

# マイクロアレイ解析とプロテオミクス解析による消化器扁平上皮癌の分子腫瘍マーカーの検索

丹沢秀樹、鶴澤一弘、椎葉正史、小野可苗、嶋田 健、遠藤洋右、笠松厚志、中嶋 大

千葉大学大学院医学研究院 臨床分子生物学

## 要 旨

癌の分子腫瘍マーカーを検索同定することは临床上のさまざまな意義を持つ。例えば、前癌病変の発癌予測、早期癌の発見、癌の悪性度判定（予後予測、微小転移の有無の判定、浸潤度の判定等）、効果的治療法選択（副作用予測、抗癌剤選択、放射線療法の適応と線種の選択等）、癌治療における分子標的・新薬開発などがあげられる。ここでは、特許や論文発表の関係から我々が同定した口腔扁平上皮癌と唾液腺癌の分子腫瘍マーカーのうち、すでに学会や論文で発表したものについてのみ紹介する。

## 【マイクロアレイとプロテオミクス解析による一次スクリーニング】

我々は、機能ゲノム学と共同開発した口腔疾患用マイクロアレイと、ヒト全遺伝子搭載 Affymetrix 社製 GeneChip™ を用いて、mRNA レベルでさまざまな病変や病態の異なる多くの癌、および癌関連疾患における遺伝子の発現プロファイリングを行った。表 1 は複数の口腔扁平上皮癌組織を解析した結果である。

## 【マイクロアレイ解析でピックアップした候補遺伝子の検討と機能評価例－1：Rab1a 遺伝子】

表 1 の結果の中から注目した細胞内タンパク輸送因子（粗面小胞帯からゴルジ装置への輸送を担当）である Rab1a と未だ機能が明確でない C1orf10 遺伝子を代表例として、一次スクリーニング後の分子腫瘍マーカーとしての確認と機能評価法を紹介する。

Rab1a については図 1 に示すように、半定量的 RT-PCR 法、あるいは real time PCR 法により定量的に多くの扁平上皮癌組織中における遺伝子発現量を mRNA レベルで検索した。

扁平上皮癌における Rab1a 遺伝子の発現が正常扁平上皮に比較して著しく高いことが多くのサンプルの RT-PCR 解析で確定したので、次に、抗体を用いて、臨床サンプル中の Rab1a 遺伝子タンパク発現状態を確認した。この際に、Rab1a は細胞中のタンパク輸送を担う因子であるため、発癌過程における細胞内代謝等の変化を捉えるひとつの指標となる可能性があると考え、前癌病変における遺伝子発現状態も検索した。口腔扁平上皮

癌の前癌病変は白板症であるが、多くの白板症は刺激や炎症によってできた反応性のものであり、原因を除去すると消失するものが多い。この点を考慮して、本実験ではあらゆる刺激や炎症を一月以上除去しても消失しない白板症のみを用いた。

図 2 に免疫染色の結果を示す。正常粘膜上皮では染色されず、前癌病変である白板症と扁平上皮癌で強い染色性を示した。この結果を、IHC score により数値化した。図 3 にスコアの算出方法と代表的染色程度見本を示す。

これらのスコアをグラフ上にプロットしたところ図 4 に示すように、正常粘膜上皮と前癌病変・癌との間に、明らかなスコア上の乖離が認められ、Rab1a が癌の腫瘍マーカーのみならず、前癌病変の発癌予測マーカーや早期癌診断マーカーになる可能性が示唆された。現在、臨床材料で発癌マーカーとしての価値を検討している。

## 【マイクロアレイ解析でピックアップした候補遺伝子の検討と機能評価例－2：C1orf10 遺伝子】

表 1 からピックアップした遺伝子の代表例として、癌中で増強した遺伝子から Rab1a 遺伝子を紹介したが、次に遺伝子発現減弱例として C1orf10 遺伝子について紹介する。

図 5 に示すように C1orf10 遺伝子は多くの組織や細胞株において発現が消失、ないしは大幅減弱していることが RT-PCR 法で確認できた。抗体が入手できなかったので、次に細胞内での強制発現による機能解析に移った。

図 6 のように Edycson の系による強制発現を口腔扁平上皮癌由来細胞株 SAS 中で行った。

遺伝子発現用プラスミド構築後、SAS細胞中に遺伝子導入を行い、その発現と、強制発現した際の増殖抑制を図7に示す。

C1orf10 遺伝子は口腔扁平上皮癌における新たな癌抑制遺伝子であることが明らかになった。また、本遺伝子を分子標的とした新たな治療法の開発が期待できる。

このような方法で同定した分子腫瘍マーカーは多数あり、現在、機能評価を行っている。

**【プロテオミクス解析によるスクリーニングにより同定した分子腫瘍マーカー】**

二次元電気泳動法、あるいは Ettan DIGE™ による多色素標識二次元電気泳動法に基づき、正常組織と癌組織で発現量に差が認められたタンパクを質量分析により同定した。図8に二次元電気泳動の結果の例と表2、3に口腔扁平上皮癌において特異的な発現状態を示したタンパクを示した。

この一次スクリーニングによりピックアップしたタンパクについてその抗体が存在する場合には抗体で確認しする(図9)。抗体が存在しない場合にはRT-PCRか real time PCRによりその遺伝子の発現状態を確認する。

この方法で同定した分子腫瘍マーカーの例として正常唾液腺と唾液腺癌の区別、正常扁平上皮と扁平上皮癌の区別、扁平上皮系と腺系の組織の鑑別等に用いることのできる Maspin 遺伝子(図10, 11)と扁平上皮癌でも腺癌でも、癌であるか、正常であるかを鑑別できる Stathmin 遺伝子(図12, 13)を紹介する。

他にも、多くのマーカー候補を同定しているが、その中でも、CDDP 感受性・耐性を染め分けることのできる Caveolin-1(図14)は注目に値する。詳しいことはCDDP 感受性・耐性関連遺伝子の検索の項に譲るが、機能解析が臨床材料により終了し、さらに実際の臨床に大きな役割を果たす可能性があるマーカーであることは特筆に値する。

