

論文内容要旨

Identification of novel transmembrane proteins in scirrhous type gastric cancer by *Escherichia coli* ampicillin secretion trap (CAST) method: TM9SF3 participates in tumor invasion and serves as a prognostic factor

(CAST法を用いた新規スキルス胃癌特異的膜蛋白質の同定:TM9SF3は癌の浸潤に関与し、予後因子となる)

Pathobiology, 2014, in press.

主指導教員：安井 弥 教授

(基礎生命科学部門 分子病理学)

副指導教員：田代 聡 教授

(原爆放射線医科学研究所 細胞修復制御)

副指導教員：大上 直秀 准教授

(基礎生命科学部門 分子病理学)

Htoo Zarni Oo

(医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻)

胃癌の罹患者数のうち、約 6 割をアジアの国が占めており、本邦においても頻度の高い悪性腫瘍である。特に、スキルス胃癌は極めて進行が早く、発見時に臨床病期が進行している症例が多いこと、高頻度に腹膜播種転移を生じることから、五年生存率は他の胃癌と比較して著しく低い。したがって、スキルス胃癌における分子基盤をより詳細に解析し、新たな治療・診断法の確立が急務である。一方、癌特異的に発現し、分泌・膜蛋白質をコードする遺伝子を新規に同定することは、癌の新しい診断法・治療法の開発に重要である。*Escherichia coli* ampicillin secretion trap (CAST) 法は、分泌蛋白質をコードする遺伝子が持つシグナルシーケンス、または膜蛋白質をコードする遺伝子が持つ膜貫通ドメインと呼ばれる配列が存在することを応用した方法であり、分泌・膜蛋白質をコードする遺伝子を効率的に同定できる。本研究では、CAST 法を用いて、スキルス胃癌特異的に発現する膜蛋白質の新規同定を試みた。

外科的に切除されたスキルス胃癌組織 2 サンプルから抽出した Total RNA を用いて、CAST library を作製し、CAST ベクターに挿入、アンピシリン耐性コロニー各々 1440 に対してシーケンスを行った。得られたシーケンス結果に対し BLAST および GeneCards を用いて解析を行い、48 種類の分泌蛋白質および 130 種類の膜蛋白質を同定した。

スキルス胃癌組織から同定された遺伝子と、過去に解析した正常胃粘膜組織の CAST library から同定された遺伝子を比較した結果、42 種類の候補遺伝子がリストアップされた。この中で、スキルス胃癌組織でクローン回数が最も多かった遺伝子として Transmembrane 9 superfamily member 3 (TM9SF3) を同定した。定量的 RT-PCR 法を用いた解析では、正常 13 臓器（肝臓、腎臓、心臓、大腸、脳、骨髄、骨格筋、肺、小腸、脾臓、脊髄、胃、白血球）における TM9SF3 の発現レベルはいずれも低く、9 症例の胃癌組織で高発現が認められた。さらに、多数例の胃癌組織を材料に行った定量的 RT-PCR 法では、227 例中 63 例(28%)の胃癌組織において TM9SF3 の高発現を認めた。

91 例の胃癌ホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いて TM9SF3 の免疫染色を行った。TM9SF3 の発現は 91 例中 46 例(50%)の症例で認められ、早期胃癌、進行胃癌のいずれにおいても、表層部から深部にかけて存在する癌細胞に広範

に認められた。染色パターンの多くは細胞膜であったが、一部細胞質にも認められた。TM9SF3 の発現と臨床病理学的因子との相関を検討したところ、未分化型の胃癌 ($p = 0.0213$)、深層浸潤 ($p = 0.0065$)、リンパ節転移($p = 0.0101$)や TNM ステージ ($p = 0.0065$)との間に統計学的に有意な相関が認められた。未分化型の胃癌の中でスキルス胃癌と非スキルス胃癌を分けた場合、スキルス胃癌において TM9SF3 の有意な発現上昇 ($p = 0.0156$)が認められた。

TM9SF3 の発現と胃癌術後予後との関連については、TM9SF3 の陽性例は陰性例と比較して統計学的に有意に ($p = 0.0130$)予後不良であった。スキルス胃癌症例の中でも、TM9SF3 陽性例は陰性例と比較して予後不良の傾向にあった ($p = 0.0695$)。さらに、胃癌組織 227 例を用いた定量的 RT-PC 法による解析では、スキルス胃癌症例に絞った場合、TM9SF3 の発現レベルと胃癌術後予後との間に有意な相関が見られた ($p = 0.0231$)。

胃癌細胞における TM9SF3 の機能を明らかにする目的で、9 種類の胃癌細胞株 (MKN-1, 7, 28, 45, 74, TMK-1, KATO-III, HSC39, 57)における TM9SF3 の発現レベルを確認し、さらに TM9SF3 の発現と腫瘍の浸潤能、増殖能との相関に関しては、それぞれ MTT assay、Cell invasion assay で検討を行った。胃癌細胞株 9 種類中 2 種類(MKN-28, HSC-39)で高い TM9SF3 の発現が認められた。このうち、MKN-28 に対して siRNA を用いて TM9SF3 をノックダウンしたところ、未処理の細胞と比較して浸潤能が有意に抑制された。細胞増殖能に関しては有意な差は認められなかった。

以上の結果より、TM9SF3 はスキルス胃癌で発現しており、癌細胞の浸潤に関与していることが示唆された。また、TM9SF3 は胃癌の予後不良因子であることが示された。(1956 字)