



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

メタデータ	言語: Japanese 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	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1238">http://hdl.handle.net/10271/1238</a>

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	<p>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)</p>		

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、 $-80^{\circ}\text{C}$ に保存。その検体より RNA を抽出後に cDNA を作成。 $\beta$ -actin、EPHB2、EFNB1、EFNB2 の primer を作成し、 $^{32}\text{P}$ 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  $94^{\circ}\text{C}$ 、45 秒、 $59^{\circ}\text{C}$ 、1 分、 $72^{\circ}\text{C}$ 、1 分とし、 $\beta$ -actin を 30 サイクル、EPH、ephrin は 35 サイクルで増幅し、最後に  $72^{\circ}\text{C}$ 、10 分の反応を加えた。なおこの条件下で  $\beta$ -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/ $\beta$ -actin、EFNB1/ $\beta$ -actin、EFNB2/ $\beta$ -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化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