

Expression profile of EFNB1, EFNB2, two ligands of EPHB2 in human gastric cancer

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 片岡, 英樹 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1238

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 385号	学位授与年月日	平成15年 3月26日
氏名	片岡 秀樹		
論文題目	Expression profile of EFNB1, EFNB2, two ligands of EPHB2 in human gastric cancer (ヒト胃癌における EPHB2 のリガンドである EFNB1, EFNB2 の発現について)		

博士(医学) 片岡英樹

論文題目

Expression profile of EFNB1, EFNB2, two ligands of EPHB2 in human gastric cancer

(ヒト胃癌における EPHB2 のリガンドである EFNB1、EFNB2 の発現について)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

チロシンキナーゼは細胞の増殖、分化、発生、形態形成、癌化など非常に多くの重要な生物学的現象に関与している。受容体型チロシンキナーゼの過剰発現は癌の悪性化を導くが、これは過剰発現でチロシンキナーゼ活性が亢進するためと考えられている。受容体型チロシンキナーゼ EPH とそのリガンドである ephrin (EFN) は最大の family であり、神経系のネットワーク形成に重要な役割をもっているが、近年腫瘍の発育、進展における関与が注目されている。以前我々は EPH のサブファミリーである EPHB2 がヒトの上皮由来の様々な腫瘍、特に胃癌において高発現していることを示した (CANCER RES.54, 3645-3650, 1994)。しかしそのリガンドに関しては当時同定されておらず、胃癌との関係については未だ検討されていない。そこで今回我々はヒト胃癌における EPHB2 とそのリガンドである EFNB1、EFNB2 の発現の有無について検討した。

〔材料ならびに方法〕

浜松医科大学附属病院において平成11年から12年にかけて胃癌にて胃切除術を施行された29例の切除標本の癌部、非癌部より組織を採取し、 -80°C に保存。その検体より RNA を抽出後に cDNA を作成。 β -actin、EPHB2、EFNB1、EFNB2 の primer を作成し、 ^{32}P を用いた半定量的 RT-PCR を施行した。更に EPHB2、EFNB1、EFNB2 の変異の有無について PCR-SSCP 法により解析を行った。PCR 条件は 94°C 、45 秒、 59°C 、1 分、 72°C 、1 分とし、 β -actin を 30 サイクル、EPH、ephrin は 35 サイクルで増幅し、最後に 72°C 、10 分の反応を加えた。なおこの条件下で β -actin、EPHB2、EFNB1、EFNB2 に関して、PCR による増幅は exponential phase にあることを確認した。PCR 産物は 6 %PAGE で電気泳動 (150V、90 分) を行った。ゲルは乾燥後、imaging plate に一晚留置し、翌日 autoradiography で画像解析を行った (MacBAS, Fuji Film, Tokyo, Japan)。得られた EPHB2/ β -actin、EFNB1/ β -actin、EFNB2/ β -actin 値は対数変換を行い、Wilcoxon 順位和検定により過剰発現の有無につき有意差検定を行った。

〔結果〕

ヒト胃癌において EPHB2 と EFNB1 は非癌部よりも癌部において有意に高発現していた [EPHB2; 21/29 (72.4%)、 $p=0.01$ 、EFNB1; 21/29 (72.4%)、 $p=0.037$ 、EFNB2; 14/29 (48.3%)、 $p=0.721$]。ヒト胃癌において EPHB2 と EFNB1 が共に非癌部よりも癌部において有意に高発現していた症例は 29 例中 16 例 (55.2%) であった。進行度の観点からみると、進行胃癌のみならず、早期胃癌においても、EPHB2 と EFNB1 の高発現が観察された [早期胃癌: EPHB2; 6/6 (100%)、EFNB1; 4/6 (66.7%)、EFNB2; 3/6 (50%)、進行胃癌: EPHB2; 15/23 (65.2%)、EFNB1; 17/23 (73.9%)、EFNB2; 11/23 (47.8%)]。組織型の観点からみると、EPHB2 は分化型胃癌で良く高発現していたが、EFNB1 は未分化型胃癌で良く高発現していた ($p=0.027$)

