

学位論文題名

DARPP-32 expression arises after a phase of dysplasia in oesophageal squamous cell carcinoma

(DARPP-32は食道扁平上皮癌の癌化過程における
上皮異型期より後に発現する)

学位論文内容の要旨

背景と目的

DARPP-32(dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein)は、プロテインキナーゼ A (PKA)によりリン酸化されてプロテインフォスファターゼ 1 (PP 1)活性を抑制するリン酸化蛋白であり、主に脳内におけるドーパミンのシグナル伝達に重要な役割をもつとされる遺伝子であるが最近、胃腺細胞の癌化にその isoform である t-DARPP とともに強く関与しているとの報告がなされた。そこで申請者は、食道扁平上皮癌における DARPP-32 および t-DARPP の関連性を明確にした上で患者の予後との相関をも明らかにすることを目的に本研究を行った。

対象および方法

まず、食道扁平上皮癌細胞における DARPP-32 ならびに t-DARPP の mRNA および蛋白の発現を確認するため、食道扁平上皮癌細胞株 7 株(TE2, TE5, TE8, TE10, TE13, HEC46, SGF7)を使用した。TRIZOL により各細胞株から Total RNA を抽出し、SUPERScript II および Oligo dt を用いて、PCR 法で cDNA を作製し、各細胞株 cDNA を半定量 PCR 法によりその発現の差を比較検討した。具体的には DARPP-32 sense primer (5'-GAAGATCCAGTTCTCGG-3'), antisense (5'-ACTTAGTGCTGGGTCTTCC-3'), t-DARPP sense primer (5'-GTTCCGGCTCTCAGAGCA-3'), antisense (5'-ACTTAGTGCTGGGTCTTCC-3')を用いて、94℃ (30sec)/53℃ (30sec)/72℃ (30sec)を 30cycle 行った。なお、Internal control および Positive control は β Actin と DARPP-32 および t-DARPP 発現 vector を用いた。次に同様の検討を食道扁平上皮癌切除症例 7 症例の組織検体にても行った。蛋白の抽出は RIPA buffer および PMSF, Aprotinin を用い、タンパク量 40 μ g にて一次抗体を Anti-DARPP polyclonal 抗体 (x1000)、二次抗体を Anti-rabbit IgG 抗体 (x5000) とし蛋白発現を評価した。Internal control および Positive control は β Actin(10 μ g)と DARPP-32 および t-DARPP 発現 vector を遺伝子導入した TE8 細胞株の蛋白(2 μ g)を用いた。さらに 1989 年から 1999 年に北海道大学付属病院ならびに腫瘍外科関連施設において、根治切除された術前未治療の食道扁平上皮癌 122 例につき免疫染色を施行した。切除された食道癌における最深部切片において、Anti-DARPP polyclonal 抗体を一次抗体としピオチン化 2 次抗体、DAB を用い免疫染色を施行したが、122 例の内訳は、男性 105 例、女性 17 例、平均年齢

62.3 歳(38-82 歳)であり、平均観察期間は 29 ヶ月であった。細胞質における染色有無により発現群(+)、非発現群(-)に分類し、臨床病理学的所見、予後との相関を比較検討した。統計解析は、chi-square test ならびに Fisher's exact test を用いた。生存率は Kaplan-Meier を用いて算出し、Log rank にて比較検討した。

結果

食道扁平上皮癌細胞株において、DARPP-32 の mRNA ならびに蛋白発現を TE2, TE13, HEC46, SGF7 の 4 株(57.1%)に認め、特に TE2, TE13 にて強発現を認めた。t-DARPP の発現は、いずれの細胞株でも認められなかった。組織検体において、食道扁平上皮癌 7 検体中 4 検体(57.1%)に DARPP-32 の発現が認められたが、正常粘膜 7 検体ではいずれも発現は認められなかった。t-DARPP の発現はいずれの部位でも認められなかった。免疫染色では、DARPP の染色は細胞質に認められ、発現群は 37 例(30.3%)、非発現群 85 例(69.7%)であった。DARPP の発現と背景因子との間には有意な相関は認めなかった。一方、Pathological stage($p=0.0284$), pT($p=0.0438$), pN($p=0.0303$)および腫瘍径($p=0.0115$)と有意な逆相関を認めた。また、122 例中 45 例に dysplasia を認めたが DARPP の発現が確認されたのは 1 例のみであった($p<0.0001$)。生存期間に関しては、DARPP 発現群は非発現群に比較して有意に長かった($p=0.0453$)。

