



Title	Plasma membrane proteomics identifies bone marrow stromal antigen 2 as a potential therapeutic target in endometrial cancer
Author(s)	横山, 拓平
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59709
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	横 山 拓 平
博士の専攻分野の名称	博 士（医学）
学 位 記 番 号	第 2 5 5 9 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 8 月 21 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学 位 論 文 名	Plasma membrane proteomics identifies bone marrow stromal antigen 2 as a potential therapeutic target in endometrial cancer (膜蛋白質のプロテオーム解析によって同定した bone marrow stromal antigen 2 は子宮内膜癌の治療標的分子となりうる)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 木村 正 (副査) 教 授 金倉 譲 教 授 野々村 祝夫

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的(Purpose)〕

癌治療の新規標的分子を探索する研究は数多くなされているが、スクリーニング手法として確立されたものはまだない。実際に、抗体医薬品による治療や分子イメージングの標的として応用するためには、細胞膜に局在している分子を同定する必要がある。プロテオーム解析における従来の手法である2次元電気泳動法では、疎水性が高く、難溶解性の膜蛋白は解析困難であった。本研究では、nanoLC-MS/MSシステムによるショットガンプロテオーム解析技術とアミノ酸安定同位体ラベルによる相対定量技術を組み合わせ、膜蛋白の網羅的な定量解析を行った。子宮内膜癌細胞の膜蛋白を解析することにより、新規標的分子として応用可能な候補分子を同定し、さらにはその同定した分子の治療標的としての妥当性を検討することを目的とした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

不死化正常子宮内膜細胞株1種類および子宮内膜癌細胞株7種類を用いて、細胞表面膜蛋白を細胞膜不透過性ビオチンで標識し、アビジンカラムを用いて細胞膜蛋白のみを濃縮し、isobaric tags for relative and absolute quantitation(iTRAQ)法により蛋白の網羅的な定量解析を行った。272個の蛋白が同定され、そのうち139個(51%)が細胞膜に局在を持つ蛋白であった。7種類の癌細胞株のうち6種類で、不死化正常子宮内膜細胞株に比べて2倍以上に発現の上昇を認めた bone marrow stromal antigen 2(BST2)について、さらなる解析を行った。不死化正常子宮内膜細胞株1種類および子宮内膜癌細胞株9種類を用いて、定量的PCRおよびFACSにて mRNAおよび蛋白レベルでのBST2の発現を確認した。不死化正常子宮内膜細胞株では、mRNAレベルでも蛋白レベルでもBST2の発現は認められなかったが、子宮内膜癌細胞株では、mRNAレベルでは9種類のうち7種類で、蛋白レベルでは9種類のうち6種類でBST2の発現を認めた。FACSによる解析の結果は、iTRAQによる解析の結果を裏付けるものであった。次に、1998年から2007年に当科で手術を施行した177症例の臨床検体を用いた免疫組織化学染色でBST2の発現を検討した。中等度以上の強陽性を示したのは、子宮内膜癌組織では72%(118例中84例)

であったのに対し、正常子宮内膜組織では1.7% (59例中1例)であり、子宮内膜癌組織において有意に発現が上昇していることが明らかになった ($P<0.01$)。そこで、4種類のBST2発現子宮内膜癌細胞株に対してsiRNAによりBST2の発現を抑制したところ、in vitroでは細胞増殖に変化を認めなかった。また、抗BST2抗体を投与したところ、コントロール抗体投与群と比較して細胞増殖に有意な違いを認めなかった。一方、カルセイン法によりADCC活性を、 ^{51}Cr 遊離法によりCDC活性を測定したところ、BST2発現子宮内膜癌細胞株では抗BST2抗体によるADCC活性およびCDC活性を認めたが、BST2非発現子宮内膜癌細胞株ではADCC活性およびCDC活性を認めなかった。さらに、2種類のBST2発現子宮内膜癌細胞株をSCIDマウスの皮下に移植したゼノグラフトモデルで、抗BST2抗体はPBSおよびコントロール抗体と比べて、腫瘍の増殖を著しく抑制することが示された ($P=0.01$)。しかし、NOD/SCIDマウスを用いたゼノグラフトモデルでは抗BST2抗体の治療的効果は認められなかった。これらの結果から、抗BST2抗体はNK細胞を介して、子宮内膜癌細胞に対する抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。

〔総括 (Conclusion)〕

膜蛋白にターゲットを絞った定量的プロテオミクス技術により、子宮内膜癌で特異的に発現の上昇している分子として同定したBST2は、子宮内膜癌の新規標的分子となる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

不死化正常子宮内膜細胞株1種類および子宮内膜癌細胞株7種類を用いて、細胞膜蛋白のみを濃縮し、isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) 法により蛋白の網羅的な定量解析を行った。7種類の癌細胞株のうち6種類で、不死化正常子宮内膜細胞株に比べて2倍以上に発現の上昇を認めたbone marrow stromal antigen 2 (BST2)について、さらなる解析を行った。臨床検体を用いた免疫組織化学染色で、正常子宮内膜に比べて、子宮内膜癌組織において有意に発現が上昇していることが明らかになった。さらに、マウス皮下移植ゼノグラフトモデルで、抗BST2抗体は腫瘍の増殖を著しく抑制することが示された。膜蛋白にターゲットを絞った定量的プロテオミクス技術により、子宮内膜癌で特異的に発現の上昇している分子として同定したBST2は、子宮内膜癌の新規標的分子となる可能性が示唆された。

博士（医学）の学位授与に値すると考えられる。