

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
常 深 聡 一 郎	主 査 教 授 樋 口 和 秀 副 査 教 授 瀧 内 比 呂 也 副 査 教 授 岡 田 仁 克 副 査 教 授 吉 田 龍 太 郎
主論文題名 Proteomics-Based Identification of a Tumor Associated Antigen and its Corresponding Autoantibody in Gastric Cancer (プロテオーム手法による胃癌における癌関連抗原と自己抗体の同定)	
学位論文内容の要旨	
《研究目的》 ポストゲノム時代に入り、プロテオームを構成する多数の蛋白質の機能や機能的なつながりを網羅的に分析するプロテオーム研究によって、悪性腫瘍などの病態にかかわるタンパク質が biomaker として同定され、診断および治療への応用が期待されている。 2001 年、SM.Hanash らのグループが2次元電気泳動(2D-PAGE)ーウェスタンブロット法(WB)ーマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF MS/MS)を用い、肺癌患者血清中に抗 Annexin I & 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になり得る可能性を示した。今回の研究では、2D-PAGEーWBーMALDI-TOF MS/MS 法を用い胃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。 《対 象》 2008 年 5 月から 2008 年 12 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胃癌患者 60 例の血清、対照群として他癌患者 30 例の血清(食道癌患者血清 15 例、大腸癌患者血清 15 例)、正常人 20 例の血清を用いた。	

《方 法》

1) 抗原蛋白の同定

胃癌細胞株 (MkN-1、MkN-45、KATO-III) より可溶化蛋白を抽出し、2D-PAGE にて発現蛋白を分離後、PVDF 膜に転写し、1次抗体として胃癌患者血清を用い 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 Coomassie brilliant blue 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。

2) 自己抗体の陽性率

同定された 78kDa glucose-regulated protein (GRP78) に対する自己抗体の陽性率に関しては、GRP78 recombinant protein を抗原とし胃癌患者血清、他癌患者血清 (食道癌、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。

3) 免疫染色

胃癌組織標本の GRP78 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。また、抗 GRP78 ポリクローナル抗体を用い手術切除ホルマリン固定標本 (正常粘膜、早期癌、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) 胃癌患者血清を1次抗体とし、3 種胃癌細胞株 (MkN-1、MkN-45、KATO-III) の可溶化蛋白を癌抗原として2D-PAGE – WB – ECL を行い、癌患者特異的なスポット (pI=4.9、Molecular weight=72.4kDa) を MALDI-TOF MS/MS で解析し、小胞体内に存在する molecular chaperone の一種である GRP78 と同定した。

2) GRP78 recombinant protein を用いたドットブロットでは、抗 GRP78 自己抗体は胃癌患者血清 60 例中 17 例(28.3%)に認めた。一方、正常人血清においては 20 例中 0 例(0.0%)、食道癌患者血清では 15 例中 4 例(26.7%)、大腸癌患者血清では 15 例中 3 例(20.0%)で陽性を示した。胃癌患者において、抗体陽性率と癌進行度には関連性は認められなかった。

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 GRP78 の mRNA 発現量は自己抗体陰性患者と比較して高い傾向にあった。また、免疫染色での GRP78 発現は、早期癌、進行癌を問わず細胞質内に高発現を認め、正常組織では胃底腺の細胞質内に発現を認めたが、その他の部位での発現は認めなかった。

《考 察》

GRP78は、近年注目されているHeat shock proteinの一種であり、小胞体内に存在するMolecular chaperoneである。細胞が外的ストレスを受けた際合成が促進され、これにより通常誘導されるはずのapoptosisが阻害されるなどの生理活性が報告されている。GRP78は、乳癌、肺癌、肝細胞癌、前立腺癌、最近では胃癌の組織においても強い発現が報告されている。また、前立腺癌では自己抗体の発現も報告されており、癌の進展度と関係があるとされている。

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。本研究においてはReal-time RT-PCRにて自己抗体陽性患者の切除標本でmRNAの発現が高い傾向にはあったが有意差は認めなかった。免疫染色においては、癌細胞に蛋白発現を認めていたため、過剰発現ではなく、翻訳後修飾や遺伝子変異による立体構造変化といったものが自己抗体産生に寄与した可能性が考えられた。

本研究では、胃癌のみならず食道癌、大腸癌といった他の消化器癌患者血清でも、抗GRP78自己抗体の発現を同様の率で認め、対照群である健常者では自己抗体の高発現を認めなかった。胃癌に対する特異度は高いとはいえず、診断マーカーとしての有用性は少ないが、他の診断マーカーと併用することで診断率の向上も期待できると考えられた。

《結 語》

2D-PAGE-WB-MALDI-TOF MS/MS法によるプロテオミクスにより胃癌患者血清中に存在する新規抗GRP78自己抗体を同定した。癌診断マーカーとしての有用性は低いですが、他の診断マーカーとの併用で診断率の向上も期待できると考えられた。また、発現蛋白質の作用機序解明が、将来的に有用な診断・治療に発展する可能性があると考えられた。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲第号	氏名	常深聡一郎
論文審査担当者		主査教授 樋口 和秀	
		副査教授 瀧内 比呂也	
		副査教授 岡田 仁克	
		副査教授 吉田 龍太郎	
主論文題名			
Proteomics-Based Identification of a Tumor Associated Antigen and its Corresponding Autoantibody in Gastric Cancer			
(プロテオーム手法による胃癌における癌関連抗原と自己抗体の同定)			
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胃癌患者血清中に発現する抗 78kDa glucose-regulated protein (GRP78) 自己抗体を同定し、胃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。</p> <p>胃癌は近年検診の普及により早期癌で発見され、根治的治療が可能な症例が多い。しかし、確定診断は上部消化管内視鏡検査による生検であるため、その検査に対する抵抗感から検査を受けず進行癌の状態で見られる症例が多いのも事実である。侵襲の少ない検査法が確立されれば、より早期での診断・治療が可能となるため、治療成績や予後の改善が期待される。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、癌細胞が発現する蛋白を抗原として患者血清中に新規自己抗体を網羅的に同定する画期的な手法である。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、胃癌患者血清中において同定された抗 GRP78 自己抗体は胃癌患者血清において陽性率が 28.3%、食道癌患者と大腸癌患者はそれぞれ 26.7%と 20.0%、さら</p>			

に健常者においては 0.0%であった。GRP78 が胃腫瘍組織で強く発現することを遺伝子解析や免疫染色にて確認している。また、臓器特異性については必ずしも高いとはいえないが、癌診断という点においては有用性が示唆される。

Heat shock protein の一種である GRP78 は、外的ストレスによるアポトーシス誘導を阻害する生理活性を有するため、癌細胞の発育・進展にも深くかかわっている。胃癌患者において GRP78 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される。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条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)

Oncology Reports : -, 2010 in press