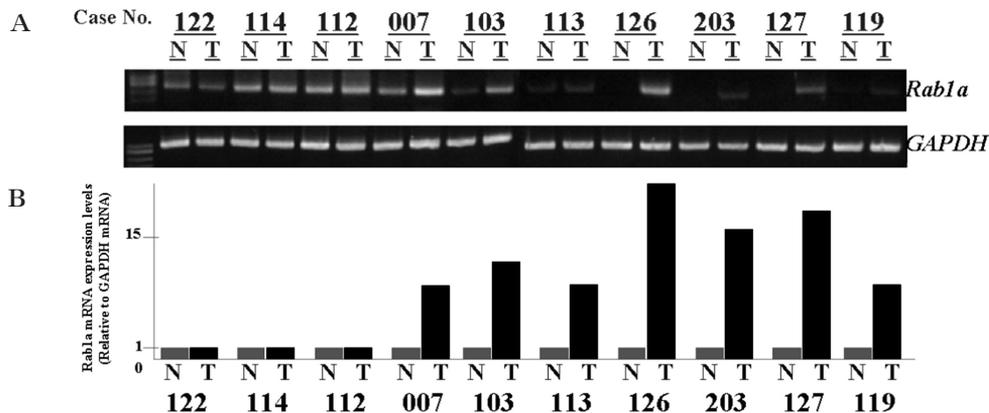


図1. 扁平上皮癌組織中における Rab1a 遺伝子の mRNA 発現量の検討  
A 半定量的 RT-PCR 法 B. real time PCR 法

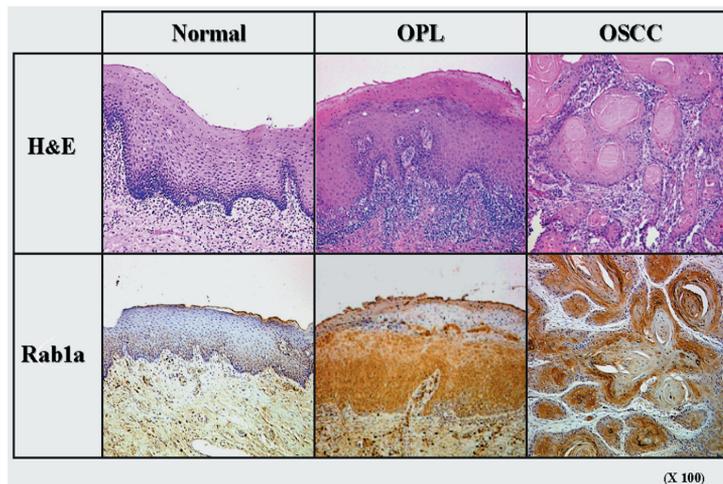


図2. Rab1a の免疫組織染色。左から正常粘膜、白板症、扁平上皮癌