[分化型胃癌：EPHB2；10/13(76.9%)、EFNB1；7/13(53.8%)、EFNB2；6/13(46.2%)、未分化型胃癌：EPHB2；9/14(64.3%)、EFNB1；12/14(85.7%)、EFNB2；7/14(50%)]。PCR-SSCP法による解析ではEPHB2に関して数例の遺伝子多型が認められたが、EPHB2、EFNB1、EFNB2に関して腫瘍特異的と思われる遺伝学的変異は認められなかった。

[考察]

受容体型チロシンキナーゼ EPHB2 とそのリガンド EFNB1 は、ヒト胃癌において早期胃癌の段階より高発現しており、その発育進展に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

[結論]

ヒト胃癌において EPHB2 と EFNB1 は非癌部よりも癌部において有意に高発現していた。EPHB2、EFNB1、EFNB2 に関して腫瘍特異的と思われる遺伝学的変異は認められなかった。

論文審査の結果の要旨

受容体型チロシンキナーゼの過剰発現は癌の悪性を招くと考えられている。特に、この型のチロシンキナーゼのひとつである EPH とそのリガンドであるエフリン (EFN) は、神経系の接着性ガイド機構に関与し、正常なネットワークの形成に貢献しているが、腫瘍の成長や増悪化にも関係すると考えられるようになった。実際申請者らは、ラット等の胃癌を含む上皮由来の腫瘍において EPH が高発現していることを示した。そこで、この考え方を検証する目的で、ヒト胃癌切除標本において EPH-B2 とそのリガンドである EFN-B1 や EFN-B2 の発現の有無を調べた。

[方法]

胃癌の治療のために切除された胃標本から、正常部分と癌部分とを取り、RNA を抽出して cDNA を作り、放射性リンを用いて RT-PCR をおこない遺伝子解析をした。PCR による遺伝子増幅をし、指数関数的増加の相にあるときの産物を電気泳動で分離し、泳動パターンから画像処理法によって定量解析した。これにより、EPH-B2、EPH-B1、EFN-B2 の過剰発現の有無を検定した。

[結果]

EPH-B2、EFN-B1 は正常部に比して癌部で高発現していた。高発現していた症例は29例中16例であった。早期胃癌においても EPH-B2 と EPH-B1 の高発現が観察された。EPH-B2 は分化型で、EPH-B1 は未分化型で高発現していた。EPH-B2 に関しては数例の遺伝子多型が認められた。しかし、EPHB2、EFNB1、EFNB2 に関しては腫瘍特異的な遺伝子変異は認められなかった。

[考察]

受容体型チロシンキナーゼである EPH-B2 とそのリガンドである EFN-B1 は、共に、早期の段階から胃癌に高発現していることが明らかになった。このことから、これらの受容体型チロシンキナーゼが、癌の発育や進行と強い関連性を持つことが示唆された。しかし、EPH-B2、EFN-B1、EFN-B2 に関しては腫瘍特有の変化はなかった。

審査委員会は、細胞の分化、発育の制御系に働く受容体型チロシンキナーゼのヒト癌における分布を調べたこと、その種類ごとの実態を調べたことを評価した。

上記のような申請者の論文の示説に対し、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) エフリンはどんな細胞に発現するのか
- 2) エフリンを発現する細胞は、なぜそれ自身とは接着しないのか
- 3) EPH も EFN-A も膜タンパクであるならば、シグナルはどちらの方向へ伝わるのか
- 4) 癌細胞にアンチセンスを入れて EPH の信号を止められるか
- 5) EPH を過剰発現させる方法
- 6) 同一患者で、癌の原発巣と転移巣または内部と表面とでは EPH 発現に差はあったか
- 7) 癌細胞は抗体染色ではどのくらい染め分けられるのか
- 8) リガンドが EFN-A であるときの信号伝達のメカニズム
- 9) EPH のリン酸化状態を認識する抗体について
- 10) EPH の発現量と細胞内のリン酸化量は平行するのか
- 11) EPH を介する信号への中和抗体、アンチセンス、ブロッカーなどの効果について
- 12) EPH の発現の程度と癌の予後との関係、また年齢、性との関連は
- 13) EPH やそのリガンドの治療への応用は

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 寺 川 進
副査 橋 本 賢 二 副査 小 林 浩