5で蛍光標識した。蛍光二次元電気泳動法(2D-DIGE法)を用いてタンパク分離を行った。レーザースキャナーでタンパク発現の情報を回収し、画像解析ソフトウェア(DeCyder)を使用してCy5情報をCy3情報で補正した。バイオインフォマティクスの手法を用いて、タンパク発現情報をもとに階層的クラスタリング解析、主成分分析を行った。さらに統計解析によって分化度に相関するタンパクスポットの同定を行った。タンパク同定のために、ゲル中のタンパクをトリプシン処理することでペプチド化して抽出し、質量分析装置を用いて分化度に相関するタンパクを同定した。同定したタンパクの検証にウェスタンブロットティング法を使用した。同定したタンパクの機能的な相関関係をみるために、文献データマイニング用のMetaCore softwareを使用した。また同定したタンパクのうちAPC-binding protein EB1(EB1)の肝細胞癌における発現と臨床病理学的因子、予後との関係を検討するため、プロテオーム解析に使用した

症例とは独立した肝細胞癌切除症例 145 例を用いて免疫組織学的染色を行った。

【結果】2D-DIGE 法の結果、内部標準で 80%以上再現性の見られるタンパクスポットは 3319 存在し、以降これらを解析対象とした。3319 スポットを用いた階層的クラスタリング解析と主成分分析の結果、正常肝、背景肝、高分化肝細胞癌、中分化肝細胞癌、低分化肝細胞癌のタンパク発現はそれぞれの組織学的所見、分化度を反映する傾向にあった。3319 スポットの中から Kruskal-Wallis test を用いて ( $p < 0.01$ 、各群間の発現差の最大値が 3 倍以上) 各群間に統計学的に有意差を持つタンパクスポットを求めた結果、41 のタンパクスポットが同定され、これらを分化度に相関するタンパクスポットとみなした。質量分析装置を用いたタンパク同定の結果、41 のタンパクスポットは 26 のタンパクを含むことが確認された。同定されたタンパクの機能分類の結果、発癌と脱分化の過程で増加するタンパクは細胞増殖、ヒートショックプロテイン、細胞骨格に関するものが多く、減少するタンパクはアミノ酸代謝、酸化還元、脂質代謝に関するものが多かった。同定されたタンパクのうち、EB1、Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)、Heat shock protein 90、Arginase-1 に対する抗体を用いてウェスタンブロットティングを行ったところ、ウェスタンブロットティングの結果は 2D-DIGE 法の結果と同様の傾向であった。また MetaCore software を用いた解析の結果、26 のタンパクのうち 14 は c-myc、AP-1、HIF1A、HNF4-alpha、Ras superfamily(RhoA、CDC42、Rac1)と機能的にリンクしていた。同定したタンパクのうち EB1 は予後不良とされている低分化肝細胞癌に多く発現し、また肝細胞癌の悪性度と関係するといわれている c-myc、RhoA、CDC42 の下流で機能していた。肝細胞癌 145 例の EB1 の免疫染色の結果、EB1 の発現は肝細胞癌の分化度と有意に相関し( $p < 0.001$ )、その他には AFP 値、TNM stage、腫瘍径、門脈浸潤の有無、肝内転移の有無と有意に相関した。また EB1 陽性症例は陰性症例に比べ再発、生存ともに有意に予後不良であり( $p < 0.0001$ )、臨床病理学的因子を含めた多変量解析の結果でも独立した予後因子であった。

【考察】プロテオーム解析の結果、肝細胞癌のプロテオーム像はその組織学的所見を主に反映しており、また発癌、脱分化の過程で増加するタンパクと減少するタンパクの機能には明らかな違いが見られ、タンパク発現はランダムな現象ではなく、ある一定の傾向があることが判明した。またこれらのタンパクは c-myc、AP-1、Ras superfamily など肝細胞癌との関連が報告されている分子の下流で機能し、肝細胞癌の分化度の分子学的背景をある程度俯瞰することができた。同定したタンパクのうち EB1 は肝細胞癌の悪性度と関係するといわれている分子の下流で機能しており、本研究でも EB1 陽性症例は低分化肝細胞癌に多く予後不良であることから、EB1 は肝細胞癌の悪性度と深くかかわっていると考えられる。EB1 は Adenomatous Polyposis Coli (APC) に結合するタンパクとして知られており、EB1 は APC と結合することで細胞遊走能の促進や細胞接着能の低下を起こすとの報告がある。また食道癌においては、EB1 の過剰発現が Wnt 経路を活性化することで細胞増殖を促進するとの報告がある。これらのことから EB1 と APC は細胞の骨格制御、遊走能、増殖に対して重要な働きを持ち、その異常な制御が肝細胞癌の悪性度に関係し、予後と相関している可能性がある。また今回同定されたタンパクの中には Hepatoma-derived growth factor、PCNA、Vimentin など肝細胞癌の悪性度、予後と関係するとされる既知のタンパクも含ま

れていた。一般に低分化肝細胞癌は予後不良であるが、その背景にはこれらのタンパクや EB1 が関わっている可能性がある。

【結論】肝細胞癌のプロテオーム解析を行い、分化度の背景にあるタンパク発現情報を同定した。その中でも EB1 は分化度だけではなく予後にも強い相関を示し、肝細胞癌術後の再発、生存の指標になりうる。