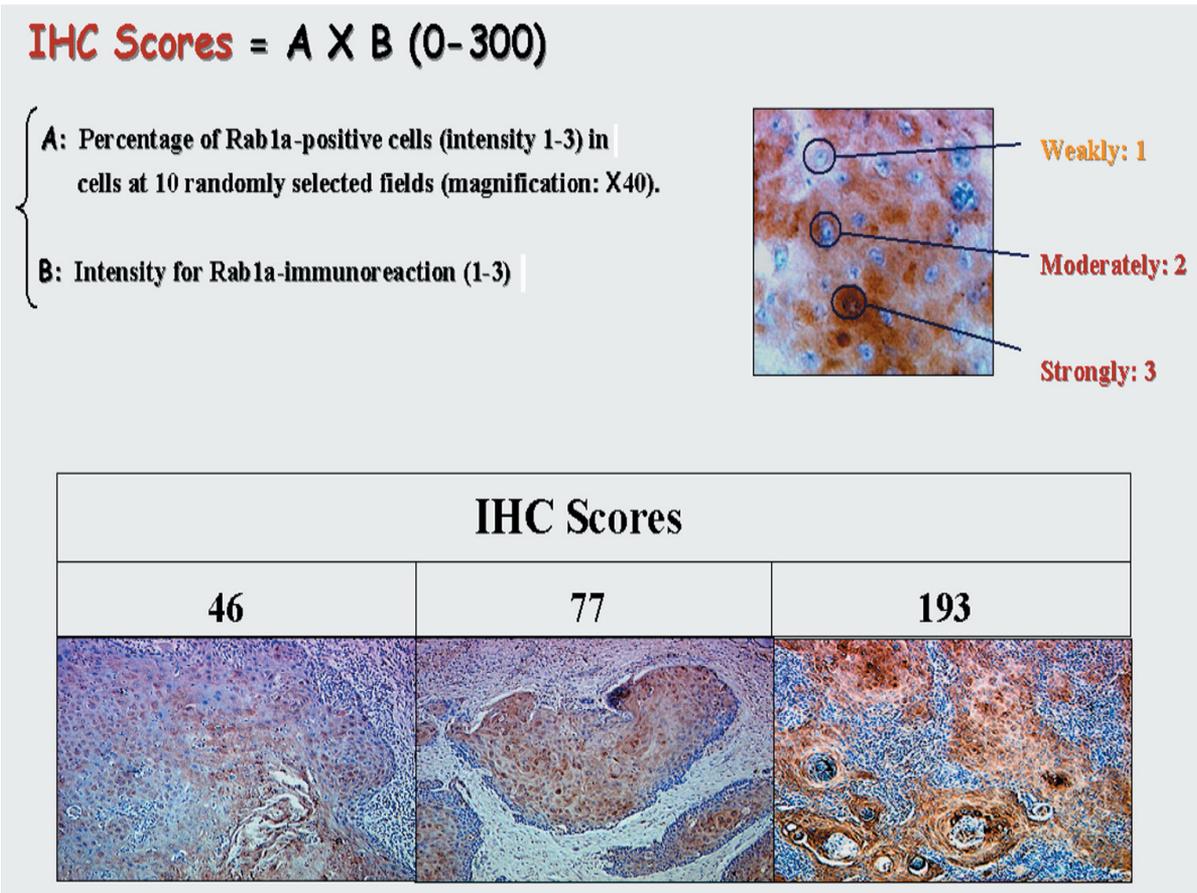


図3. IHC Score 算出法と代表的染色程度見本

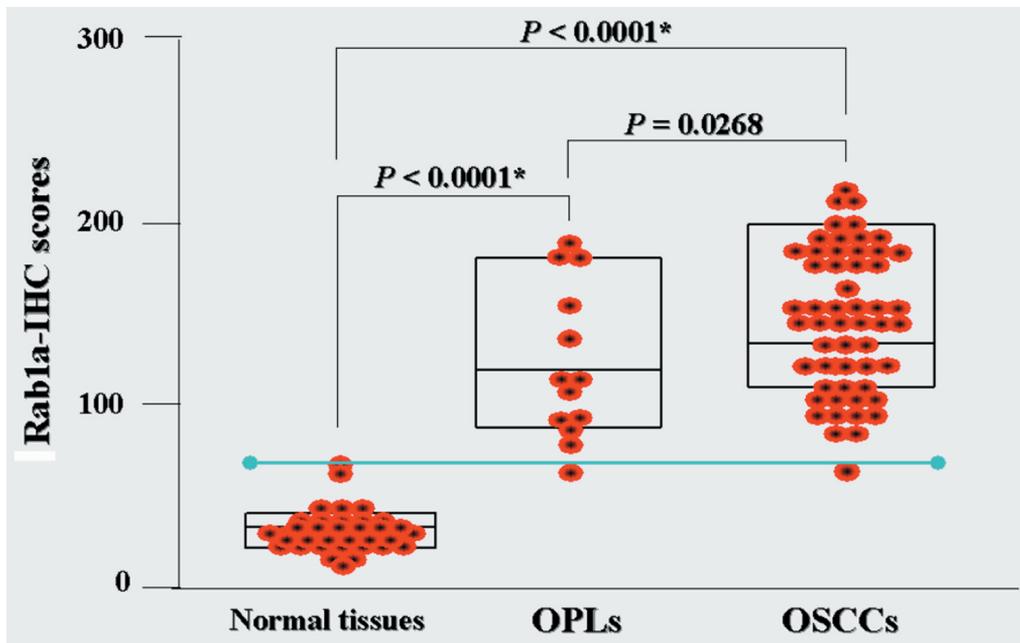


図4. Rab1a の正常粘膜、白板症、癌における IHC score の分布

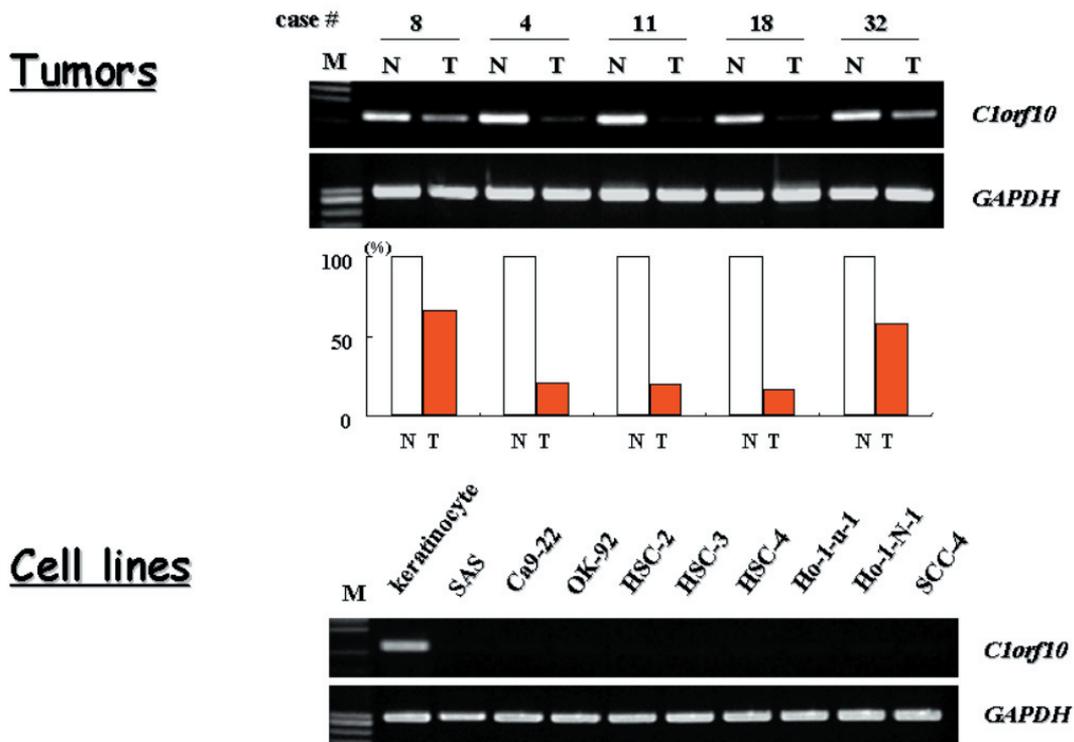


