

氏名	まえだ しんぺい 前田 晋平
学位の種類	博士 (医学)
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 27 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	Proteomic Analysis of Extrahepatic Cholangiocarcinoma using Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues (ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いたプロテオミクスによる胆管癌進展因子の解析)
論文審査委員	主査 教授 海野 倫明 教授 下瀬川 徹 教授 五十嵐和彦

論文内容要旨

【背景】胆管癌は特異的臨床症状に乏しく、特異的腫瘍マーカーもないために進行癌症例が多く、極めて予後不良な疾患である。確定診断や早期診断に有用なバイオマーカーの同定が求められているが、症例数の少なさや術式の多様性から、プロスペクティブな症例の蓄積や大規模解析が困難で、高いエビデンスレベルのデータは殆どない。近年急速に発達した質量分析計(MS)はプロテオミクスにおける強力な解析ツールとなっている。ショットガン解析は、得られたデータの俯瞰的解析により既存の知見にとらわれない新知見を得ることが期待できる手法であり、一方 Selected Reaction Monitoring (SRM)によるターゲット解析は高い定量性を特徴とする手法である。ホルマリン固定パラフィン包埋(Formalin-Fixed Paraffin-Embedded; FFPE)組織は、一般的な組織保存法として病院に多数保管されており、レトロスペクティブな解析が容易な点で、稀少疾患では特に優位性が高い解析対象となる。近年 FFPE 組織からのタンパク質抽出技術が実現し、MS を基盤とするプロテオミクスに供することが可能となった。

【目的】胆管癌 FFPE 組織から MS を基盤としたプロテオミクスにより、診断能の向上につながる新規バイオマーカータンパク質を同定する。

【対象】1998年1月～2008年10月に当科で手術を施行し、術前化学放射線療法施行例を除いた肝外胆管癌症例 165 例 (胆道癌取扱い規約/stage I : II : III : IV = 12 : 37 : 50 : 66)、および非癌部として膵頭部癌に対して手術を施行した症例の胆管 21 例を用いた。全 186 例のうち、stage I・stage IV・非癌部各 7 例 (計 21 例) を discovery set とし、残り 165 例を validation set とした。

【方法と結果】

Laser Micro Dissection: 病理医検閲により各症例の FFPE 組織を選定し、LMD6000 を用いて癌細胞 (または胆管上皮細胞) を選択的に約 30,000 細胞採取した。

Protein Extraction: Liquid Tissue™ MS Protein Prep kit によりサンプルを可溶化し、トリプシンにてペプチド化した。

Shotgun Proteomics: イオントラップ型 MS にてペプチド化サンプルの網羅的解析を行った。タンパク質同定ソフトウェア MASCOT を用い、MS データをアミノ酸配列データベース Swiss Prot に照合し、各サンプル 3 回測定したものを統合して発現タンパク質を同定した。Discovery set の解析により、stage I: 1266 種、stage IV: 1143 種、非癌部: 1095 種、計 1992 種のタンパク質を同定した。

Semi-quantitative Comparison: スペクトラルカウント法 (相対変化量 2 倍以上) 及び G 検定 (P

< 0.05) により癌部と非癌部の半定量比較解析を行い、癌部で有意に高発現する 136 種のタンパク質を同定した。

Targeted Proteomics: 三連四重極型 MS を用いた scheduled-SRM による定量検証を行った。上記にて同定した候補タンパク質のうち一部の構造タンパク質等を除く 66 種を選択し、さらに今回のショットガン解析では有意な高発現を認めなかったものの過去に報告のある胆管癌マーカー候補タンパク質を加えた 81 種を定量検証ターゲットとした。予備実験にて安定して検出された 57 タンパク質(408 transitions)を本測定した。各サンプル 3 回ずつ測定し、 β -actin を内部標準として定量値を算出した。Stage I と非癌部、stage IV と非癌部の比較で平均値が 2 倍以上を示したものを高発現と定義し、癌部特異的に高発現する 11 種(新規 7 種:OLFM4, OAT, CAD17, FABPL, AOFA, CPSM, HMCS2, 公知 4 種: S100P, CEAM5, MUC5A, K1C20)を抽出した(平成 23 年 5 月 12 日 特願: 2011-107624)。

Immunohistochemistry: 特異的抗体が入手可能であった 10 種のタンパク質の免疫組織化学的検証を行い、癌細胞特異的な発現を確認した。Validation set での検証では、S100P (84%), CEAM5 (75%), MUC5A (62%), OLFM4 (60%), OAT (42%), CAD17 (41%), FABPL (38%), AOFA (30%), K1C20 (25%)が癌部で有意に高い陽性率を示し、CPSM (22%)も陽性率が高い傾向を示した。

【結語】FFPE 組織を試料とし MS を基盤としたプロテオミクスにて胆管癌で高発現する 10 種のタンパク質を同定した。新規のタンパク質 (6 種) とともに既知のタンパク質 (4 種) が同定されたことは、本研究ワークフローがバイオマーカー探索に有用であることを示唆する。これらのタンパク質の臨床応用として、いまだ正診率が十分ではない擦過細胞診や胆道生検において診断能向上に寄与することが期待される。将来的には、癌細胞の極めて高い多様性を考え、特異度の高いマーカーを組み合わせたマルチプルマーカー一斉分析を個別化医療や新規治療戦略につなげたいと考えている。

審査結果の要旨

博士論文題目 Proteomic Analysis of Extrahepatic Cholangiocarcinoma using Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues (ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いたプロテオミクスによる胆管癌進展因子の解析).....

所属専攻・分野名 医科学専攻 消化器外科学 分野.....

学籍番号 氏名 前田 晋平.....

本研究は、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）した肝外胆管癌組織からタンパク質を抽出し、質量分析を用いて発現タンパク質を網羅的に解析した新規性の高い研究である。この方法によって、stage I 症例、stage IV 症例から得た胆管癌組織、および正常胆管上皮における発現プロファイルと発現量を比較し、胆管癌に特異的に発現し、かつ stage と関連するタンパク質 11 種類を同定した。さらに、多数例の胆管癌組織でこれらタンパク質の発現を免疫組織化学によって検証を行い、S100P、CEAM5、MUC5A、OLFM4、OAT、CAD17、FABPL、AOFA、K1C20 が癌部で高い陽性率を示すことを確認し、質量分析によるプロテオミクスの妥当性を証明した。画期的な方法により胆管癌と関連する因子を網羅的に解析した優れた研究内容である。同定されたタンパク質は今後、いまだに極めて予後不良である胆管癌の確定診断や早期診断につながる可能性があり、非常に価値の高い研究である。論文はよく推敲されており、論旨も明快、完成度の高い優れた論文であると考えられる。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。