

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
藤田 能久	主査 教授 谷 川 允 彦 副査 教授 勝 健 一 副査 教授 芝 山 雄 老 副査 教授 田 窪 孝 行 副査 教授 森 浩 志
主論文題名 Proteomics-Based Approach Identifying Autoantibody against Peroxiredoxin VI as a Novel Serum Marker in Esophageal Squamous Cell Carcinoma (プロテオーム手法による食道扁平上皮癌における新規診断マーカー、抗 Peroxiredoxin VI 抗体の同定)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>プロテオミクスの急速な進歩に伴い悪性腫瘍における発現蛋白質の網羅的な解析が行われ、様々な biomarker が同定され診断および治療への応用が期待されている。しかし、膨大な解析結果の臨床への応用に関してはいまだ問題点が多いのが現状である。</p> <p>2001 年、SM.Hanash らのグループが2次元電気泳動(2D-PAGE)－ウェスタンブロット法(WB)－質量分析(MALDI-TOF MS/MS)を用い、肺癌患者血清中に抗 Annexin I &amp; II 自己抗体を同定し、これら自己抗体が新規診断マーカーとなり得る可能性を示した。</p> <p>今回の研究では、2D-PAGE－WB－MALDI-TOF MS/MS 法を用い食道扁平上皮癌発現蛋白質に対する新規自己抗体を同定し、癌診断マーカーとしてのその有用性を検討した。</p> <p>《対象と方法》</p> <p>2003 年 1 月から 2005 年 8 月までに大阪医科大学附属病院 一般・消化器外科に入院した食道扁平上皮癌患者血清 30 例、対照群として他癌患者血清 30 例(胃癌患者血清 15 例、大腸癌患者血清 15 例)、正常人血清 30 例を用いた。抗原提示には食道扁平上皮癌細胞株(TE-2)を用い、蛋白質解析は飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF MS/MS,ブルカーダルトロニクス社)を用いた。</p> <p>(方法)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>食道扁平上皮癌細胞株(TE-2)より可溶化蛋白を抽出し、2D-PAGE にて発現蛋白を分離後、Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写し、1次抗体として食道癌患者血清を用い WB/化学発光(ECL)法にて陽性スポットを検出した。さらに陽性スポットを銀染色ゲルより切り抜き MALDI-TOF MS/MS にて抗原蛋白を同定した。</li> <li>同定された Peroxiredoxin (Prx) VI に対する自己抗体の陽性率に関しては、Prx VI recombinant protein を抗原とし食道癌患者血清、他癌患者血清(胃癌、大腸癌)、正常人血清を用いたドットブロット法にて検討した。</li> <li>食道癌組織標本の Prx VI 発現量に関しては、凍結組織切片より mRNA を抽出し、Real-time RT-PCR(LightCycler)にて定量した。同時に抗 Prx VI ポリクローナル抗体を用い手術切除ホルマリ</li> </ol>	

ン固定標本(正常粘膜、異型上皮、表在癌、進行癌)を対象に免疫染色を行い蛋白発現の確認を行った。

#### 《結果》

- 1) 食道癌患者血清を1次抗体に、TE-2 可溶性蛋白を癌抗原として2D-PAGE-WB-ECL 検出では、数個の陽性スポットを認めたが、どれも正常人血清では認めなかった。MALDI-TOF MS/MSにて陽性スポットの一つ(pI=6.0、Molecular weight=27kDa)から抗酸化酵素であるPrx VIを同定した。
- 2) Prx VI recombinant proteinを用いたドットブロットでは、抗Prx VI自己抗体は食道癌患者血清30例中15例(50.0%)に認めた。一方、正常人血清においては30例中2例(6.6%)、他癌患者血清では30例中1例(3.3%:大腸癌1例)で陽性を示した。また、抗体陽性率と癌進行度には関連性は認めなかった。
- 3) Real-time RT-PCRによる自己抗体陽性患者の切除標本(癌組織)におけるPrx VIのmRNA発現量は自己抗体陰性患者と比較して高値であった。また、免疫染色でのPrx VI発現は、進行癌では浸潤部において細胞質内に高発現を認め、正常組織および異型上皮では発現を認めなかった。一方、表在癌において細胞質内に少量の蛋白発現を認めた。