図 5. 口腔扁平上皮癌組織および細胞株における *C1orf10* mRNA の発現減弱状態

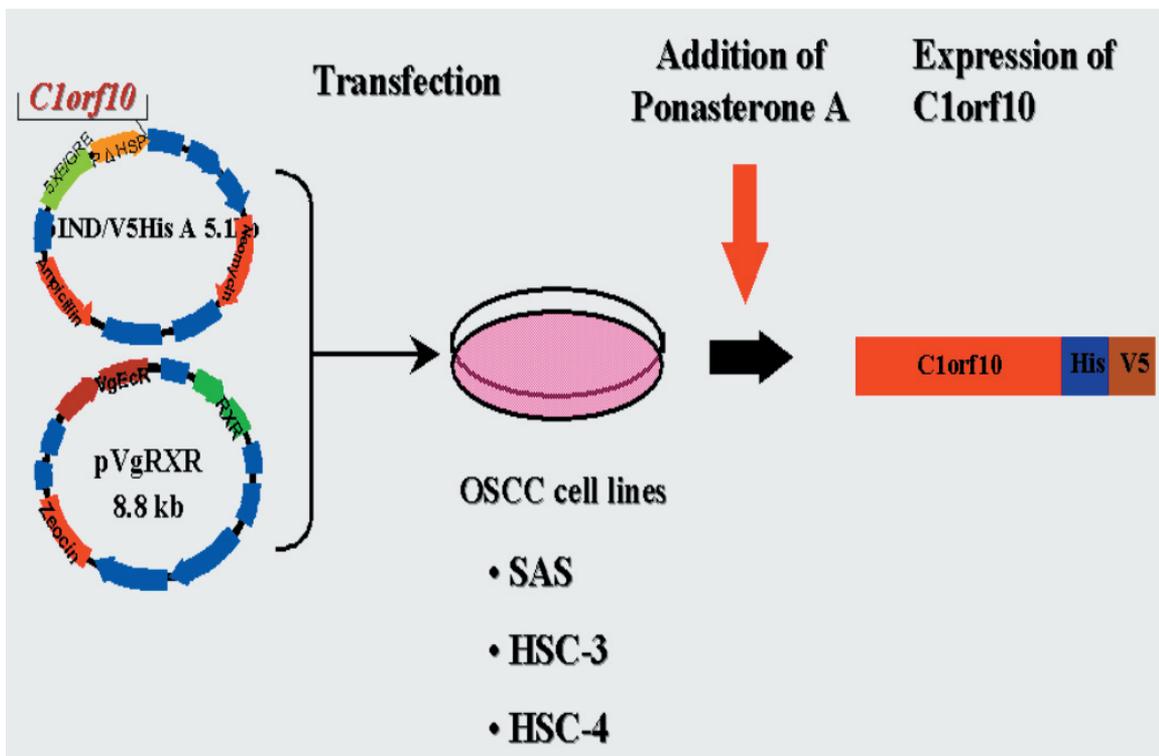


図 6. Edycsone Expression System

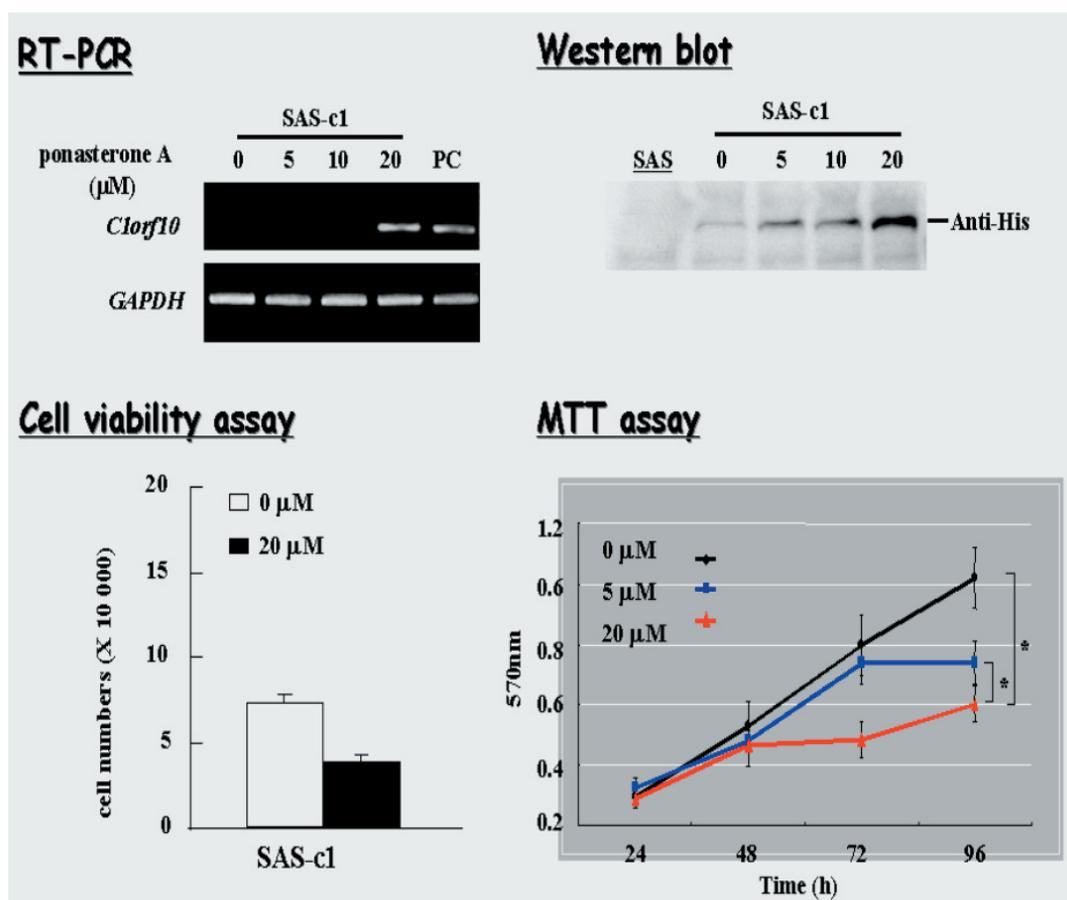


図 7. 口腔扁平上皮癌由来細胞 SAS を用いた Edycsone Expression