



Overexpression of MUC13 is associated with intestinaltype gastric cancer

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2010-10-06 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 島村, 隆浩 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1931

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 5 5 5 号	学位授与年月日	平成 21 年 10 月 16 日
氏 名	島 村 隆 浩		
論文題目	Overexpression of MUC13 is associated with intestinaltype gastric cancer (MUC13 の発現亢進は腸型胃癌に関連する)		

博士(医学) 島 村 隆 浩

論文題目

Overexpression of MUC13 is associated with intestinal-type gastric cancer

(MUC13 の発現亢進は腸型胃癌に関連する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

ムチンは、主に消化管などに発現する分泌型と膜結合型の糖タンパクであり、特に膜結合型ムチンは発癌に関係するとされ、診断や治療のターゲットとされている。また、ムチンファミリーの *MUC13* は大腸癌において発現亢進することは報告されているが、我々は、オリゴヌクレオチドマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析により、胃癌においても *MUC13* が発現亢進することを認めた。そこで、本論文では胃癌での *MUC13* のタンパク発現と臨床病理学的特徴について検討した。

[材料ならびに方法]

定量的PCR法で、胃癌臨床検体での*MUC13*遺伝子発現を検討した。*MUC13*を特異的に認識する抗*MUC13*モノクローナル抗体 (ppz0020、ppz0025) とポリクローナル抗体 (ST0751) を作成し、各々の抗体の抗体結合部位を特定した。この3抗体を用いて、強制発現細胞株と癌細胞株でのppz0020抗体の*MUC13*タンパク特異性を検討した。ppz0020抗体を用いたウエスタンブロット法で胃癌臨床検体での*MUC13*タンパク発現を検討し、共焦点顕微鏡を用いて癌細胞株での*MUC13*タンパクの細胞局在を検討した。ppz0020抗体を用いた組織アレイの免疫組織染色法で、胃癌臨床検体114例での*MUC13*の発現頻度と臨床病理学的特徴を検討し、さらに既存の胃癌粘液形質マーカーである*MUC2*、*MUC5AC*、*MUC6*、*CD10*の染色動態と比較検討した。

[結果]

胃癌臨床検体の定量的PCR法で、*MUC13*遺伝子は5/10例 (50%) で癌部が非癌部に対して2倍以上の発現亢進をしていた。*MUC13*タンパクがO型糖鎖を含む分泌部分と膜貫通部分に分離することは報告されているが、作成した3抗体の抗体結合部位はppz0020抗体が膜貫通部分、ppz0025抗体が分泌部分、ST0751抗体が細胞内部分であった。ウエスタンブロット法においては、ppz0020抗体は強制発現細胞株の*MUC13*タンパクを認識し、癌細胞株でも内在性*MUC13*タンパクを認識することより、ppz0020抗体が内在性*MUC13*タンパクを特異的に認識することを確認した。ppz0020抗体を用いたウエスタンブロット法での胃癌臨床検体の*MUC13*タンパクは5/6例 (83%) で発現亢進した。また、ppz0020抗体を用いた共焦点顕微鏡での癌細胞株における*MUC13*タンパクの局在解析では、*MUC13*タンパクは細胞膜に局在していた。さらに、ppz0020抗体を用いた組織アレイによる免疫組織染色では、正常胃粘膜は染色陰性だが腸上皮化生では9/10例で陽性、胃癌では74/114例 (64.9%) で陽性であった。*MUC13*発現と臨床病理学的特徴との関連を検討したところ、*MUC13*陽性率は分化型胃癌で有意に高かった ($p<0.001$)。また、*MUC13*の染色部位は、分化型胃癌では細胞膜が染色され、未分化型胃癌では細胞質が染色された。さらに、*MUC13*の免疫組織学的な存在は既存の胃癌粘液形質マーカーである*MUC2*、*MUC5AC*、*MUC6*、*CD10*の存在のいずれとも関連しなかった。

[考察]

内在性 MUC13 タンパクを認識する ppz0020 抗体の特異性を検証するために、抗体結合部位の異なる 3 つの抗 MUC13 抗体 (ppz0020, ppz0025, ST0751) を各々作成し比較検討したところ、ppz0020 抗体が膜貫通部分を主に認識する特異性の高い抗体であることがわかった。この抗体による免疫染色で、MUC13 が分化型胃癌と胃癌の前癌病変とされる腸上皮化生で陽性であるが、既知の腸上皮化生マーカーである MUC2 や CD10 の染色部位とは異なっていたことが特筆される。さらに、細胞局在について、MUC13 は分化型胃癌では細胞膜に局在し、未分化型胃癌では細胞質に局在している。これは、未分化型胃癌における MUC13 局在の極性が喪失していると考えられ、MUC13 局在の極性喪失が未分化型胃癌の生物学的性質に関連している可能性も示唆された。