# 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

## Proteomic profiling reveals the prognostic value of Adenomatous Polyposis Coli-End-Binding Protein 1 in hepatocellular carcinoma

(肝細胞癌のプロテオーム解析による  
予後因子 APC-binding protein EB1の解明)

肝細胞癌の分子学的な予後因子に関する網羅的解析については、ゲノム、トランスクリプトームの分野では少数の報告が見られるが、プロテオームの分野での報告は極めて少なく、なかでも分化度と関連づけたプロテオーム解析は皆無である。本研究では肝細胞癌の分化度の背景にあるタンパクを網羅的に解析し、その中で予後に関係するタンパクを同定することを目的とした。患者同意を得た外科切除検体 45 例（正常肝 7 例、肝細胞癌症例の背景肝 11 例、高分化肝細胞癌 6 例、中分化肝細胞癌 14 例、低分化肝細胞癌 7 例）を使用し、レーザーマイクロダイセクションと蛍光二次元電気泳動法を用いてプロテオーム解析を行った。バイオインフォマティクス的手法を用いて、タンパク発現情報をもとに階層的クラスタリング解析、主成分分析を行ったところ、正常肝、背景肝、肝細胞癌のタンパク発現はそれぞれの組織学的所見、分化度を反映する傾向にあった。質量分析器を用いて分化度に相関する 26 のタンパクを同定した。同定したタンパクの検証にウェスタンブロットティング法を使用し、同定したタンパクの組織内発現は蛍光二次元電気泳動法の結果とよく相関した。また同定した 26 のタンパクのうち、14 は c-myc、AP-1、HIF1A、HNF4-alpha、Ras superfamily(RhoA、CDC42、Rac1)と機能的にリンクしていた。同定したタンパクのうち APC-binding protein EB1(EB1)は予後不良とされている低分化肝細胞癌に多く発現し、また肝細胞癌の悪性度と関係するといわれている c-myc、RhoA、CDC42 の下流で機能していた。プロテオーム解析とは独立した肝細胞癌 145 例の EB1 の免疫染色の結果、EB1 の発現は肝細胞癌の分化度

と有意に相関し( $p < 0.001$ )、その他には AFP 値、TNM stage、腫瘍径、門脈浸潤の有無、肝内転移の有無と有意に相関した。EB1 陽性症例は陰性症例に比べ再発、生存ともに有意に予後不良であり( $p < 0.0001$ )、臨床病理学的因子を含めた多変量解析の結果でも独立した予後因子であった。

公開發表後、まず副査の福田教授より①各サンプルを泳動した回数、②26 のタンパクのうち EB1 を選んだ理由、③正常肝での EB1 の陽性陰性の有無、④EB1 と無再発生存率との関係、⑤EB1 の血清診断の可能性について、の質問があった。①に対し、各サンプルを 3 回泳動しその平均をとって解析したと回答した。②に対し、EB1 はプロテオーム解析、Western blot 共に低分化肝細胞癌で発現増強がみられ、肝細胞癌の悪性度と関係する分子の下流で機能しているため、EB1 も肝細胞癌の悪性度と関係している可能性が高いと考え、また抗体が入手できるものが EB1 を含め限られていたためと回答した。③に対しては、免疫染色のタイトレーションの設定の仕方により変化するが、本研究では全例陰性であったと回答した。④に対しては、再発だけでなく無再発生存率も EB1 陽性症例は有意に予後不良であったとの回答があった。⑤に対しては、EB1 は骨格制御に関わるタンパクなので血清に分泌されている可能性は非常に低いと回答した。次に主査の浅香教授より、①EB1 はその機能発現に APC との結合が必須であるのか、②EB1 は浸潤のマーカーとかがえてよいのか、③予後マーカーとして AFP を越える可能性について、④これからの研究の方向性について、の質問があった。①に対し、過去の文献的な報告から EB1 の機能発現には APC との結合が重要と考えられるが、他の報告からは必ずしもそれだけではないと思われると回答した。②に対し、EB1 は各臨床病理学的因子との関連の解析により浸潤のマーカーと考えられると回答した。③に対し、血清診断という面では EB1 は AFP に劣るが、組織内発現では AFP を越える可能性があると回答した。④に対しては、EB1 の肝細胞癌の肝移植後の再発に及ぼす影響や、RFA 後の再発に及ぼす影響を考慮中であると回答した。最後に副査の藤堂教授より、c-myc や AP-1 などはプロテオーム解析で同定されたかとの質問があり、プロテオーム解析では同定されず、ネットワーク解析で同定されたと回答した。また最後に藤堂教授より網羅的解析だけでなく、一つの分子をより深く調べる方法論も重要であるとのコメントがあった。

いずれの質問に対しても、申請者は概ね妥当に回答した。肝細胞癌の新しいバイオマーカーである EB1 の可能性を示し、将来的な臨床応用への課題を含め、重要な知見を示した。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単位取得なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受け取るのに十分な資格を有するものと判定した。