System による C1orf10 遺伝子の強制発現と増殖抑制

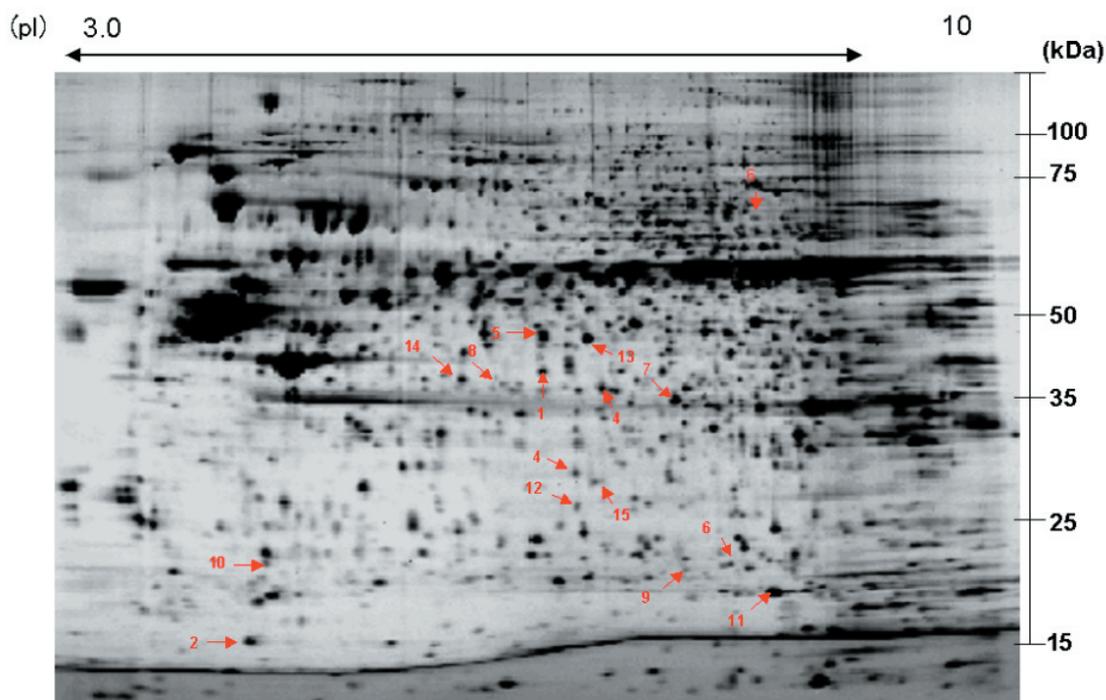


図 8. 口腔扁平上皮癌 二次元電気泳動法の例 (Proteome Map)

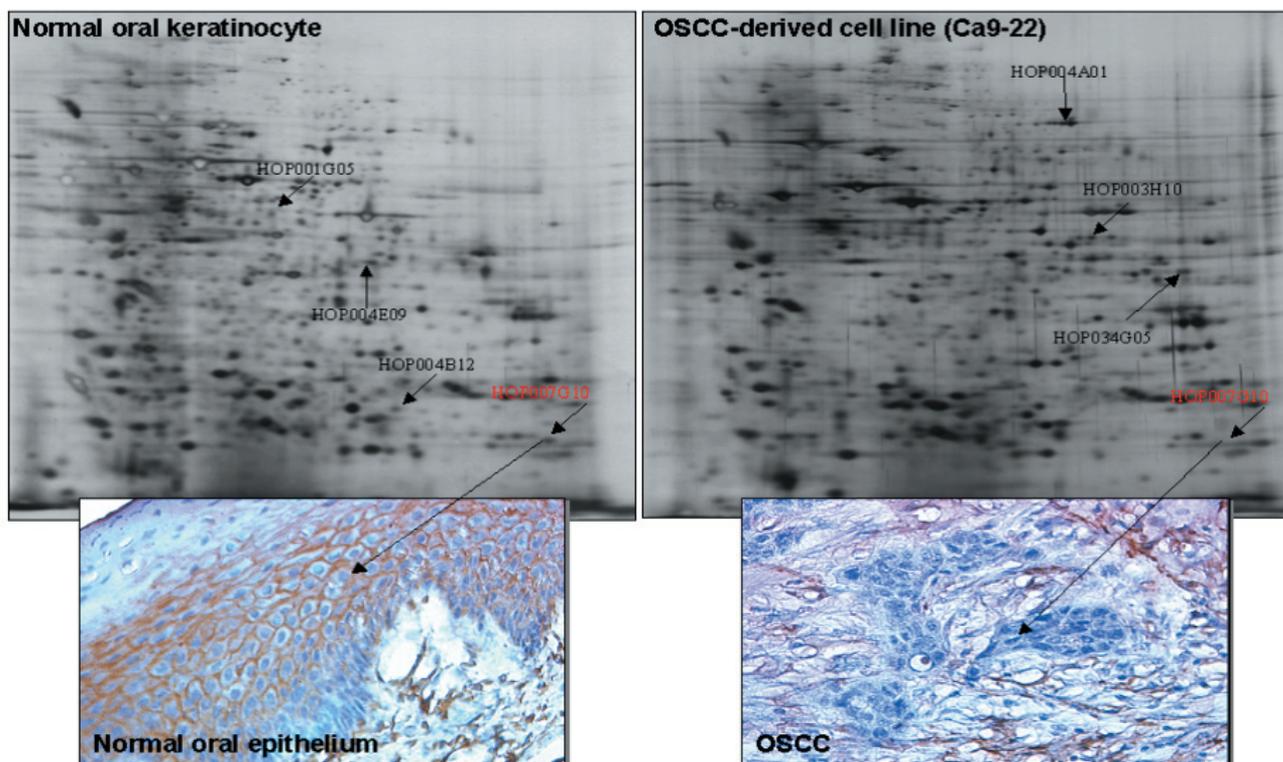
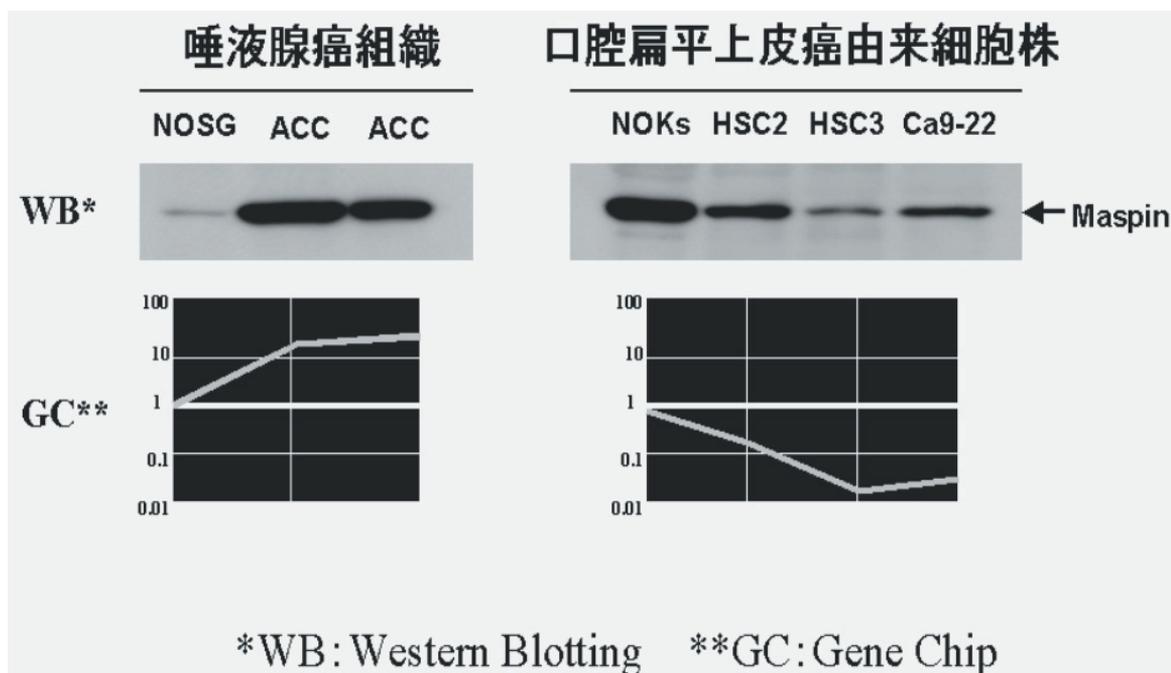


