

悪性黒色腫におけるゲルソリン短縮体の発現と 腫瘍浸潤度との関連

学位論文内容の要旨

ゲルソリンはアクチンの重合・脱重合をコントロールする代表的なアクチン調節蛋白質で、細胞質に存在し、アクチン線維を切断して断端に結合することでアクチンファイバーの伸長を阻害する一方で、アクチン重合開始の核となる。ゲルソリンは、細胞の形態や運動のみならず、分化や癌化にも関与しており、ヒトの胃癌、膀胱癌、乳癌、肺非小細胞癌の細胞株や手術摘出腫瘍の半数から全例でゲルソリンの発現が低下ないし消失が見られ、正常ゲルソリン遺伝子にはヒトの癌の増殖を抑制する作用があることも示されている。悪性黒色腫は、色素産生細胞（メラノサイト）由来の悪性腫瘍で、Clarkにより提唱された真皮内への腫瘍浸潤度（レベル）及びBreslowにより提唱された腫瘍の厚さにより分類される原発腫瘍の進行度（pT）は5年生存率と明らかに相関している。悪性黒色腫については、すでにいくつかの癌抑制遺伝子の異常について報告されているが、ヒト悪性黒色腫におけるゲルソリンの発現に関する報告はない。今回ヒト皮膚悪性黒色腫の原発組織ならびに転移組織38検体におけるゲルソリンの発現をウエスタン法で調べた。

正常皮膚組織と比べ、悪性黒色腫検体における90KDaの野生体ゲルソリンの発現の低下や消失は認めなかった。しかし90KDaの野生体ゲルソリンのバンドの他に、約5KDa軽いバンドが、悪性黒色腫検体38例中30例で野生体ゲルソリンのバンドと同程度の強度で発現しており、このゲルソリン交差蛋白質を本文では以下p85という記号で呼ぶ。一方、有棘細胞癌では野生体ゲルソリンの発現の低下や、悪性黒色腫で認められるp85の出現を見なかった。病理診断にて悪性化が認められなかった色素性母斑におけるゲルソリンの発現をウエスタンプロットで調べたところ、色素性母斑7例中2例にp85が発現していた。

悪性黒色腫検体のうち原発巣の陽性率は75.8%（25/33）で、原発巣に関する臨床事項（腫瘍切除時の年齢差・性差・腫瘍浸潤度・腫瘍の厚さ・病期分類（pT））とp85の発現の有無に有意差が有るかどうかを調べた。原発性悪性黒色腫におけるp85の陽性群と陰性群とでは年齢差を認めず、p85の陽性例は女性に多い結果であった。p85の陰性群は表皮内黒色腫が殆どであったため、表皮内黒色腫を含む腫瘍浸潤度と原発巣の病期分類（pT）ではp85の陽性群と陰性群とで有意差を認めたが、表皮内黒色腫を含まない腫瘍の厚さの分類では、p85の陽性群と陰性群とで有意差を認めなかった。さらに腫瘍浸潤度がレベルIとレベルII以上のグループ間でFisherの直接法による検定を行うと、p85

の陽性率に有意差を認め ($p < 0.001$)、レベル II 以上の厚さでは p85 の陽性率が有意に上昇することが判明した。水平増殖期の一部が垂直増殖期に移行し、色素斑の中に腫瘍が存在する原発巣（腫瘍浸潤度レベル IV、腫瘍の厚さ 4.0mm、病期分類 pT4）では、水平増殖期の部位から採取された検体に比べ、垂直増殖期の部位から採取された検体での p85 の発現が強く見られた。再発・転移巣の p85 の陽性率は 100% (5/5) であった。

