

3. 肝細胞癌のプロテオミクス

藏満保宏・中村和行 (山口大・医・生化学第 1)
 横山雄一郎・沖田 極 (同上・内科学第 1)
 高島元成・岡 正朗 (同上・外科学第 2)
 飯塚徳男 (同上・生体防御)
 戸田年総 (東京都老人研)

【目的】 肝細胞癌 (HCC) は、我が国における癌による死因の中で上位を占めており、年間死亡者数は 32,000 人を越している。その特徴は C 型肝炎ウイルス (HCV) の持続感染に伴う慢性肝炎や肝硬変がその発生源となる点である。我国には約 200 万人の HCV キャリアが存在すると推定されており、HCC 死亡者の約 8 割が HCV 感染に由来していると考えられ、我国で HCC 対策を考える際には HCV 感染との関係が重要となる。今回、我々は HCV(+) HBV(-) HCC の癌部と非癌部の組織を用いて二次元電気泳動 (2DE) と質量分析によるプロテオーム解析を行ったので紹介する。

【方法】 山口大学医学部にて肝切除が施行された 21 例の HCV(+) HBV(-) HCC の癌部と非癌部組織を、患者の同意を十分に得た後に供与された。組織中のタンパクを NP-40、PMSF、NaF、EDTA、NaCl、leupeptin、aprotinin を含んだ 50mM Tris-HCl 緩衝液中でホモジナイズして抽出し、15,000g で 30 分間遠心した上清を試料として用いた。試料は尿素、CHAPS、DTT を含む Immobiline polyacrylamide gel (IPG) 用緩衝液中で調製し、タンパク量 300 μ g を含む試料液を IPG ストリップを用いて 500 V で 1 時間、1,000 V で 1 時間、8,000 V で 2 時間通電した等電点電気泳動を行った。平衡化後、IPG ストリップを 12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いた水平式 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動装置を用いて泳動した。癌部と非癌部組織でのスポットの発現を二次元画像解析ソフト (PDQUEST) を用いて比較した。両組織での発現に差が見られるスポットを切り出し、トリプシンによるゲル内消化の後、MALDI-TOF/MS を用いた Peptide Mass Fingerprintin (PMF) にてタンパクの同定を行なった。

【結果】 肝細胞癌組織の中で非癌部と比較して癌部での発現が 2 倍以上増強しているタンパクが 10 種類 (α tubulin、ATP synthase beta chain、glutamine synthetase、GRP 75、GRP 78、HSC 71、HSP 60、HSP 70.1、phosphoglycerate mutase1、Trioisophosphate isomerase)、減弱しているタンパクが 9 種類同定された。癌部での発現が増強しているタンパクのうち GRP 75、GRP 78、HSC 71、HSP 70.1 の四つは HSP 70 ファミリーに属しており、liver glutamine synthetase (GS) は、高分化型癌組織に特に高頻度で発現しており、分子量 42,000、等電点が 6.4-6.8 の異なる 3 つのスポットとして確認されたので、Post Source Decay (PSD) 分析に

よって詳細に解析した結果、GS の 320 番目と 322 番目の 2 つのセリン残基がリン酸化されることが強く示唆された。

【まとめ】 2DE と質量分析を用いたプロテオーム解析によって、HCV(+) HBV(-) HCC の癌部において発現が増強する 10 種類のタンパクと、発現が減弱する 9 種類のタンパクが同定できた。HSP 70 ファミリーに属する GRP 75、GRP 78、HSC 71、HSP 70.1 の癌部での発現が増強していることから HCV(+) HBV(-) HCC の発癌と HSP 70 ファミリーとの関連性が示唆された。また、GS は高分化型癌組織に特に高頻度で発現し、分子多様性を示した。PMF における PSD 分析から 320 番目のセリン残基と 322 番目のセリン残基がリン酸化されることによって分子多様性が生じることが示唆された。

【文献】

- 1) Takashima, M., Kuramitsu, Y., Yokoyama, Y., Iizuka, N., Toda, T., et al, Proteomic profiling of heat shock protein 70 family members as biomarkers for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. : *Proteomics* (in press).
- 2) Kuramitsu, Y., Toda, T., Yokoyama, Y., Takashima, M., Iizuka, N., et al, Proteomic analysis for hepatocellular carcinoma tissues from patients infected with hepatitis C virus -posttranslational modification of liver glutamine synthetase- : (submitted).
- 3) Yokoyama, Y., Kuramitsu, Y., Takashima, M., Iizuka, N., Toda, T., et al, The down-expression proteins in human hepatocellular carcinoma with proteomic analysis by 2-dimensional electrophoresis. : (in preparation).
- 4) Iizuka, N., Oka M, Yamada-Okabe H, Nishida, M., Maeda, Y., et al, Oligonucleotide microarray for prediction of early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. : *Lancet* 2003; 361 (9361): 923-929.
- 5) Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, Mori N, Tamesa T, et al, Differential gene expression in distinct virologic types of hepatocellular carcinoma: association with liver cirrhosis. : *Oncogene* 2003; 22(19): 3007-3014.