[結論]

MUC13 は、既存の胃癌粘液形質マーカーとは独立して、分化型胃癌で発現亢進するので、新たな胃癌の診断マーカーとなり得る。さらに、MUC13 が胃癌の治療のターゲットになる可能性があることも示唆している。

論文審査の結果の要旨

ムチンは、主に消化管や気道などに発現する糖蛋白である。コア蛋白となる MUC は 21 種類知られており、分泌型と膜結合型とに大別できる。今回の研究対象とした MUC13 は膜結合型ムチンであり、膜貫通ドメインを有している。これら膜結合型ムチンは癌における生物学的意義について多数の報告があるが、MUC13 は大腸癌で発現亢進することは最近報告されたに過ぎない。申請者らはオリゴヌクレオチドマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析により、胃癌においても MUC13 が発現亢進することを認めたので、MUC13 のタンパク発現と臨床病理学的特徴について検討した。

まず、DNA マイクロアレイによって判明した MUC13 の胃癌における発現亢進を確認するために定量的 RT-PCR 法を施行した。次いで、蛋白レベルでの MUC13 の動態を調べるために、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体を作製し、ウェスタンブロット法、免疫組織染色を実施した。抗体の反応性を検討するためのエピトープマッピング、癌細胞株を使用した MUC13 の細胞内局在の検討、さらに組織アレイの免疫組織染色による胃癌臨床検体を用いた MUC13 発現の臨床病理学的検討へと研究を進めた。

胃癌臨床検体の定量的 PCR 法で、MUC13 は 5/10 例 (50%) で癌部が非癌部に対して 2 倍以上の発現亢進をしていた。蛋白レベルでの MUC13 の発現をウェスタンブロット法で調べた結果、複数のバンドが認められたため、作製抗体のエピトープマッピングを行った。その結果、2 種のモノクローナル抗体のうち、ppz0020 抗体は膜貫通部分、ppz0025 抗体は分泌部分、ポリクローナル抗体の ST0751 抗体は細胞内部分を認識していることが判明した。

ppz0020 抗体を用いたウェスタンブロット法により、癌細胞株・胃癌臨床検体で MUC13 蛋白が 5/6 例 (83%) で発現亢進していた。また、ppz0020 抗体を用いて共焦点顕微鏡で癌細胞株を解析したところ、MUC13 タンパクは細胞膜に局在していた。さらに、ppz0020 抗体を用いた組織アレイによる免疫組織染色では、正常胃粘膜は染色陰性だが腸上皮化生では 9/10 例で陽性、胃癌では 74/114 例 (65%) で陽性であった。MUC13 発現と臨床病理学的特徴との関連を検討したところ、MUC13 陽

性率は分化型胃癌で有意に高かった($p<0.001$)。また、MUC13の染色部位は、分化型胃癌では管腔側細胞膜が染色され、未分化型胃癌では細胞質が染色された。これは、既存の胃癌粘液形質マーカーであるMUC2、MUC5AC、MUC6、CD10とは異なる染色態度であり、新規な意義が期待された。

以上のことから、MUC13 が分化型胃癌と胃癌の前癌病変とされる腸上皮化生で陽性であることが明らかとなった。さらに、MUC13 は分化型胃癌では管腔側細胞膜に局在し、未分化型胃癌では細胞質に局在していた。この細胞内局在は、未分化型胃癌におけるMUC13 局在の極性喪失などの生物学的性質との関連も示唆された。

審査委員会では、胃癌における新規な分子である MUC13 の研究を推し進め、分化型胃癌と胃癌の前癌病変とされる腸上皮化生で発現亢進しており、従来の MUC 蛋白とは異なる意義が推察されたこと、さらに新たな分子マーカーとしても期待されることを明らかにしたことを高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) ムチンの役割について
- 2) MUC 遺伝子について
- 3) DNA マイクロアレイについて
- 4) 抗体のエピトープマッピングについて
- 5) ウェスタンブロットの結果解釈について
- 6) mRNA と蛋白の発現について
- 7) MUC13 の機能解析について
- 8) 糖鎖の生物学的意義について
- 9) 胃癌の組織型と MUC13 発現について
- 10) 免疫組織染色による細胞内局在の意味について

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	前川 真人		
	副査	今野 弘之	副査	杉原 一廣