

論 文 要 旨

被包化 HCC 組織と被膜破綻 HCC 組織の

Proteomic Differential Display Analysis

2020年度
北海道医療大学大学院歯学研究科

久 原 啓 資

【緒 論】

がん遺伝子やがん抑制遺伝子の突然変異，エピジェネティクス修飾およびがん組織周囲に存在するとされるがん微小環境内でのタンパク質発現などはがんの発生や浸潤転移に影響を与える．がん微小環境とは，がん組織周囲の細胞および基質の総称である．がん微小環境を構成する間質の中にがん関連線維芽細胞（CAF）があり，CAFは線維芽細胞，上皮細胞，内皮細胞，未分化間葉系細胞などから成っているが，がんとの相互作用について未だに不明な点が少なくない．

肝細胞癌（HCC）は腫瘍の周囲に線維性結合組織による被膜を高頻度に形成することが知られており，被膜はがん微小環境の1つでありCAFを含んでいる．被膜は腫瘍と正常組織の間に存在することから，肉眼的に判別可能であり，がんの微小環境を同定しやすい状態にある．HCCの腫瘍が5 cm以上のサイズの場合，被膜が保持されていると予後良好であり，被膜外浸潤を認めると，5年生存率が低く，被膜の有無が予後予測の重要な因子であると言われている．

近年，悪性腫瘍の診断や治療のターゲットとなるタンパク質を明らかとするために，プロテオーム解析が行われている．HCCの被膜内に存在する微小環境のタンパク質の特徴を観察した報告は僅かであり，その詳細については不明である．

本研究では，肝硬変を伴っていないHCCで，被膜形成群と被膜破綻群のがん微小環境についてプロテオーム解析によって網羅的に比較し，被膜形成に関わる可能性のあるタンパク質を明らかにすることを目的とした．

【材料および方法】

1. 肝細胞癌組織検体

HCC組織はHCV関連HCCと診断され，外科的肝切除術を受け同意を得た患者から採取された．組織はそれぞれの腫瘍組織の辺縁部を中心とした7 mm × 7 mm × 7 mmの大きさで各サンプルから1ヶ所ずつ採取した．採取したHCC組織は，病理組織診断を元に組織周囲の被膜形成群および被膜破綻群の2群に分類した．全ての組織は肝硬変を伴っていなかった．

2. 可溶性タンパク質の抽出

採取した組織をそれぞれ溶解緩衝液で溶解し可溶性タンパク質の抽出を行った．溶解緩衝液でのホモジナイズ後，さらに1時間攪拌し組織を完全に溶解させた．その後，タンパク質溶解液を21,500 ×g，4°Cで30分間遠心分離し，その上清を解析に使用した．

3. プロテオーム解析

1) 二次元電気泳動（2-DE）

2-DEには，各々の検体から抽出した100 μgのタンパク質を使用した．一次元目の等電点電気泳動（Isoelectric focusing : IEF）は，サンプルを200 μLのIEF用緩衝液で溶解し，IPG Stripに添加した．その後IPG Stripを等電点電気

泳動装置の中にセットして IEF を行った。二次元目の Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 電気泳動には、5~20%の直線的な濃度勾配を持つ pre-cast polyacrylamide gel を用いた。

2) 蛍光ゲル染色

2-DE 後、ゲルを超純水で3回洗浄し、40% エタノールと10% 酢酸溶液で2時間振盪して固定し、蛍光ゲル染色で一晩染色した。

3) 画像解析

染色したゲルは ProXPRESS™ 2D Proteomic Imaging System を使用してスポットを検出した。タンパク質発現スポットのレベルを Progenesis SameSpots を用いてゲル毎の定量化を行った。そして Average normalized volumes でスポットの蛍光強度を比較し、有意な発現変化のみられた部位を自動的に検出した。

4) スポットピッキング

ゲルを See Pico™色素で再染色し、2群間で発現が有意に異なるスポットを切り出した。

5) ゲル内消化

切り出されたゲルを60%メタノール、50 mM 重炭酸アンモニウム、5 mM DL-dithiothreitol (DTT) で洗浄した後、See Pico™色素を除去した。ゲルは脱水した後に、10 µg/mL の濃度トリプシンを加えた50 mM 重炭酸アンモニウムと5 mM DTT を含む30% Acetonitrile 中で30°C、再膨潤しながら、ゲル内のタンパク質を消化した。

