

学位論文題名

Differential LC-MS-Based Proteomics of
Surgical Human Cholangiocarcinoma Tissues

(ヒト胆管癌手術組織を用いた液体クロマトグラフィー質量分析による
プロテオーム発現変動解析)

学位論文内容の要旨

【背景】胆管癌は難治性癌の一つであり唯一の根治療は手術による完全切除である。しかしながら、根治術の適応となる患者は限られており、術後5年生存率も約30%と非常に低い。胆管癌は、胆管上皮を由来とし生物学的に局所浸潤能が高く、早期発見が困難であること、解剖学的に胆管壁が薄く、血管も隣接することなどが、その理由として挙げられる。後者に関しては、拡大肝切除や血管合併切除などの手術手技の向上により、予後の改善傾向が認められるものの、前者に関しては、生物学的特性の解明に至っていないことから、早期診断や予後診断などに関連する胆管癌マーカーの開発が期待されている。近年、疾患バイオマーカーの探索研究分野において、プロテオーム解析(タンパク質の網羅的解析)手法が注目されている。このプロテオーム解析手法による、血清や組織などの臨床検体を用いたマーカー探索はすでに、130以上の消化器癌に関する報告があるが、胆管癌に関する報告はほんの数例のみである。そこで本研究では、ヒト胆管癌の手術組織検体を用いたプロテオーム解析を施行し、胆管癌バイオマーカーとしての候補タンパク質の同定、検証を試みた。

【症例と方法】6人の胆管癌患者から病変部を切除直後、癌組織および正常胆管組織をそれぞれ採取し、血液および胆汁を洗浄除去してから凍結保存し試料とした。2症例をプロテオーム解析の対象とし、4症例を検証実験に用いた。タンパク質はホモゲナイズおよび超音波破碎により抽出した。プロテオーム解析の試料はSDS-PAGEによりタンパク質組成の均一性を確認する一方、トリプシンにより完全消化した。得られた消化試料は液体クロマトグラフィー質量分析計(LC-MS)に供し、含有タンパク質の一斉同定解析とともに癌組織と正常胆管組織の試料間における発現変動解析を行った。発現変動解析にはセミ定量スペクトルカウント法と、安定同位体標識したタンパク質を内部標準として用いる定量法を適用した。胆管癌での発現亢進が示唆されたタンパク質のうち、他の癌種で発現亢進が報告されているが、胆管癌との関連は明らかにされていない4種について、ウエスタンブロットリングを行い、タンパク質発現状況を確認した。また、プロテオーム解析結果およびウエスタンブロットリングでのタンパク質発現状況と組織切片における発現状況を比較検討するため、免疫組織化学染色を用い検証、確認を行った。

【結果】癌組織と正常胆管組織のプロテオーム発現比較解析の結果、高い同定信頼度で482種類のタンパク質を同定した。さらにセミ定量比較において、胆管癌で発現亢進が有意と判断されたタンパク質、38種類を見出した。この発現亢進傾向は内部標準を用いた定量法においても確認された。この38種類のタンパク質の中には、すでに胆管癌で発現亢進が報

告されているタンパク質も含まれており、結果の妥当性が示された。

本研究ではさらに、発現亢進が認められたタンパク質のうち、actinin-1, actinin-4, protein DJ-1, cathepsin B に着目し、以下の検証実験を実施した。ウエスタンブロッティング法を適用したところ、いずれのタンパク質も、プロテオーム解析で対象とした2症例において、癌における発現亢進が認められ、プロテオーム解析の相対比較定量の差異も概ね反映していた。追加の4症例においても同様の傾向を示し、actinin-1, actinin-4, protein DJ-1 は5/6例、cathepsin B は全例において癌での発現亢進が認められた。

さらに免疫組織化学染色法を施行したところ、抽出タンパク質を用いたプロテオーム解析およびウエスタンブロッティングの結果は組織切片上でも支持されており、いずれのタンパク質も、切片上の全ての癌細胞で発現亢進の傾向が確認された。特に、細胞質における発現亢進が観察され、正常胆管上皮と癌細胞との境界が明瞭に判別可能であった。