図 9. タンパクの発現プロファイリングと候補タンパクのピックアップ、さらに抗体による確認の 1 例。  
左：口腔正常粘膜上皮、右：口腔扁平上皮癌



\*WB: Western Blotting    \*\*GC: Gene Chip

図 10. 扁平上皮と唾液腺における Maspin タンパク、mRNA 発現状態

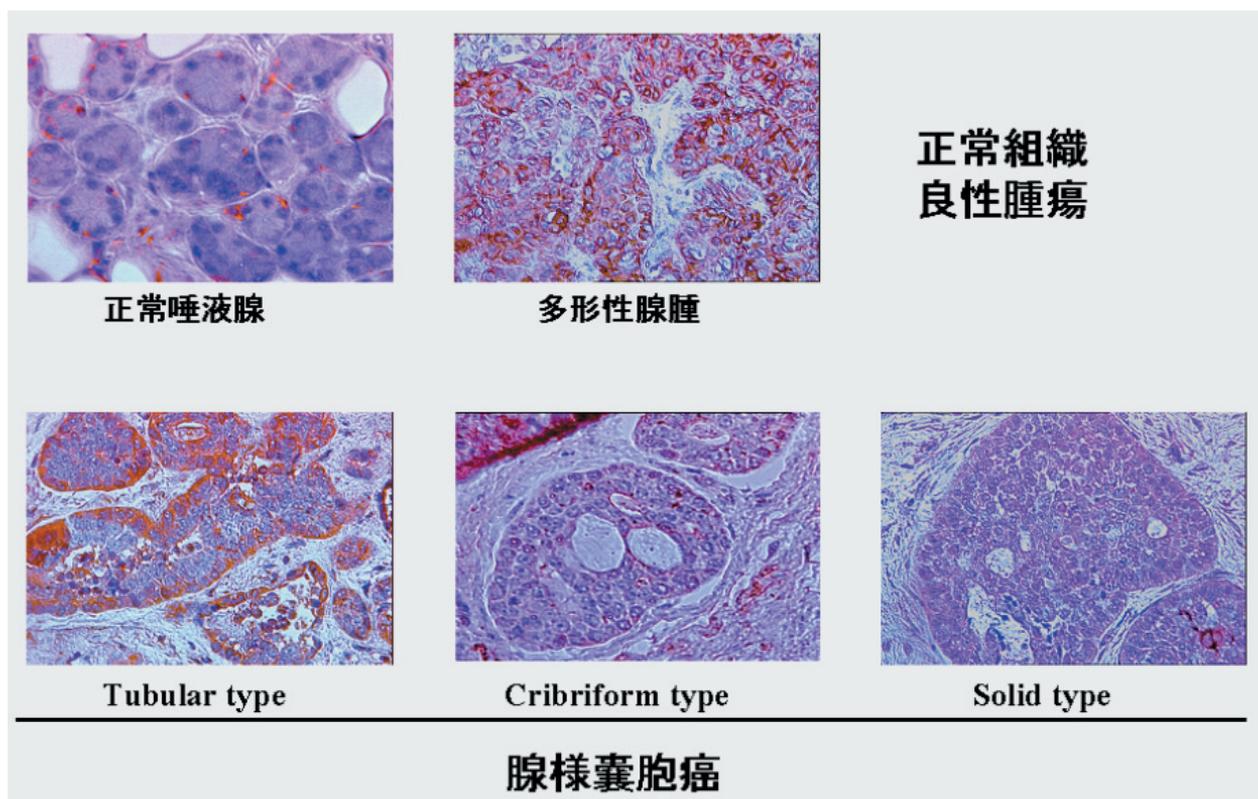
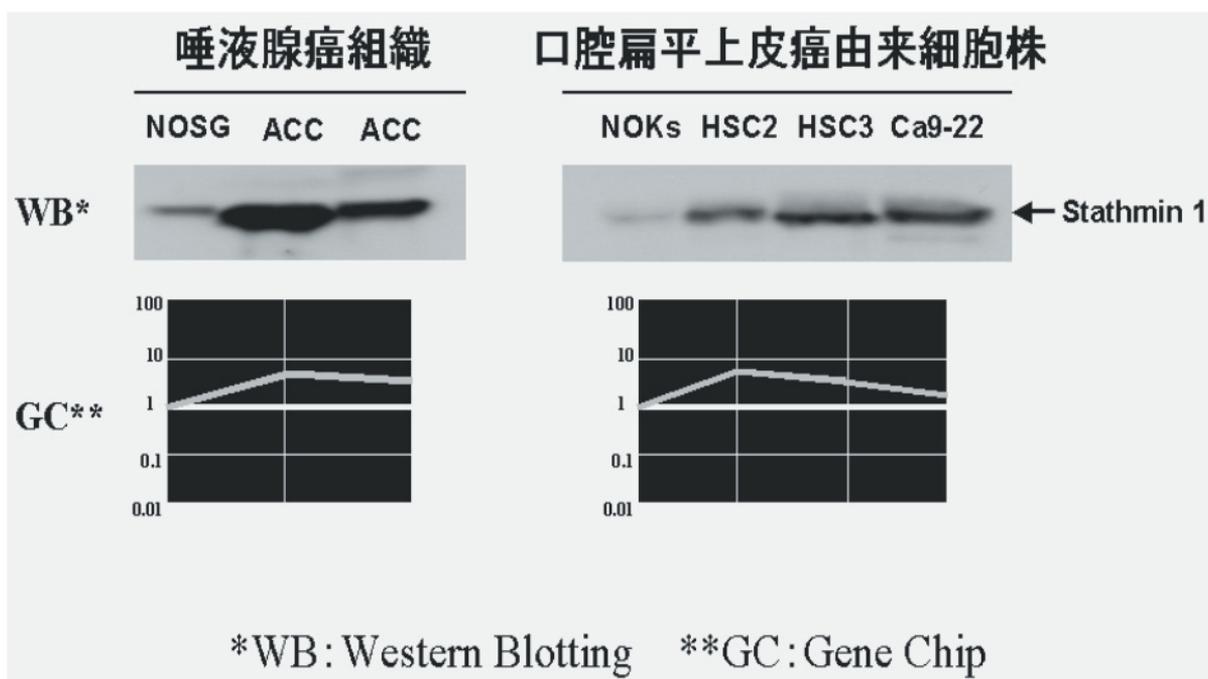


