

博士(医学) 森田剛文

論文題目

Imaging mass spectrometry of gastric carcinoma in formalin-fixed paraffin-embedded tissue microarray

(質量顕微鏡法による胃癌ホルマリン固定パラフィン包埋ティッシュアレイの解析)

論文の内容の要旨

[はじめに]

癌の病態をより深く理解するためには、遺伝子の情報やその転写産物である mRNA の発現だけではなく、タンパク質や脂質などの変化を知ることが重要とされ、網羅的タンパク質発現解析(proteomics)が注目されている。これまでに proteomics の解析手法として質量分析と2次元電気泳動または液体クロマトグラフィーを組み合わせたり、protein microarrayなどが用いられてきた。しかしながら、これまでに用いられてきた解析方法では、一回の測定で同時に解析できるサンプル数が少ない、またサンプルとして利用できるのは新鮮凍結標本が中心であり、ホルマリン固定標本には対応していない、という欠点があった。一方で、複数の組織標本を解析する目的でティッシュアレイが登場し、免疫組織染色などで利用されている。近年、質量顕微鏡法が開発され、proteomics あるいは metabolomics の領域において欠かせない解析手法となりつつある。質量顕微鏡法ではタンパク質の抽出や特定の抗体などを必要とせず、一回の測定で非常に多くの生体分子を解析することが可能である。本研究では、質量顕微鏡法とティッシュアレイを組み合わせることにより、複数のサンプルを簡便な手技で解析することが可能となった。胃癌ティッシュアレイを解析することで、胃癌特異的あるいは胃癌の分化度に特異的と思われる新規バイオマーカーの同定を試みた。

[材料ならびに方法]

胃癌ティッシュアレイは浜松医科大学附属病院病理部で作成されたサンプルを使用し、その取扱いに関しては浜松医科大学倫理委員会の承認に基づいた病理標本の取り扱い指標に則った。サンプルには高分化型、中分化型、低分化型胃癌の癌部から3か所、非癌部から1か所を採取したものを使用した。胃癌ティッシュアレイから10 μm と1 μm の切片を作成し、各々質量顕微鏡法とHE染色に使用した。組織切片は50 の水槽に浮かべ、スライドガラスに貼り付けて45 で乾燥させた。60 に温めたキシレンに10分間浸し、パラフィンを除いた後で濃度を100%、90%、80%、70%と変化させたエタノールにそれぞれ5分間浸し、再水和した。スライドガラスは55 に温めた湿潤箱で一晩加温した。組織切片上でタンパク質をペプチドの状態に切断するため、島津製作所製の chemical inkjet printer (CHIP-1000)を用いてトリプシンの microspotting を行った。滴下量は1 nl を5サイクル行い、滴下位置の間隔は250 μm とした。滴下後、37 で一晩加温した。マトリックスには2,5-dihydroxybenzoic acid を使用し、エアブラシを用いてスプレー法で行った。質量顕微鏡

法の測定には Applied Biosystems 社製の質量分析装置(QSTAR XL)を使用し、質量電荷比(m/z)の測定範囲は 500-2000、測定間隔は 300 μm とした。イオンイメージ作成には画像変換ソフトの BioMap(<http://www.maldi-msi.org>)を使用した。バイオマーカーの物質同定に関しては、島津製作所製の質量分析装置(AXIMA-QIT)を用いてタンデム質量分析(MS^n)を行った。 MS^n の結果は Mascot search engine (<http://www.matrixscience.com>)で照合した。339 例のティッシュアレイを用いて、Histone H4 の免疫組織染色を行った。統計解析には SAS Institute 製の統計ソフト(Stat View)を使用した。

[結果]

