



病理組織における プロテオーム解析の意義と貢献

大阪市立大学大学院医学研究科都市環境病理学 鰐淵 英機

1 はじめに

病理組織診断は、腫瘍においてはその確定診断となる重要な意味合いをもっているが、近年においてはその組織像からの悪性度を含めた質的診断のみならず、組織において発現している蛋白を解析することにより、その腫瘍の生物学的特性を如実に解析することができるようになってきた。その基本となるのが、特定の組織からの蛋白抽出とプロテオーム解析によるバイオマーカー探索である。本稿においては、われわれの研究室で行っている病理組織におけるプロテオーム解析を紹介したい。

2 動物モデルにおける 前がん病変マーカーの開発

齧歯類においては、化学物質による肝発がん過程において、腫瘍に至る前がん病変として変異細胞巣が重要視されている。ラットにおいては、さらにこの変異細胞巣に特異的に発現する GST-P を前がん病変マーカーとして免疫染色で認識し、GST-P 陽性細胞巣を前がん病変の指標としている (図 1)。われわれは前がん病変から発現し、腫瘍に至るのに重要な役割を果たす蛋白を解析するために、レーザーマイクロディセクション法を用いて肝発がん過程にあるラット肝組織より GST-P 陽性細胞巣を切り出し、SELDI ProteinChip System あるいは QSTAR Elite LC-MS/MS を用いてプロテオーム解析を行った (図 2)。その結果、前がん病変から発

現する cytokeratin 8 (CK8) および cytokeratin 18 (CK18) を同定した (図 3、図 4)¹⁾。また、同様に、mitochondrial prohibitins 1/2 や septin 9 がラット肝発がん過程に強く関与し、前がん病変から発現していることを明らかにした²⁾。

CK8 および CK18 は、免疫染色でサイズの大きな GST-P 陽性細胞巣および肝細胞がんに陽性に発現することが確認され (図 5)、新たな肝前がん病変マーカーとしての意義が求められた。GST-P 陽性細胞巣と肝細胞がんにおける PCNA 陽性細胞の数を調べた結果、サイズの大きい (>20 細胞) GST-P 陽性細胞巣で、CK8/18 および PCNA 陽性細胞の有意な増加が見られた (図 6)。腫瘍においても、CK8/18 および PCNA 陽性細胞の有意な増加が認められており、細胞増殖の増加が腫瘍の促進に関与することが分かった。最近、CK8 や CK18 が tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) と結合することが報告され、JNK 細胞内情報伝達および NF kappa B 活性化に関与すると考えられている (Caulin C. et al, 2000)。すなわち、本実験で観察された PCNA 陽性細胞数の増加は、今まで報告された研究データと一致していることが確認された。また、ヒトの肝細胞がんでは免疫染色法を用いた実験において、CK8/18 の過剰発現が報告されている (Athanasiadou P. et al, 2007)。CK8 や CK18 は中間径フィラメントであり、正常肝臓組織では細胞膜に強い発現が見られ (Abe M. et al, 1990)、*in vitro* の実験と形質転換動物モデルの研究結果により、CK8/18 が肝細胞を多様なストレスおよび毒性物質から守っていることが知られている (Lau A. et al,

Pathogenesis of chemical induced rat liver cancer

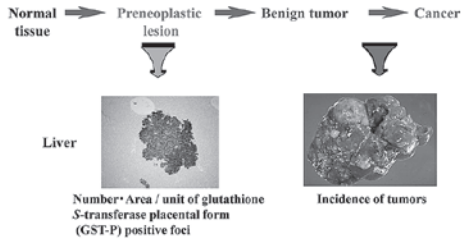
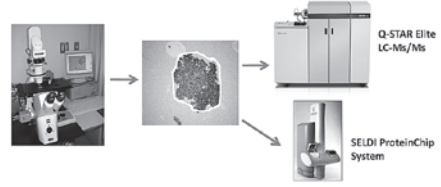


図1 ラット肝発がん過程

ラット肝発がんにおけるGST-P陽性細胞巢のプロテオーム解析



1. 腫瘍および前がん病変から直接蛋白を同定するから血液サンプルの様々なプレが少なく確実である。
2. サンプル量が微量でも解析可能なシステムである。

図2 微量組織サンプルからの蛋白発現解析

Protein spectra in the high dose PB-treated rat liver detected by Q10 array (SPA matrix)