【考察】近年、癌研究分野において種々のプロテオーム解析技法を用いたバイオマーカー開発が進められている。しかし、胆管癌組織を用いたアプローチの報告は調べる限り、ほとんどない。これは、症例数が他の消化器癌に比べ少ないこと、癌組織の比較対象となる良性疾患の正常胆管組織の採取が困難であること、手術時に進行癌が多く早期癌症例との比較検討が困難であることなどが理由として考えられる。本研究は、胆管癌バイオマーカー開発の一環として、癌で特異的に発現亢進を認めるタンパク質を同定するため、個体差による偏りを除去した同一患者の癌および正常胆管組織を用いて、プロテオーム発現変動解析を試みた。また、2種類の相対定量比較法を用いることによって、発現差異を認めるタンパク質を効率よく、かつ正確に同定することが可能であった。さらに得られた結果は、ウエスタンブロットおよび免疫組織化学染色の実験結果を反映していた。最終的に、本研究で注目した4種のタンパク質、actinin-1, actinin-4, protein DJ-1, cathepsin B はいずれも、他の癌種での発現亢進が報告されている一方、今回新たに胆管癌でも発現亢進していることが明らかとなった。

Actinin はアクチン結合タンパク質の1つで、 α , β , γ の3つのサブユニットが存在する。4種類が同定されている α -actinin のうち、actinin-1, -4 は非筋肉型と特徴付けられ、アクチンを束状化し、細胞の運動性を亢進させ、癌細胞の転移浸潤に関与するとされる。Protein DJ-1 は Ras と協調して細胞の癌化を促進する新規癌遺伝子とされ、発現亢進は卵巣癌、乳癌などの予後不良因子とされる。Cathepsin B はシステインプロテアーゼに属し、生理学的に細胞内タンパク質の代謝に関与しているが、多くの癌種で癌細胞での過剰発現や転移能との関与が報告されている。本研究において、これらのタンパク質の過剰発現が胆管癌で確認されたことから、胆管癌の浸潤や転移にも関与する可能性が考えられる。今後、さらなる分子生物学的な検証によって発癌機構との関わりなどが明らかになれば、胆管癌の生物学的特性の解明に繋がると考えられる。

本研究で見出されたタンパク質はいずれも、正常胆管組織に比べ胆管癌組織で発現亢進傾向が認められたことから、バイオマーカーとしての今後の臨床開発が期待される。今後の検討課題としては、免疫組織化学染色の結果を更に多検体で検証し、胆管癌の進展度診断への適応を検討すること、予後との相関を検証することによって予後診断マーカーとして、さらには患者の胆汁や血清中での発現変動解析により胆管癌診断マーカーとしての可能性を検討することなどが挙げられる。今後の臨床医学検討に期待したい。

今回、バイオマーカー候補タンパク質の網羅的探索に対して、組織検体を用いた LC-MS によるプロテオーム発現変動解析法は成功裏に適用された。今後、バイオマーカー開発を含めたターゲット分子の探索に対して、本法はひとつの有用な手段になると考えられることから、さらなる疾患プロテオミクスの展開に期待したい。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 近 藤 哲

学 位 論 文 題 名

Differential LC-MS-Based Proteomics of Surgical Human Cholangiocarcinoma Tissues

(ヒト胆管癌手術組織を用いた液体クロマトグラフィー質量分析による
プロテオーム発現変動解析)

胆管癌は難治性癌の一つであり唯一の根治療法は手術による完全切除である。しかしながら、根治術の適応となる患者は限られており、術後5年生存率も非常に低い。近年の手術手技の向上により、予後の改善傾向が認められるものの依然として低く、生物学的特性の解明に至っていないことから、早期診断や予後診断などに関連する胆管癌マーカーの開発が期待されている。近年、疾患バイオマーカーの探索研究分野において、プロテオーム解析手法が注目されているが、胆管癌に関する報告は数例のみである。そこで本研究では、ヒト胆管癌の手術組織検体を用いたプロテオーム解析を施行し、胆管癌バイオマーカーとしての候補タンパク質の同定、検証を試みた。