#### 《考察》

プロテオミクスを用いた手法により抗Prx VI自己抗体を同定した。抗Prx VI自己抗体は食道癌患者血清30例中15例(50.0%)に認めたが、正常例では30例中2例(6.6%)、他癌患者では30例中1例(3.3%:大腸癌1例)の陽性率であった。

Prxは近年、注目されている抗酸化酵素のひとつで、これまでPrx I~VIの6つのfamilyが同定されている。Prxは細胞内において過酸化水素を還元することにより活性酸素種を調節し、アポトーシス抑制や細胞増殖を刺激するなどの生理活性が報告されている。

Prx I, IIは悪性中皮腫、肺癌、乳癌、食道癌など様々な癌腫において過剰発現が報告されている。しかし、肺胞上皮細胞などの正常組織においても高発現が見られることより、診断マーカーとしての有用性には疑問がもたれている。本研究では、食道癌患者血清において初めてPrx VIに対する自己抗体を同定し、対照群では陽性率が低値であったことより診断マーカーとしての有用性が期待される。

自己抗体産生のメカニズムについては過剰発現、癌細胞特異的な翻訳後修飾や遺伝子変異による立体構造変化などにより新たに抗原提示されると報告されている。本研究においてもReal-time RT-PCRにて自己抗体陽性患者の切除標本でmRNAの高発現を認め、さらに免疫染色でも癌細胞特異的発現を認めたことなど癌局所におけるPrx VI発現の増強が、自己抗体産生に寄与したのではないかと推察した。

#### 《結語》

2D-PAGE-WB-MALDI-TOF MS/MS法によるプロテオミクス手法により食道癌患者血清中に高頻度に存在する新規抗Prx VI自己抗体が同定され、癌診断マーカーとしての有用性が示唆された。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	藤田 能久
論文審査担当者		主 査 教授 谷 川 允 彦 副 査 教授 勝 健 一 副 査 教授 芝 山 雄 老 副 査 教授 田 窪 孝 行 副 査 教授 森 浩 志	
主論文題名 Proteomics-Based Approach Identifying Autoantibody against Peroxiredoxin VI as a Novel Serum Marker in Esophageal Squamous Cell Carcinoma (プロテオーム手法による食道扁平上皮癌における新規診断マーカー、抗 Peroxiredoxin VI 抗体の同定)			
論文審査結果の要旨			
<p>本研究は、近年注目を集めているプロテオーム手法を用いて食道扁平上皮癌患者に特異的に発現する抗 Peroxiredoxin VI 自己抗体を同定し、食道癌特異的診断マーカーとしての有用性を検討したものである。食道扁平上皮癌は比較的早期からリンパ節転移を認め、進行してくると容易に周囲臓器へ浸潤するなど悪性度の高い腫瘍であり、諸家の報告では従来の診断マーカーは陽性率も低く、十分なものではなかった。申請者が用いたプロテオーム手法を応用した2次元電気泳動-ウェスタンブロット-質量分析による自己抗体の同定は癌細胞が発現する網羅的な蛋白を抗原として患者血清中に新規自己抗体を同定する画期的な手法であり、これまで肺癌、乳癌、膵癌等において新規自己抗体が同定され、診断マーカーとしての有用性が報告されている。今回、食道癌患者血清中において同定された抗 Peroxiredoxin VI 自己抗体は食道癌患者血清において陽性率が50%と従来の診断マーカーより高く、さらに他癌患者(3.3%)、健常者(6.6%)において陽性率が低いなど特異度も高いと考えられた。</p> <p>自己抗体発生のメカニズムについては種々の報告があるが、本研究では腫瘍組織において特異的に発現することを遺伝子解析および免疫染色にて確認しており、自己抗体発生メカニズムについての考察も行っている。</p> <p>また、抗酸化酵素である Peroxiredoxin VI はシグナル伝達を介して細胞増殖やアポトーシスなどに関与するなど癌細胞の発育・進展にも深くかかわっている。食道癌患者において Peroxiredoxin VI が抗原提示されることは今後、抗体療法など治療への応用も期待できる。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第 9 条に定める所の博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) Clinical Cancer Research 12(21):604-611, 2006</p>			