

# 博士論文審査報告書

## 論文題目

臨床検体と蛍光二次元電気泳動法を用いた  
大腸がんのプロテオーム解析

Proteomic study of tumor tissues using  
2D-DIGE revealed novel molecular  
backgrounds of colorectal cancer

申請者

杉原	豊
Yutaka	SUGIHARA

生命理工学専攻 生体制御研究
----------------

2013年 2月

本研究は、大腸がんの臨床検体を用い、大腸がんの悪性度に関わるタンパク質を同定し、機能を検証することを目的とした。本研究の結果から、APC-binding protein EB1の過剰発現が大腸がんの悪性度に関わるタンパク質であることが初めて示された。また、がん組織内で表面部、中心部、浸潤部といった部位によってタンパク質発現が異なっていることを明らかとした。タンパク質発現解析する上で解析対象にする部位を考慮するべきであることを明らかとした。

近年、大腸がんの治療法は進歩してきたが、リンパ節転移を伴った進行期における治療成績はいまだに悪い。大腸がんの治療成績向上のためには、新しい診断法や再発予測・予後予測する技術の開発、新規の治療標的を発見することが期待されている。

第一章では、研究背景と目的について述べている。がんは遺伝子に変異が蓄積することで起こる疾患であり、ゲノムの広範囲にわたって生じた遺伝子の変異によって正常細胞はがん細胞になる。ゲノムの変異は最終的には機能的な異常としてがんの臨床病理学的特性を決定しており、ゲノムの異常に基づいた臨床的な特性を反映する。ゲノムの機能的な翻訳産物はプロテオームであることより、がんの悪性度に関わる性質はプロテオームが直接影響を与えていると考えられる。そのため、ゲノムに蓄えられた生物学的機能を解釈するにはプロテオームの情報は必須であり、がん細胞においてゲノムの変異がどのようにがん細胞の形質に反映されているかを知るには、プロテオーム解析は重要である。特に、臨床検体を使ったプロテオーム解析は、バイオマーカー候補や治療標的を同定すること、がんの発生や進行の分子背景を理解する上で重要である。現在まで、がんの分子背景を調べる研究の多くは、細胞株を用いていたが、*in vivo*と*in vitro*で細胞の性質が異なっていることが知られている。さらに、臨床検体を用いたプロテオーム解析は、臨床病理学的なパラメータとタンパク質発現の対応を知る上でも重要である。本研究では、大腸がんの臨床検体を対象に、蛍光二次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析を行い、大腸がん組織のタンパク質の発現状態を調べた。異常を来たしたタンパク質が大腸がんの発生や進展に関与しているのかを解明することを目的として本研究を行った。

第二章では、本研究で同定した大腸がんの悪性度に関わる新しいタンパク質について述べている。大腸がん組織と正常組織をそれぞれすり潰した検体を用いたタンパク質発現解析を行った。59症例の大腸がん組織と正常組織のタンパク質発現プロファイルを蛍光二次元電気泳動法により観察した。まず、内部標準サンプルの作製を行った。これは、全ての症例から等量ずつタンパク質を混ぜ合わせることで作製した。内部標準サンプルはCy3で、大腸がん組織または正常組織といった個別サンプルはCy5で蛍光標識し、これら内部標準サンプルと個別サンプルを混ぜ合わせて二次元電気泳動をすることにより、タンパク質分離を行った。一枚のゲル画像から3458個のタンパク質ス

ポットを検出した。個々のスポットについて Cy5 と Cy3 のスポットのシグナル強度を測定し、Cy5 の強度を Cy3 の強度で割った割合を計算することで、ゲル間のばらつきの補正を行った。同一サンプルを 3 回泳動し、実験系の再現性を調べたところ、3458 個のタンパク質スポットのうち 98.8% 以上のタンパク質スポットのシグナル強度が 2 倍差以内に収まっており、相関係数は 0.9 以上であったことより、実験間で再現性が良いことが示唆された。正常組織とがん組織のタンパク質発現を比較し、統計学的に有意な発現差 ( $p < 0.01$  かつ 2.5 倍差以上) があるタンパク質スポットを調べたところ、110 個のタンパク質スポットが有意な発現差のあるタンパク質スポットであった。質量分析法により 110 個のタンパク質スポットは 67 種類のタンパク質から構成されていることが明らかとなった。これらのタンパク質のうち、研究室で使用できた抗体を用いて、ウエスタンブロット法による発現検証を行った。ウエスタンブロット法による発現検証されたタンパク質のうち、Wnt 経路に関わり、大腸がん以外のがんで悪性度に関わることが知られている、APC-binding protein EB1 (EB1) に注目した。EB1 の発現異常と臨床病理学的悪性度の関係、生物学的悪性度の関係を 132 症例の大腸がん組織検体を用いて、免疫染色法で解析を行った。免疫染色法により、EB1 の発現異常は、リンパ管侵襲や血管侵襲に関わっていることが明らかとなった。また、EB1 のタンパク質発現が高いと、予後不良であることを明らかとした。EB1 の機能を調べるために、大腸がん細胞株 Colo320 細胞と RNA 干渉法を用いた EB1 の発現抑制実験を行った。EB1 の発現を抑制すると、大腸がん細胞の増殖や浸潤能が抑制された。以上より、EB1 の発現上昇は、増殖や浸潤に関わり、大腸がんの予後に相関するタンパク質であることを明らかとした。