p85 の一次構造を正常のゲルソリンの一次構造と比較するため、抗原認識部位の異なる 4 つの抗ヒト・ゲルソリン抗体で p85 が検出されるかどうかを調べた。4 つの抗体のうち、ゲルソリンの N 末端を認識する N-18 と内部を認識する GS-2C4 が p85 を認識し、C 末端を認識する Clone2 と C-20 が p85 を認識しなかった。このことから p85 は、正常のゲルソリンの C 末端が欠失した蛋白質と考えられた。実際に p85 のアミノ酸の配列を N 末端、C 末端で調べた。p85 の N 末端アミノ酸配列 VVEHPEFLKAGKEPGLQ は野生体ゲルソリンの N 末端の 18 番目までのアミノ酸配列に一致した。p85 の C 末端配列 YIET は、リシン(K)エンドペプチダーゼにより分解された p85 の、C 末端フラグメントの N 末端から解読された。この配列は野生体ゲルソリンのアミノ酸配列の 679 番目から 682 番目に一致した。従って p85 の C 末端は、野生体ゲルソリンのアミノ酸配列の 682 番目のトレオニン (T) から 696 番目のバリン (V) のいずれかで終了する C 末端の欠失した短縮体であることが判明した。

野生体ゲルソリンの C 末端には、 Ca^{2+} 結合部位があり、この部位によりゲルソリンのアクチン線維の切断作用は Ca^{2+} により調節されている。p85 の一次構造が野生体ゲルソリンの C 末端の欠失した短縮体であったことから p85 の働きを類推すると、 Ca^{2+} の制御を逸脱してアクチン線維を切断する分子である可能性が高い。垂直増殖期の黒色腫細胞が容易に浸潤・転移する性質に、ゲルソリンの C 末端の短縮体による細胞骨格の無秩序な切断作用が関係していると推測する。また p85 の発生機序は、その一次構造が野生体ゲルソリンの C 末端の欠失した短縮体であったことから、1) 悪性黒色腫組織内で活性が高まっている酵素により、野生体ゲルソリンが C 末端で特異的に切断、消化されて生じたフラグメントである、2) 悪性化したメラノサイトでゲルソリンの mRNA の異常なスプライシングが生じている、という二つの可能性がある。1) の可能性に関しては、本研究において解明された p85 の C 末端配列 YIET が、野生体ゲルソリンの配列に一個所存在する Caspase 8 の切断部位の配列 : IETD/X に重なっていることから、p85 は Caspase 8 によって野生体ゲルソリンが切断されて生じた可能性がある。今回、悪性黒色腫検体における Caspase 3 と Caspase 8 の発現をウエスタンブロットにより調べたところ、活性化型 Caspase 3 のバンドがみられない一方で、Caspase 8 の中間型フラグメントのバンドを種々の程度で認め、このバンドの発現の強さが p85 のバンドの発現の強さと平行するデータを得ており、今後この可能性をさらに追求する必要がある。一方 2) に関しても、ヒトの癌でゲルソリン遺伝子の変異や mRNA の異常なスプライシングはまだみつかっていないが、p85 の発生機序に関してゲルソリンの mRNA の異常なスプライシングが生じている可能性は否定できない。

本研究の臨床的意義は、ゲルソリン短縮体 p85 の発現が皮膚原発悪性黒色腫の腫瘍の浸潤度（レベル）ならびに原発腫瘍の進行度（pT）との間で相関がみられた点にある。原発腫瘍の進行度（pT）は、予防的リンパ節廓清や術後化学療法施行の是非を決定するうえで最も重要な要素である。検体からの蛋白抽出・ウエスタンブロットによる p85 の

検出は、通常の病理組織診断と比較して時間と熟練を要さないことから、この p85 ゲルソリン短縮体の検出が、病理組織学的評価の補助として有用であると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 杉 原 平 樹
副 査 教 授 細 川 眞 澄 男
副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

悪性黒色腫におけるゲルソリン短縮体の発現と 腫瘍浸潤度との関連

本研究は、ヒト皮膚悪性黒色腫の原発組織ならびに転移組織 38 検体におけるゲルソリンの発現をウエスタン法で調べたものである。当初予想された悪性黒色腫検体における 90KDa の野生体ゲルソリンの発現の低下や消失は認めなかった。しかし 90KDa の野生体ゲルソリンのバンドの他に、約 5KDa 軽いバンドが、悪性黒色腫検体 38 例中 30 例で野生体ゲルソリンのバンドと同程度の強度で発現しており、このゲルソリン交差蛋白質 p85 がヒト皮膚悪性黒色腫組織においてどのような意義を持つ分子であるかを研究の目的に据えたものである。

