

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	市川 寛
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 595 号
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	Laser Microdissection and Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis Reveal the Role of a Novel Macrophage-Capping Protein in Lymph Node Metastasis in Gastric Cancer (Macrophage capping protein は胃癌リンパ節転移に関わる新規タンパク質である— レーザーマイクロダイセクションと蛍光 2 次元電気泳動法を用いたプロテオーム解 析—)
論文審査委員	主査 教授 山本 格 副査 教授 五十嵐 道弘 副査 教授 若井 俊文

博士論文の要旨

【背景と目的】胃癌においてリンパ節転移は重要な予後因子である。リンパ節転移の分子機構を明らかにすることは、予後予測マーカーや新規治療標的の開発にとって重要である。

本研究の目的はレーザーマイクロダイセクションと蛍光 2 次元電気泳動法 (2D-DIGE) を用いたプロテオーム解析により、胃癌リンパ節転移に関わるタンパク質を同定し、胃癌細胞の増殖能や浸潤能への関与を明らかにすることである。

【方法】臨床検体

2010 年に新潟大学医歯学総合病院及びその関連病院で切除された、リンパ節転移陰性の胃癌腫瘍組織 14 検体と対応する非腫瘍胃粘膜組織 14 検体、リンパ節転移陽性の胃癌腫瘍組織 8 検体を解析に用いた。検体は OCT コンパウンドに包埋して液体窒素で凍結後、 -80°C の冷凍庫で保管した。本研究は新潟大学医歯学総合病院および関連施設における倫理委員会の承認および患者同意を得た後に施行した。

タンパク質発現解析

レーザーマイクロダイセクションにより腫瘍細胞と非腫瘍細胞を選択的に回収し、タンパク質を抽出した。全ての個別検体を混合した内部標準検体を作成し Cy3 で標識し、個別検体は Cy5 で標識した。内部標準検体と個別検体を混合して、2D-DIGE でタンパク質を分離し定量化した。1 次元目の分離は等電点電気泳動 (24cm, 等電点 4~7) で行った。2 次元目の分離には、24 cm×33 cm 大の 12.5% ポリアクリルアミドゲル (自家製) を用いた。

統計学的に強度差を認めたタンパク質スポットについては、回収したゲル片からタンパク質を抽出し、質量分析によるタンパク質の同定を行った。

培養細胞を用いた Macrophage capping protein (CapG) の機能解析

MKN28 と SH-10-TC の 2 種類の胃癌細胞株を使用した。CapG 発現抑制には 2 種類の siRNA を用い、トランスフェクションには Lipofectamin 2000 (Invitrogen) を使用した。細胞増殖能の評価には、Cell Counting Kit-8 (Dojindo, 熊本) を用い、細胞浸潤能の評価には、BD Biocoat Matrigel Invasion Chambers (BD Biosciences, Bedford, MA) を用いた。

【結果】 申請者らは 2D-DIGE により 3228 個のタンパク質スポットを解析した。検体間の比較から、非腫瘍組織とリンパ節転移陰性腫瘍組織間では有意な発現差がなく、リンパ節転移陽性腫瘍組織で有意に高発現している CapG に着目した (発現差 = 2.99 倍、Wilcoxon 検定の P 値 < 0.05)。Western blotting による検証実験では、リンパ節転移陽性の腫瘍検体において CapG は有意に高発現していた (P 値 = 0.011)。

最後に、MKN28 細胞と SH-10-TC 細胞を用いた CapG の機能解析を行った。siRNA による CapG の発現低下により、細胞増殖能に有意な変化は認められなかった。一方、浸潤能については 2 種類の細胞株で有意な低下を認めた (P 値 < 0.05)。

【考察】 申請者らは、CapG が胃癌細胞の浸潤に関わることを示した。CapG は actin 調整タンパク質の gelsolin/villin ファミリーに属し、細胞運動を調節することが知られている。CapG は膀胱癌、乳癌や前立腺癌の浸潤能に関わることを証明されている。しかしながら、CapG が腫瘍の転移過程にどのように関与しているかについては、いまだ不明な点が多い。これらを解明することは、癌転移の分子機構について理解を深める上で重要である。

CapG を予後予測マーカーとして臨床応用するためには、検証実験が必要である。今回の実験では、新鮮凍結検体を用いたが、同検体では大規模な検証実験を行うことは難しい。検証実験には、パラフィン包埋検体を用いた免疫組織化学染色のような、より簡便な手法が適している。我々は、Western blotting で使用した抗体を用いて免疫組織化学染色を施行したが、胃癌組織における CapG 発現とリンパ節転移の関係は再現されなかった。CapG の臨床応用のためには、免疫組織化学染色に使用可能な抗体が必要不可欠であり、抗体の開発と多検体による検証は今後の課題である。

【結論】 申請者らは、胃癌リンパ節転移に関わるタンパク質の探索を行った。レーザーマイクロダイセクションと 2D-DIGE を用いたプロテオーム解析により、CapG が胃癌リンパ節転移に関与しているという新知見を得た。また、CapG は胃癌細胞の浸潤能に関与していた。CapG は胃癌における予後予測マーカーや新規治療標的としての有用性を検証する価値のあるタンパク質である。

審査結果の要旨

本研究の目的はプロテオーム解析により、胃癌リンパ節転移に関わるタンパク質を同定し、胃癌細胞の増殖能や浸潤能への関与を明らかにすることであった。

新潟大学医歯学総合病院及びその関連病院で切除された、リンパ節転移陰性の胃癌腫瘍組織 14 検体と対応する非腫瘍胃粘膜組織 14 検体、リンパ節転移陽性の胃癌腫瘍組織 8 検体を用いた。レーザーマイクロダイセクションにより腫瘍細胞と非腫瘍細胞を回収し、タンパク質を抽出した。全ての個別検体を混合した内部標準検体を Cy3 で標識し、個別検体を Cy5 で標識した。それらを混合して、蛍光 2 次元電気泳動法 (2D-DIGE) でタンパク質を分離し定量化した。統計学的に強度差を認めたタンパク質スポットについて、回収したゲル片からタンパク質を抽出し、質量分析によるタンパク質の同定を行った。また、MKN28 と SH-10-TC の 2 種類の胃癌細胞株を使用し、同定タンパク質の機能解析を行った。

2D-DIGE により 3228 個のタンパク質スポットを検出し、非腫瘍組織とリンパ節転移陰性腫瘍組織間で有意な発現差がなく、リンパ節転移陽性腫瘍組織で有意に高発現している Macrophage capping protein

(CapG)を同定した(発現差 = 2.99 倍、Wilcoxon 検定の P 値 < 0.05)。Western blotting による検証では、リンパ節転移陽性の腫瘍検体において CapG は有意に高発現していた (P 値 = 0.011)。

MKN28 細胞と SH-10-TC 細胞を用いて siRNA による CapG の発現を抑制すると、細胞増殖能に有意な変化は認められなかったが、浸潤能に有意な低下を認めた (P 値 < 0.05)。

本研究は、胃癌のリンパ節転移に関わるタンパク質として、CapG が関与しており、CapG は胃癌細胞の浸潤能に関与していることを示した。CapG は胃癌における予後予測マーカーや新規治療標的としての有用性を検証する価値のあるタンパク質と考えられた。

以上の点を明らかに点で、学位論文としての価値を認める。