これまでの質量顕微鏡法に関する報告では、新鮮凍結標本と比較してホルマリン固定標本では信号ノイズ比(S/N)が低下する、とされていたが m/z 2000 以下では十分なシグナルが得られた。合計で 72 個のシグナルが検出され、54 個は癌に特異的なシグナル、18 個は癌と非癌部で共通のシグナルと思われた。54 個の癌特異的なシグナルの内、17 個は組織学的分化度に特異的なシグナルだった。癌と非癌部で共通なシグナルとして検出された m/z 976.4 は MS^2 解析の結果 actin であることが判明した。また低分化型癌に特徴的なシグナルとして検出された m/z 1325.6 は MS^2 解析の結果 Histone H4 であることが判明した。質量顕微鏡法の解析結果を確認するために、339 例の胃癌ティッシュアレイを用いて Histone H4 の免疫組織染色を行ったところ、高分化型または中分化型と比較して低分化型において強く染色されることが明らかとなった。

[考察]

本研究では、多くの施設で入手可能なホルマリン固定標本を用いて新たな胃癌特異的なバイオマーカーの候補物質を見出すことができた。本解析手法の利点としては、複数のサンプルを同時にかつ短時間で解析でき、複数のバイオマーカーを検出できるということが挙げられる。これまで proteomics で用いられてきた、2 次元電気泳動や protein microarray では同時に 2 検体しか解析できず、ティッシュアレイを用いた免疫組織染色では 1 回の実験で数種類のタンパク質までしか解析できない。本研究では、非癌部に特異的なシグナルが検出できなかったが、これは正常組織が粘膜、筋層、脂肪組織や結合織など様々な成分から構成されているためと考えられた。低分化型癌で Histone H4 が特異的なシグナルとして検出された理由に関しては、細胞あたりの Histone H4 が増加しているというよりは、Histone H4 がイオン化されやすい状態、また抗体が反応しやすい状態を反映していると思われる。DNA が Histone に巻き付いてクロマチンが形成されるが、クロマチンの状態は細胞内でダイナミックに変化している。これまでに、低分化型胃癌ではクロマチンリモデリング複合体の構成因子である Brm の発現が低下しているという報告もあり、エピジェネティックな変化が今回の結果に繋がっている可能性があると思われた。

[結語]

質量顕微鏡法による胃癌ホルマリン固定パラフィン包埋ティッシュアレイの解析により、低分化型胃癌の新たなバイオマーカー候補を同定した。質量顕微鏡法とティッシュアレイの特性を組み合わせることで、非常に有用な解析手法となる。

論文審査の結果の要旨

近年質量顕微鏡法は、proteomics や metabolomics の領域で重要な解析手法となりつつある。申請者はこれを用い胃癌ティッシュアレイを解析することで、胃癌特異的あるいは胃癌の分化度特異的な新規バイオマーカーの同定を試みた。

胃癌ティッシュアレイは本学附属病院病理部で作成された検体を、本学倫理委員会の承認に基づき使用した。高分化型、中分化型、低分化型胃癌の癌部 3 か所、非癌部 1 か所よりなる検体切片 (10 μm 厚) を前処理後、chemical inkjet printer を用いた microspotting によるトリプシン処理及びエアースプレー法によるマトリックス (2, 5-dihydroxybenzoic acid) 添加処理し、質量顕微鏡法に供した。

ホルマリン固定標本では新鮮凍結標本に比し信号ノイズ比が低いとされていたが m/z 2000 以下では十分な信号が得られた。合計 72 個の信号が検出され、54 個は癌に特異的、18 個は癌と非癌部で共通の信号と考えられた。前者の内、17 個は組織学的分化度特異的で、 MS^2 解析の結果そのうちの一つは Histone H4 であることが判明した。また後者のうちの一つは actin であることが判明した。この解析結果を確認するため行った 339 例の胃癌ティッシュアレイの免疫組織染色では、低分化癌において Histone H4 の強い染色が確認できた。これより申請者は、低分化型癌では Histone H4 が増加しているか、クロマチンリモデリングがダイナミックに変化し Histone H4 がイオン化されやすい状態にあるとした。

審査委員会では、質量顕微鏡法による胃癌ホルマリン固定パラフィン包埋ティッシュアレイの解析により、低分化型胃癌の新たなバイオマーカー候補を同定し、本法が有用な解析手法であることを初めて実証した点を高く評価した。

以上により、本論文は博士 (医学) の学位の授与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 浦野 哲盟
副査 峯田 周幸 副査 竹原 康雄