

Immunohistochemical expression analysis of leucine-rich PPR-motif-containing protein (LRPPRC), a candidate colorectal cancer biomarker identified by shotgun proteomics using iTRAQ

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2018-05-08 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 西尾, 朋久 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/3337

博士(医学) 西尾 朋久

論文題目

Immunohistochemical expression analysis of leucine-rich PPR-motif-containing protein (LRPPRC), a candidate colorectal cancer biomarker identified by shotgun proteomics using iTRAQ

(iTRAQ 法によるショットガンプロテオミクスにより同定した大腸がんバイオマーカー候補 LRPPRC の免疫組織化学的発現解析)

論文の内容の要旨

[目的]

大腸がんは世界におけるがんの部位別の死亡者数で 4 番目に位置する罹患者数の多い疾患である。大腸がんの診断、予後予測および治療効果判定に有用なバイオマーカーの確立が治療方法を改善する上で強く望まれている。

我々が研究に用いたショットガンプロテオミクスの一手法である isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ 法)は、細胞や組織におけるタンパク質の発現量の相対比を網羅的に比較できるため、バイオマーカーの探索における強力なツールとなる。そのため有用性が認知されるにつれ、iTRAQ 法によるプロテオーム解析の報告例が増えている。今回、iTRAQ 法を用いて大腸がんの病巣の解析を行い、見出されたタンパク質について免疫組織化学的発現解析を行った。

[方法]

浜松医科大学医学部附属病院第二外科にて摘出された大腸がん 10 症例のがん部およびその近傍の正常組織を採取し、iTRAQ 法による解析を行うまで -80°C で保存した。検体は事前に浜松医科大学の倫理委員会 (23-49)に研究内容を提出し承認された上で、個々の患者からは事前に説明し、同意を得た上で採取した。

最初に iTRAQ 法を用いてプロテオーム解析を行った。がん部および正常組織からタンパク質を抽出してトリプシン消化を行い、ペプチドに断片化した後、それぞれ $m/z = 114$ および 115 のラベルで標識して混合した。混合したサンプルを強陽イオン交換カラムで分画して夾雑物を除去したのち、逆相クロマトグラフィーと接続した質量分析装置によりタンデムマス測定を行い、タンパク質を網羅的に同定するとともに、同時に検出されるラベルのシグナル強度より、各タンパク質のがん部と正常組織における発現量比較解析を行った。発現量比較解析により、正常組織と比較してがん部で高発現していると考えられたタンパク質のうち、これまで大腸がんとの関連が報告されていないタンパク質について免疫組織染色による発現解析を行った。

免疫組織染色は浜松医科大学腫瘍病理学講座においてサンプリングされた大腸がんのホルマリン固定組織に対して行なった。固形がんを直径 5 mm の円柱状にくりぬいた後、 $5\ \mu\text{m}$ の厚さにスライスした薄切片をスライドガラス上に 50 枚並べた組織マイクロアレイを免疫組織染色し、染色強度と病理学的所見との関連を調べた。統計的検定には Mann-Whitney の U 検定を用いた。

[結果]

iTRAQ 法により、合計 570 種類のタンパク質を同定し、このうち、がん部で 1.5 倍以

上高発現している 77 種類のタンパク質の中から、大腸がんの新規腫瘍マーカー候補として leucine-rich PPR-motif-containing protein (LRPPRC)を見出し、LRPPRC の詳細な発現解析を行った。

組織マイクロアレイを用いて大腸がん組織および正常組織 216 サンプルの免疫組織染色を行い、Remmele らの確立した免疫組織染色の評価方法に従って免疫染色強度 (immunoreactive score, IRS)を 0~12 のスコアで数値化し、IRS < 4 を陰性、IRS ≥ 4 を陽性に分類した。その結果、正常組織では 33 % (27/83)のサンプルで陽性であり、IRS の平均は 2.39 であったのに対し、がん部では 98 % (130/133)のサンプルで陽性であり、IRS の平均は 9.99 となり、正常組織と比較してがん部で有意に高値となる傾向が認められた (P 値 < 0.001)。また、高分化がん、中分化がん、低分化がんの IRS の平均はそれぞれ 8.09, 11.22, 9.53 となり、大腸がんの分化度によって IRS に有意差が存在し(P 値 < 0.001)、中分化がんは低分化がんおよび高分化がんと比較して IRS が有意に高くなる傾向が認められた。

[考察]

LRPPRC はミトコンドリアに局在する 130-kDa の RNA 結合タンパク質で、ミトコンドリア DNA にコードされた全遺伝子の mRNA の翻訳調節に関わっており、ミトコンドリアの機能に重要な役割を果たしていると考えられる。

特定のがんでは過酷な条件下で生き残るためにミトコンドリアにおける酸化的リン酸化が亢進していることから、LRPPRC ががんの発達に関与している可能性が示唆される。肺がんやホジキンリンパ腫における LRPPRC のノックダウン解析では、抗アポトーシス能、浸潤能およびコロニー形成能が抑制されるため、LRPPRC が腫瘍形成において重要な役割を果たしていると考えられる。

今回の検討で正常組織と比較してがん部で LRPPRC の発現が高値となったことや、中分化がんは高分化がんと比較して LRPPRC の発現が有意に高くなったことは、LRPPRC が大腸がんの発達に関与していることを裏付ける知見であると考えられた。一方で、低分化がんは中分化がんと比較して LRPPRC の発現が低くなったことは、低分化がんではミトコンドリアを介さない代謝経路(例えば解糖系)が亢進している等の可能性が考えられた。また、LRPPRC の発現レベルが大腸がんの分化度と関連することが明らかとなり、LRPPRC が大腸がんの予後予測マーカーや創薬のターゲット分子になり得ると考えられた。

[結論]

大腸がんおよびその近傍の正常組織を、iTRAQ 法を用いたプロテオーム解析によって比較し、見出されたタンパク質について免疫組織化学的発現解析を行った結果、大腸がんでは発現が亢進し、発現レベルが大腸がんの分化度と関連する新規バイオマーカー候補として LRPPRC を同定した。