図 11. 免疫組織染色 (Maspin)



\*WB: Western Blotting    \*\*GC: Gene Chip

図 12. 扁平上皮と唾液腺における Stathmin タンパク、mRNA 発現状態

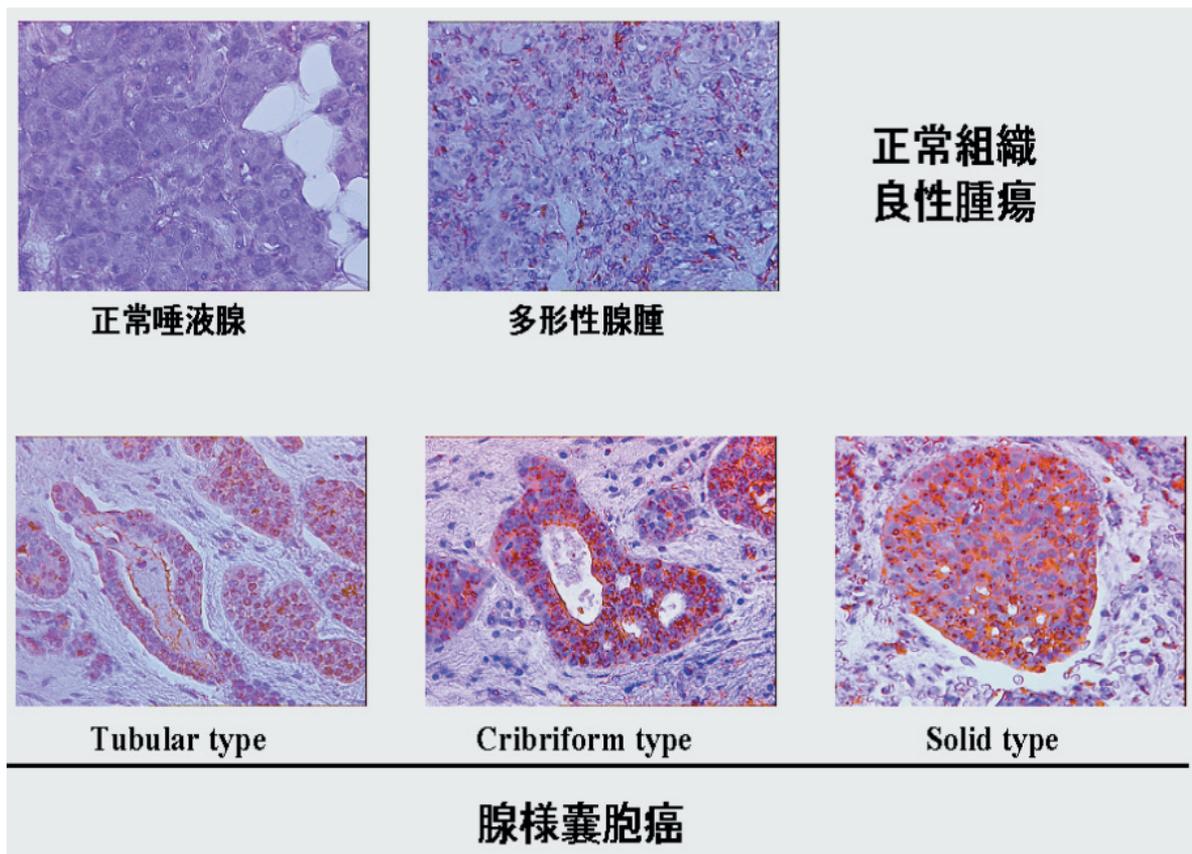


図 13. 免疫組織染色 (Stathmin 1)