第三章では、大腸がん組織内の局在が異なるがん細胞がどのように生物学的特性に違いがあるかについて述べている。がん組織は、構造的に不均一な細胞集団である。がん組織内には、間質細胞や血管、炎症細胞、細胞外マトリックスなどが含まれている。そのため、がん細胞の進行は、変異といった遺伝的背景に依存するだけでなく、がん組織の微小環境にも依存すると考えられる。そのため、がんの進行を促進させる分子背景を理解するためには、遺伝子発現パターンとともにがん組織内でのがん細胞の局在を考慮すべきである。そこで、がん組織内の異なる部位のがん細胞におけるタンパク質発現プロファイルを調べた。19 症例の大腸がん組織と正常サンプルから目的とする細胞を回収した。大腸がん組織からは、表層部、中心部、浸潤部に局在するがん細胞をレーザーマイクロダイセクション法で回収し、タンパク質抽出を行った。国立がん研究センター研究所の近藤らが開発したレーザーマイクロダイセクションにより回収したサンプルを蛍光二次元電気泳動法により分離・観察する技術を用い、微量なタンパク質サンプルのタンパク質発現を観察した。解析対象としたタンパク質スポットは 3578 スポットである。サンプルが正常組織とがん組織の表層部、中心部、浸潤部の 4 つの群に分かれる

かどうかを調べるために主成分分析を行った。その結果、正常組織群とがん組織群の大きく 2 群に分かれ、組織内の局在によるがん細胞の分類は観察されなかった。がん細胞の局在はプロテオームデータ全体の特徴に影響を与えていないことが考えられた。がん組織の部位によるタンパク質発現の比較では有意差 ( $p < 0.01$  かつ 2 倍差以上) のあるタンパク質スポットが観察されなかった。主成分分析の結果、正常組織とがん組織間で異なるスポット強度があるタンパク質スポットが存在することが示唆されたことより、正常組織とがん組織内の異なる部位のがん細胞を区別することで新しい知見が得られるかどうかを調べた。その結果、正常細胞とがん細胞を比較すると有意に発現差 ( $p < 0.01$  かつ 2 倍差以上) のあるタンパク質スポットが観察された (表層部 ; 151 個、中心部 ; 133 個、浸潤部 ; 145 個)。この中には、部位特徴的に発現しているタンパク質スポットが含まれていた。次に、発現異常のみられたタンパク質スポットを質量分析法でタンパク質同定を行った。同定されたタンパク質のうち、部位特徴的に発現異常がみられたタンパク質の機能分類を DAVID database を用いた Gene Ontology 解析を行ったところ、表層部ではストレス応答に、中心部ではグルコース代謝、浸潤部ではアポトーシスのタンパク質が関わっていた。さらに、同定したタンパク質の一部を、ウェスタンブロット法で発現検証を行ったところ、二次元電気泳動法の結果と相関するタンパク質が観察された。これらの結果より、がん細胞のプロテオームは、がん組織の微小環境の影響を反映しているかもしれないこと、正常細胞とがん細胞のタンパク質発現を比較するときはサンプル回収を考慮すべきであることが示唆された。

最終章では、本研究の成果を総括して考察し、今後の展望を示している。また、本研究で得られた大腸がんにおけるタンパク質発現異常の報告や研究成果は、生物学や腫瘍学の領域にがんの分子背景を理解することに貢献する。

以上をまとめると本研究は、大腸がんの発生や進行に関わるタンパク質を多数発見した。そのうち、APC-binding protein EB1 については、132 症例を用いた免疫染色法により、悪性度と相関することを明らかにした。大腸がん細胞株と RNA 干渉法を用いた *in vitro* 実験系では、EB1 の発現上昇が細胞増殖や浸潤に関わることを示唆した。また、がん組織内のタンパク質発現や生物学的機能は、部位によって異なることを示した。本研究成果は、大腸がんの発生や進展の機序へ繋がる布石になるものと期待できる。よって、本論文は、博士 (理学) の学位論文として相応しいものであると認める。

2013 年 2 月

(主査)	早稲田大学教授	理学博士 (早稲田大学) 並木 秀男
	早稲田大学教授	理学博士 (早稲田大学) 筒井 和義
	早稲田大学教授	理学博士 (名古屋大学) 大山 隆