6) 液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS / MS)

ゲル内消化後のタンパク質スポットのペプチドシーケンスは、QSTAR XL quadrupole time-of-flight mass spectrometer を使用した。タンパク質は、ABSciex MDS Sciex Analyst software と MASCOT MS / MS イオン検索エンジンを用いて識別した。また Uniprot を用いてタンパク質の機能を確認した。

4. ウェスタンブロット分析

プロテオーム解析で有意な発現減弱を認めたタンパク質に対し再現性の確認のためウェスタンブロット分析を行った。15 µg の全細胞溶解物を Mini - PROTEAN TGX Gels 上で電気泳動し、Polyvinylidene Fluoride (PVDF) 膜に転写した。PVDF 膜を5% スキムミルク含有の Tween-20 を含むトリス緩衝生理食塩水 (TBS-T) で、4°Cで一晩ブロッキングした後、3種類のタンパク質に対し、各々の一次抗体 (抗 PCK2 抗体 (rabbit polyclonal, 1:1,000) , 抗 LAP3 抗体 (rabbit polyclonal, 1:1,000) , 抗 PEBP1 抗体 (rabbit monoclonal, 1:1,000)) を用いて4°Cで一晩インキュベートした。次にすべての PVDF 膜に対して、二次抗体 (HRP 結合抗 rabbit IgG (H+L) 抗体 1:10,000) を用いて、室温で1時間インキュベートした。その後、TBS-T で3回洗浄した。次に PVDF 膜を化学発光試薬で2, 3分ほど浸漬し、WSE-6200H LuminoGraph IIで撮影した。その後、Image

Analysis Software CS Analyzer 4 で画像解析し、タンパク質の発現強度を測定した。次に、Loading control として actin の発現を確認した。ストリッピング溶液で 55°C、20 分間温め、強く振盪させて抗体を剥がし、TBS-T での 5 回の洗浄後に、前述同様に 5% スキムミルク含有 TBS-T でブロッキングを行った。TBS-T で 3 回洗浄し、抗 actin 抗体 (rabbit polyclonal, 1:1,000) を加えて一晩 4°C でインキュベートした。TBS-T で 3 回洗浄し、同じ二次抗体を用いて、室温で 1 時間インキュベートした後、同様に撮影を行い、画像解析を行った。

5. 統計分析

1) 2-DE

2-DE 後、ゲル上で検出されたスポット内の蛍光強度を定量化しそれぞれのスポットにおける平均値を比較した。統計処理は ANOVA 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

2) ウェスタンブロット分析

ウェスタンブロット分析で検出したタンパク質の蛍光強度を Image Analysis Software CS Analyzer 4 を用いて数値化した。被膜形成群と被膜破綻群それぞれのタンパク質の蛍光強度を平均化し、得られた値に対し Student の T 検定を行い $p < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果および考察】

1. 2-DE と LC-MS/MS 解析を用いたプロテオーム解析について

2-DE で有意な発現増強または発現減弱を認めたスポットは、14 スポットであった。これらのスポットを LC-MS/MS に供しタンパク質の同定を行ったところ 14 スポットすべてのタンパク質が同定された。被膜破綻群において発現が有意に増強したタンパク質として HSPD1, HSPA1A, HSPA5, HSPA8, HSPA9, EIF5A1, PSMB9, RRBP1, 有意に減弱したタンパク質として PCK2, LAP3, PBLD, PEBP1 の計 12 種類が同定された。発現増強したタンパク質の HSC71 と発現減弱したタンパク質の LAP3 はそれぞれ 2 ヶ所で確認された。

2. ウェスタンブロット分析について

PCK2 と LAP3 は被膜破綻群で、被膜形成群に比べ有意な発現の減弱を認めた。PEBP1 は被膜破綻群で、被膜形成群に比べ発現の減弱を認めたが、有意差はみられなかった。

【結論】

本研究は、HCV 関連 HCC の切除標本の腫瘍辺縁の被膜を含んだ組織に対し、プロテオーム解析で関連するタンパク質を同定し、発現を確認した。有意に発現減弱を認めたタンパク質について、ウェスタンブロット分析で再現性を確認した。被膜破綻群では PCK2 と LAP3 の有意な発現減弱がみられ、これらが HCC の被膜形成に

関与していることが示唆された.