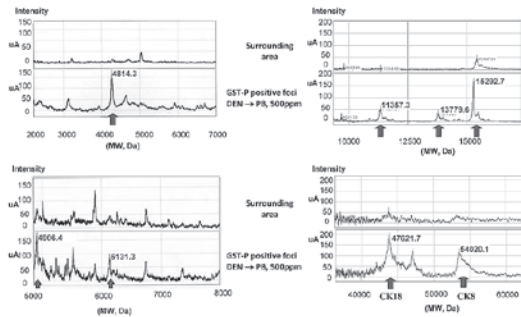


図3 SELDI ProteinChip Systemによるラット肝 GST-P細胞巢および正常肝における蛋白発現解析

Up-regulation of cytokeratins 8 and 18 in GST-P positive foci

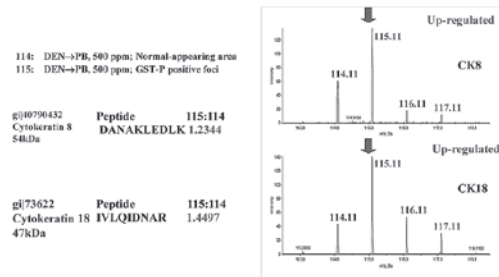


図4 QSTAR Elite LC-MS/MSによるラット肝 GST-P細胞巢および正常肝における蛋白発現解析

Double immunohistochemistry for GST-P and Cytokeratin 8/18

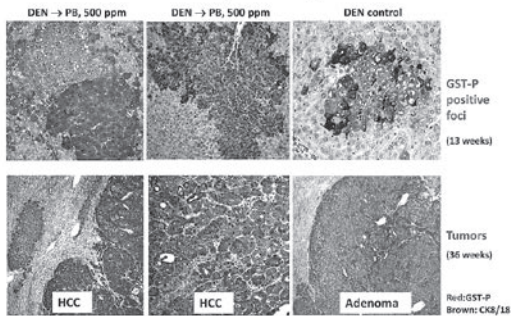


図5 ラット肝前がん病変、肝細胞腺腫および肝細胞がんにおける CK8/18の免疫染色

Double immunohistochemistry for Cytokeratin 8/18 and PCNA

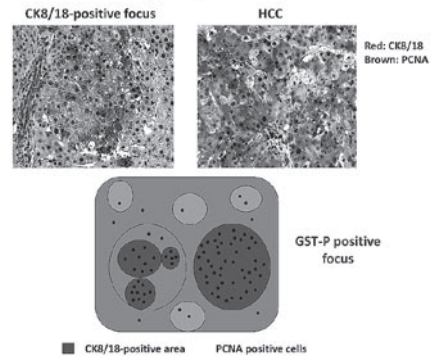


図6 ラット肝前がん病変および肝細胞がんにおける CK8/18とPCNAの二重染色

2007)。さらに、CK8やCK18の変異が肝臓病（ウイルス性肝炎、肝硬変など）のリスク要因であることが報告されている（Ku N. et al, 2003）。CK8がc-Jun N-terminal kinase (JNK)、p38およびprotein kinase C delta (PKC δ)のターゲットであり、リン酸化されたCK8がCK18と結合し、その複合体の

活性化により正常細胞ががん細胞に変更すると考えられる（He T. et al, 2002）。すなわち、これらのことよりラット肝発がんにおけるCK8/18はGST-P陽性細胞巢から肝細胞がんへ進展する前がん病変の新たなバイオマーカーになりうると考えられた。

一方、マウスの化学物質による発がん過程におい

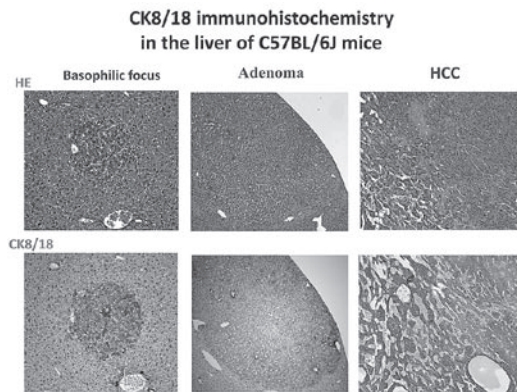


図7 マウス肝前がん病変、肝細胞腺腫および肝細胞がんにおける CK8/18の免疫染色

では前がん病変としての変異細胞巣として、好塩基性細胞巣や好酸性細胞巣などが知られてはいるが、マーカーとなる蛋白はこれまで明らかにはなっていなかった。そこでわれわれは、DENによって誘発したマウス肝がんのプロテオーム解析を施行し、ラットと同様にCK8およびCK18が発現していることを明らかにした。また、これらが免疫染色にて好塩基性細胞巣および混合型変異細胞巣、肝細胞腺腫、肝細胞がんが発現していることを確認し、マウス肝発がん過程における新しい前がん病変マーカーとなることを明らかにした(図7)³⁾。

3 ヒト肺がん組織におけるバイオマーカー開発

動物組織からのプロテオーム解析の技術をヒトがん組織に適応することにより、ヒトがんが発現する蛋白を同定し、腫瘍の臨床生物学的特性と比較することにより新たなバイオマーカーとしての意義を解析することができるようになった。われわれは、大阪市立大学医学部附属病院で手術した原発性肺腺がんを用いて、凍結生材料の腫瘍部と非腫瘍部のプロテオーム解析することにより腫瘍において発現が上昇する蛋白126種類、発現が低下する蛋白11種類を同定した。新たな腫瘍マーカー開発を目指し、腫瘍で発現上昇している蛋白で、分泌蛋白となりうるもののなかからプロテインXを同定した。この蛋白は、これまで乳がんが発現上昇していることが報告されているが、肺がんにおいてはまだ報告がない。