6症例の胆管癌患者から癌組織および正常胆管組織をそれぞれ採取し、2症例をプロテオーム解析の対象とし、4症例を検証に用いた。プロテオーム解析の試料はSDS-PAGEによりタンパク質組成の均一性を確認する一方、トリプシンにより完全消化した。得られた消化試料は質量分析計に供し、含有タンパク質の一斉同定解析とともに癌組織と正常胆管組織の試料間における発現変動解析を行った。発現変動解析にはセミ定量スペクトルカウンティング法と、安定同位体標識したタンパク質を内部標準として用いる定量法を適用した。胆管癌での発現亢進が示唆されたタンパク質のうち、他の癌種で発現亢進が報告されているが、胆管癌との関連は明らかにされていない4種について、ウエスタンブロッティングを行い、タンパク質発現状況を確認した。また、組織切片における発現状況を確認するため、免疫組織化学染色を用い検証を行った。

癌組織と正常胆管組織のプロテオーム発現比較解析の結果、482種類のタンパク質を同定した。さらにセミ定量比較において、胆管癌で発現亢進が有意と判断されたタンパク質、38種類を見出した。この発現亢進傾向は内部標準を用いた定量法においても確認された。この38種類のタンパク質の中には、すでに胆管癌で発現亢進が報告されているタンパク質も含まれており、結果の妥当性が示された。本研究ではさらに、4種のタンパク質 actinin-1, actinin-4, protein DJ-1, cathepsin B に着目し、検証実験を実施した。ウエスタンブロッティング法を適用したところ、いずれのタンパク質も癌における発現亢進が認められ、プロテオーム解析の相対比較定量の差異も概ね反映していた。さらに免疫組織化学染色法を施

行したところ、抽出タンパク質を用いたプロテオーム解析およびウエスタンブロッティングの結果は組織切片上でも支持されており、いずれのタンパク質も、切片上の全ての癌細胞で発現亢進の傾向が確認された。特に、細胞質における発現亢進が観察され、正常胆管上皮と癌細胞との境界が明瞭に判別可能であった。

本研究は、胆管癌バイオマーカー開発の一環として、癌で特異的に発現亢進を認めるタンパク質を同定するため、個体差による偏りを除去した同一患者の癌および正常胆管組織を用いて、プロテオーム発現変動解析を試みた。また、得られた結果は、ウエスタンブロッティングおよび免疫組織化学染色の結果を反映していた。最終的に、本研究で注目した actinin-1, actinin-4, protein DJ-1, cathepsin B はいずれも、他の癌種での発現亢進が報告されている一方、今回新たに胆管癌でも発現亢進していることが明らかとなった。今後、さらなる分子生物学的な検証によって発癌機構との関わりなどが明らかになれば、胆管癌の生物学的特性の解明に繋がると考えられ、更にはバイオマーカーとしての今後の臨床開発も期待される。

口頭発表に続き、副査今村雅寛教授より本研究の一連のプロテオーム解析に要した時間についてと4種のタンパク質が血中レベルで検出可能か否かについて、更には、マーカー候補タンパク質の同定手段としての他の有用なプロテオーム解析手法の有無について、副査近藤哲教授より定量解析に関してセミ定量法を基に検証実験を進めた理由についてと他の癌種での発現状況および今後の展望について、最後に主査秋田弘俊教授より他の癌種でも報告がなされていない未知のタンパク質のマーカーとしての可能性についてと臨床応用の可能性についての質問があった。

いずれの質問に対しても申請者はその主旨をよく理解し、自らの研究内容と文献的考察を混じえて適切に回答した。

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と判定した。