

氏名	佐藤七夕子
(ふりがな)	(さとう なゆこ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙第 号
学位審査年月日	平成29年6月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	Identifications of candidate breast cancer-specific biomarkers in fresh frozen breast tissue sections by MALDI-imaging coupled with <i>on-tissue</i> digestion (新鮮凍結乳癌組織切片を用いたマトリックス支援レーザー脱離イオン化イメージング質量分析による乳癌特異タンパク分子候補の同定)
論文審査委員	(主) 教授 大道正英 教授 田中慶太郎 教授 廣瀬善信

学位論文内容の要旨

《目的》

乳癌は世界中で毎年約 1.1 億人の罹患を認め、乳癌の早期診断や術後療法決定のためのバイオマーカー探索が行われている。今回、新鮮凍結乳癌組織を用いて、*on-tissue digestion* を組み合わせたマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization: MALDI) イメージング質量分析 (imaging mass spectrometry: IMS) (以下 MALDI-IMS) 法およびマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 四重極イオントラップ (quadrupole ion trap: QIT) 飛行時間型質量分析 (time of flight mass spectrometry: TOFMS) (以下 MALDI-QIT-TOFMS) を用いて乳癌組織に特異なタ

ンパク質の同定を試みた。

《対象》

浸潤性乳管癌と診断され、乳房切除術を受けた症例を対象（n=4）とした。

《方法》

1) 試料の作成

摘出した試料はヘキサンで凍結し、-80°Cで保存した。組織標本はクライオスタットで 10 μm で切り出し伝導性のスライドガラスに付着させ、脱塩した。

2) マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 MALDI-IMS によるイメージング質量分析

既報の手法に従いブルカードルトニクス社製 Autoflex II (MALDI-IMS) を用いて、シナピン酸を噴霧したタンパク質の組織内局在を、*on-tissue digestion* 後に CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) を噴霧し、ペプチドの組織内局在の可視化を行った。

3) マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 MALDI-QIT-TOFMS によるイメージング質量分析およびデータベース検索によるタンパク質同定

島津製作所のマニュアルに準じて DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid) を滴下した切片を島津製作所製 AXIMA Resonance を用いてタンパク質の同定を行った。

4) 免疫組織染色およびマッソントリクローム染色

I 型コラーゲン (I collagen alpha 2: COL1A2)、PPIA (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A) とともにラビットのポリクローナル抗体を使用した。マッソントリクローム染色は結合組織、特にコラーゲンを明瞭化するために行った。

《結果》

1) コラーゲン繊維といった結合組織は、HE 染色では好酸性に、マッソン・トリクローム染色でも同部位が青く染色された。抗 I 型コラーゲン抗体を使用した免疫組織染色でも同

一部位が染色された。

2) MALDI-QIT-TOFMS で得られた乳癌組織と正常乳腺組織のスペクトラムから、I型コラーゲン、PPIA、Histone 4、Histone 2A type1-A を同定した。

3) I型コラーゲン、PPIA の乳癌組織内での発現は免疫組織学的に確認でき、IMS 画像でもそれらのシグナル比は乳癌組織でより高かった。

《考察》

今回、MALDI-IMS と *on-tissue digestion* を組み合わせて、乳癌特異タンパク分子候補のタンパク質の同定を行った。HE 染色やマッソントリクローム染色ではI型コラーゲン組織は、正常乳腺組織および乳癌組織ともに同様に存在しているように見えるが、IMS 解析で見ると、分子レベルでは正常乳腺組織より乳癌組織の方がシグナル比が高く、乳癌組織でより多く存在していることが示唆された。生体内での乳癌組織の発達に関する細胞外マトリックスのメカニズムはまだ明らかになっていないが、乳癌細胞株の研究ではコラーゲン組織、特にI型コラーゲンに取り囲まれている乳癌細胞は細胞間のシグナル伝達により基底膜を構成するタンパク質を介した増殖が認められている。また、コラーゲン密度の高い乳腺の場合、間質の相互作用により乳癌発症リスクが高まるとの報告もある。以上より、乳癌におけるI型コラーゲンのバイオマーカーとしての可能性が示唆された。

PPIA は cyclophilin A とも呼ばれるが、免疫組織化学およびIMS 解析により乳癌組織でより多く PPIA の存在が示唆されたことから、乳癌におけるバイオマーカーとしての可能性が示唆された。PPIA は炎症反応の刺激に反応して細胞から分泌され、また細胞内のタンパク輸送に関係している。分泌された PPIA は細胞の遊走性や様々な機能をもたらし、炎症反応、腫瘍の浸潤にも関与するとされる。近年のプロテオミクスの研究では、PPIA は子宮内膜癌の予後因子や治療効果判定、乳癌では特にホルモン陽性乳癌での過剰発現が指摘されている。

今回同定した Histone2A および Histone4 そのものが癌との関連性を示す報告はなかったが、その変異体は癌遺伝子や癌抑制遺伝子の活性化や抑制に影響を与えることおよび癌

の早期発見のバイオマーカーになりうると報告されている。

《結語》

今回、我々は新鮮凍結乳癌組織を用い、MALDI-IMS 法にて 4 つのタンパク質の同定を行った。特に I 型コラーゲン、PPIA は免疫組織染色でもその発現を確認でき、乳癌のバイオマーカーとして利用できる可能性がある。*On-tissue digestion* を組み合わせたイメージング質量分析は、たった 1 枚の組織切片上に発現している疾患マーカーの同定ならびに組織内局在を可視化できる、先進的かつ有用な方法であることが示された。

論文審査結果の要旨

本研究は、*on-tissue digestion* を組み合わせたマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析イメージング法およびレーザー脱離イオン化四重極イオントラップ飛行時間型質量分析を用いて乳癌組織に特異的なタンパク質を同定したものである。乳癌はその罹患率の高さから、世界中で乳癌の早期診断や術後療法決定のためのバイオマーカー探索が行われている。これまでに、質量分析を用いて乳癌関連タンパク質を解析した例はあるが、*on-tissue digestion* の手法およびイメージング質量分析を組み合わせて疾患マーカーの同定ならびにその組織内局在を可視化した報告は多くない。

申請者は新鮮凍結乳癌組織を用いて、*on-tissue digestion* を組み合わせたマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析イメージング法およびレーザー脱離イオン化四重極イオントラップ飛行時間型質量分析を施行した。質量分析で得られた乳癌組織と正常乳腺組織のスペクトラムから、I型コラーゲン、PPIA、Histone 4、Histone 2A を同定した。特にI型コラーゲン、PPIA は免疫組織染色で発現を確認でき、IMS 画像でもそれらのシグナル比は乳癌組織でより高かった。

本研究で用いられた MALDI-IMS 法により、乳癌のバイオマーカーとしての可能性があるI型コラーゲン、PPIA を含めた4つのタンパク質を同定することができた。*On-tissue digestion* を組み合わせたイメージング質量分析は、たった1枚の組織切片上に発現している疾患マーカーの同定ならびに組織内局在を可視化できる、先進的かつ有用な方法であることが示され、特定物質の拾い上げあるいは病変内局在を知るための解析ツールとして今後の発展性が期待できると考えられる。

以上により、本論文は本学学位規程第3条第2項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Bulletin of the Osaka Medical College
63(1): 2017 In press 〈オンライン掲載〉