最初に抗原認識部位の異なる 4 種類の抗体を用いてウエスタン法を行ったところ、4 つの抗体のうち、ゲルソリンの N 末端を認識する N-18 と内部を認識する GS-2C4 が p85 を認識し、C 末端を認識する Clone2 と C-20 が p85 を認識しなかった。このことから p85 は、正常のゲルソリンの C 末端が欠失した蛋白質と考えられた。実際に p85 の一次構造について調べたところ、p85 の N 末端アミノ酸配列 VVEHPEFLKAGKEPGLQ が野生体ゲルソリンの N 末端の 17 番目までのアミノ酸配列に一致した。p85 の C 末端配列 YIET は、リシン(K)エンドペプチダーゼにより分解された p85 の、C 末端フラグメントの N 末端から解読された。この配列は野生体ゲルソリンのアミノ酸配列の 679 番目から 682 番目に一致した。従って p85 の C 末端は、野生体ゲルソリンのアミノ酸配列の 682 番目のトレオニン (T) から 696 番目のバリン (V) のいずれかで終了する C 末端の欠失した短縮体であることが判明した。

悪性黒色腫 38 検体のうち原発巣の陽性率は 75.8% (25/33) で、再発・転移巣の p85 の陽性率は 100% (5/5) であった。原発巣に関する臨床事項 (腫瘍切除時の年齢差・性差・腫瘍浸潤度・腫瘍の厚さ・病期分類 (pT)) と p85 の発現の有無に有意差があるかどうかを調べた。表皮内黒色腫を含む腫瘍浸潤度と原発巣の病期分類 (pT) では p85 の陽性群と陰性群とで有意差を認めた。さらに腫瘍浸潤度がレベル I とレベル II 以上のグループ間で検定を行うと、p85 の陽性率に有意差を認め、レベル II 以上の厚

さでは p85 の陽性率が有意に上昇することが判明した。水平増殖期の一部が垂直増殖期に移行し、色素斑の中に腫瘍が存在する原発巣（腫瘍浸潤度レベル IV、腫瘍の厚さ 4.0mm、病期分類 pT4）では、水平増殖期の部位から採取された検体に比べ、垂直増殖期の部位から採取された検体での p85 の発現が強く見られた。

本研究の公開発表にあたって、副査の加藤教授より、検出手技に関する質問とゲルソリン短縮体 p85 を用いた予後予測の試みについての質問があった。これに対し、申請者はゲルソリン短縮体 p85 の検出手技をより詳細かつ明確に解説し、ゲルソリン短縮体 p85 が悪性黒色腫症例の予後の判定因子や選択的リンパ節廓清施行の判断材料として用いられうる旨を解答した。次いで副査の細川教授よりゲルソリン短縮体 p85 の発生機序についての質問があった。これに対し、申請者は、近年明らかになりつつ有る悪性黒色腫のアポトーシス抵抗性の機序にふれ、ゲルソリン短縮体 p85 が、Caspase8 によって野生体ゲルソリンが切断されて生じた可能性が高いと解答し、その具体的な根拠として、野生体ゲルソリンの配列に一個所存在する Caspase 8 の切断部位の配列：IETD/X とゲルソリン短縮体 p85 の C 末端配列が重なっている事実を挙げた。さらに主査の杉原教授よりゲルソリン短縮体 p85 の働きについての質問があった。これに対し、申請者は、ゲルソリン短縮体 p85 は Ca^{2+} の制御を逸脱してアクチン線維を切断する分子である可能性が高いと答え、その根拠として野生体ゲルソリンの C 末端には Ca^{2+} 結合部位があり、この部位が欠失するとゲルソリンのアクチン線維の切断作用が Ca^{2+} 非依存性となる事実を挙げた。いずれの質問に対しても、申請者は学位論文の背景に関する詳細な説明と最新の知見を交えて概ね適切に解答した。

この論文は、ゲルソリン短縮体を発見したことにより審査員一同に高く評価された。ゲルソリン短縮体 p85 は、皮膚原発悪性黒色腫の病理組織学的評価の補助として有用であるだけでなく、病因の解明にも重要な研究であり、今後ゲルソリン短縮体の発生機序解明が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併わせ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。