原発性肺腺がん268症例の腫瘍の臨床病理学的特性と免疫染色による腫瘍における蛋白発現程度を検討した結果、プロテインXはさまざまな臨床パラメーターとは相関しないが、予後とは負の相関があることが明らかになった。すなわち、原発腫瘍において発現程度が強いほど予後が良いことが示された(投稿中1)。さらに、われわれはこのプロテインXを血清中で同定し、腫瘍マーカーとして予後と相関することを明らかにした(投稿中2)。プロテインXの組織における免疫染色による発現が予後と逆相関するのは、予後の悪いものほど血清中に分泌されていることを示しているものと考えられた。このように、腫瘍組織のプロテオーム解析により新しいバイオマーカーを開発することができるとともに、そのなかから治療のターゲットとなる蛋白の同定につながる事が明らかになってきている。

4 ホルマリン固定パラフィン包埋材料のプロテオーム

これまで、組織からのプロテオーム解析は、凍結生組織を用いることが必要であった。しかし病理学においては、その組織診断の重要性からほとんどの病理組織材料はホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)に供せられる。そこで、われわれはFFPE材料からのプロテオーム解析の手法を開発した。凍結材料に比べれば、やや同定できる蛋白の数は劣るが、FFPE材料からのプロテオーム解析の有用性は、計り知れないものがある。FFPE材料からマイクロームで厚さ10 μ mで薄切し、腫瘍部分をニードルダイセクションあるいはマイクロダイセクションにて切り出し、蛋白を抽出する。抽出に必要な試薬に工夫が加えられている点が、凍結材料を用いる場合と違うところである。これによって、これまでに蓄積されてきた莫大な数の病理組織材料をプロテオーム解析の対象とできるようになった。

5 糖尿病性糸球体硬化症のプロテオーム解析

糖尿病の合併症としての腎症の本態の一つが、糖

尿病性糸球体硬化症である。糖尿病性糸球体硬化症はメサンギウム基質の増加と基底膜の肥厚からなるが、その原因は未だ十分には解明されていない。腎臓は糸球体以外に多くの部分を尿細管が占めている。そこで、糖尿病性糸球体硬化症に陥った糸球体のみをレーザーマイクロダイセクション法により切り出し、糸球体に発現してきている蛋白の変化を解析することにした。材料は病理解剖された糖尿病患者の腎臓で、FFPE 材料である。レーザーマイクロダイセクションにより、糸球体のみ切り出すことができる。今回の解析で新たにプロテインYを同定し、糖尿病性腎症における発現と病態進展との関係を解析した（投稿中3）。さらに、現在、他の腎疾患におけるプロテインYの役割についても解析を検討している。このように、腫瘍のみならずあらゆる病理組織のFFPE 材料からのプロテオーム解析が可能となった。また、QSTAR LC-MS/MS システムの導入で微量な蛋白からの解析が可能であるため、あらゆる材料を対象としてプロテオーム解析が可能となっている。

文献

- 1) Kakehashi, A., Inoue, M., Wei, M., Fukushima, S. and Wanibuchi, H.: Cytokeratin 8/18 overexpression and complex formation as an indicator of GST-P positive foci transformation into hepatocellular carcinomas. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 238, 71-79, 2009.
- 2) Kakehashi, A., Ishii, N., Shibata, T., Wei, M., Okazaki, E., Tachibana, T., Fukushima, S. and Wanibuchi, H.: Mitochondrial prohibitins and septin 9 are implicated in the onset of rat hepatocarcinogenesis. *Toxicol. Sci.*, 119, 61-72, 2011.
- 3) Kakehashi, A., Kato, A., Inoue, M., Ishii, N., Okazaki, E., Wei, M., Tachibana, T. and Wanibuchi, H.: Cytokeratin 8/18 as a new marker of mouse liver preneoplastic lesions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 242, 47-55, 2009.



Pfizer Oncology

抗悪性腫瘍剤 / キナーゼ阻害剤 薬価基準収載

創薬、処方せん医薬品 注意—医師等の処方せんにより使用すること

スーテント® カプセル 12.5mg

SUTENT® Capsule スニチニブリンゴ酸塩カプセル

「効能・効果」、「用法・用量」、「警告・禁忌・原則禁忌を含む使用上の注意」、「効能・効果に関連する使用上の注意」、「用法・用量に関連する使用上の注意」及び「副作用」の詳細は、添付文書をご参照ください。

ファイザー株式会社

〒151-8589 東京都渋谷区代々木3-22-7

資料請求先：製品情報センター 2010年6月作成