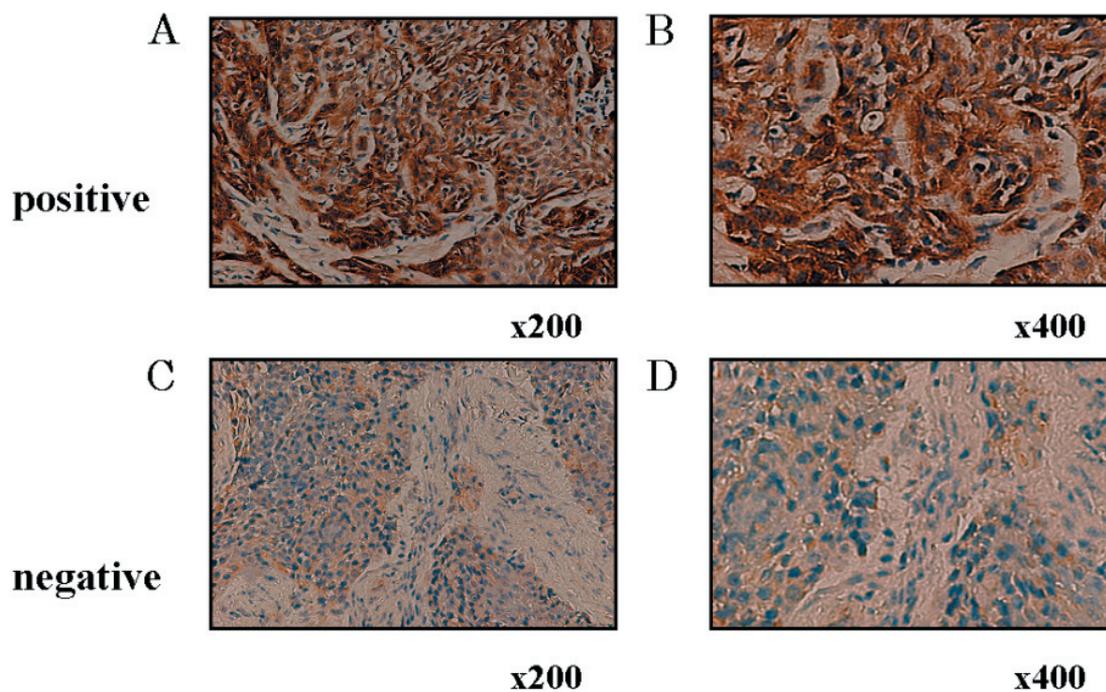


図 14. 免疫染色による Caveolin-1 タンパクの口腔癌組織における発現。抗癌剤 CDDP に対する感受性・耐性が判定できる

表 1. 複数の口腔扁平上皮癌を用いたマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイリングの一例

	Description	Molecular Function	Chr.position
Up-regulated	Hypothetical protein	Unknown	Chr 19
	Immunoglobulin heavy constant mu	Immune system	14q32.33
	KIAA0762	Growth of axons	11p14-p15.2
	Pyruvate kinase	Catalyze phosphoenolpyruvate	15q22
	Immunoglobulin kappa constant	Immune system	2p12
	KIAA0007	Unknown	2p23.2
	C3orf6	Unknown	Chr 3
	DTNBP1	Dystrobrevin binding protein	6p22.3
	Unknown	Unknown	Unknown
	Hypothetical protein MGC33424	Unknown	Unknown
	P4HB	Protein disulfide isomerase	17q25
	Calreticulin precursor	Calciumstrage,transcription co-repressor	19p13.3
	F-actin capping protein $\beta$	Actin biding	1p36.1
	<a href="#">Rab1a</a>	RAB small monomeric GTPase	2p14
ralA biding protein	GTPase activator	18p11.3	
Serine protease inhibitor	serine protease inhibitor	17p13.1	
<b>Down-regulated</b>			
	<a href="#">C1orf10</a>	Unknown	1q21

表 2. 口腔扁平上皮癌において発現が亢進しているタンパク

Spot No.	Protein Description	Common name	PI	MW (kDa)	Eltan Av. Ratio	
					HSC2	HSC3
1	Serin proteinase inhibitor, clade B1	SERPINB1	5.90	42.82	3.99	19.95
2	Interleukin 1 receptor antagonist	IL1RN	4.81	16.36	1.70	3.66
3	Septin 1	SEPTIN1	8.57	42.84	13.1	1.17
4	APG16 autophagy 16-like isoform 3	APG16L	5.56	29.84	10.63	1.49
5	Hypothetical protein FLJ22557	FLJ22557	6.5	48.2	3.94	2.1
6	Lamin A/C	LMNA	6.57	65.15	2.26	2.13
7	Annexin A1	ANXA1	6.40	38.91	1.05	2.86
8	Capping protein, gelsolin-like	CAPG	5.88	38.7	3.69	8.22

表 3. 口腔扁平上皮癌において発現が減弱しているタンパク

Spot No.	Protein Description	Common name	PI	MW (kDa)	Eltan Av. Ratio	
					HSC2	HSC3
9	Sialic acid binding Ig-like lectin 8	SIGLEC8	7.5	45	-5.05	-4.63
10	Chain B, Cathepsin B	CTSB	5.2	22.9	-4.41	-10.63
11	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	SOD2	6.86	22.2	-6.92	-1.88
12	Interferon, alpha 2	IFNA2	6.32	21.9	-4.63	-2.27
13	Ornithine aminotransferase	OAT	6.39	48.8	-1.11	-3.02
14	Serine proteinase inhibitor, clade B, member 5	SERPINB5	5.72	42.5	-2.41	-2.16
15	Enoyl Coenzyme A hydratase 1, peroxisomal	ECH1	8.16	36.1	-1.74	-7.41