考察

DARPP-32 ならびに t-DARPP は胃腺細胞の癌化に関与しているとの報告がある。まず申請者は、食道扁平上皮癌細胞株の 57.1%においても DARPP-32 が発現していることを確認した。さらに食道扁平上皮癌切除検体においても 57.1%の癌組織に DARPP-32 の発現が認められ、DARPP-32 発現および非発現食道扁平上皮癌があることを確認した。t-DARPP の発現は細胞株ならびに切除検体において認められなかったことから、免疫染色により染色された蛋白は t-DARPP ではなく DARPP-32 であると考えられた。DARPP-32 を発現する食道扁平上皮癌は、非発現のものより転移・浸潤傾向が少ないと考えられ、さらに正常扁平上皮から異型上皮に変化する過程以後に発現するものと考えられた。

まとめ

今回の検討では、食道扁平上皮癌の癌化過程において t-DARPP より DARPP-32 が関与している可能性があり、さらに DARPP-32 の発現は癌化過程における上皮異型期より後に発現することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 近 藤 哲

学 位 論 文 題 名

DARPP-32 expression arises after a phase of dysplasia in oesophageal squamous cell carcinoma

(DARPP-32は食道扁平上皮癌の癌化過程における
上皮異型期より後に発現する)

DARPP-32(dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein)は、プロテインキナーゼ A (PKA)によりリン酸化されてプロテインフォスファターゼ 1 (PP 1)活性を抑制するリン酸化蛋白質であり、胃腺細胞の癌化にその isoform である t-DARPP とともに強く関与しているとの報告がなされた。今回申請者は、食道扁平上皮癌における DARPP-32 および t-DARPP の関連性を明確にした上で患者の生存期間との相関をも検討した。

まず、食道扁平上皮癌細胞における DARPP-32 ならびに t-DARPP の mRNA および蛋白質の発現を確認するため、食道扁平上皮癌細胞株 7 株(TE2, TE5, TE8, TE10, TE13, HEC46, SGF7) ならびに食道扁平上皮癌切除腫瘍 7 腫瘍の組織検体を使用した。なお、Internal control および Positive control は β actin と DARPP-32 および t-DARPP 発現 vector を用いた。次に食道扁平上皮癌細胞株 7 株につき蛋白質を抽出、一次抗体を Anti-DARPP polyclonal 抗体、二次抗体を Anti-rabbit IgG 抗体とし Western blot にて評価した。Internal control および Positive control は β actin と DARPP-32 および t-DARPP 発現 vector を遺伝子導入した TE8 細胞株の蛋白質を用いた。さらに 1989 年から 1999 年に北海道大学附属病院ならびに腫瘍外科関連施設において、根治切除された術前未治療の食道扁平上皮癌 122 腫瘍につき Anti-DARPP polyclonal 抗体を一次抗体としビオチン化 2 次抗体、DAB を用い免疫染色を施行した。細胞質における染色の有無により発現群、非発現群に分類し、臨床病理学的所見、予後との関係を比較検討した。統計解析は、chi-square test ならびに Fisher's exact test を用いた。生存率は Kaplan-Meier 法を用いて算出し、Log rank 法にて比較検討した。

結果は、食道扁平上皮癌細胞株において、DARPP-32 の mRNA ならびに蛋白質発

現を TE2, TE13, HEC46, SGF7 の 4 株(57.1%)に認め、特に TE2, TE13 にて強発現を認めた。t-DARPP の発現は、いずれの細胞株でも認められなかった。組織検体において、食道扁平上皮癌 7 検体中 4 検体(57.1%)に DARPP-32 の発現が認められたが、正常粘膜 7 検体ではいずれも発現は認められなかった。t-DARPP の発現はいずれの部位でも認められなかった。免疫染色では、DARPP-32 の染色は細胞質に認められ、発現群は 37 検体(30.3%)、非発現群 85 検体(69.7%)であった。DARPP-32 の発現と背景因子との間には有意な相関は認めなかった。一方、Pathological stage($p=0.0284$), pT($p=0.0438$), pN($p=0.0303$)および腫瘍径($p=0.0115$)と有意な逆相関を認めた。また、122 検体中 45 検体に dysplasia を認めたが DARPP-32 の発現が確認されたのは 1 検体のみであった($p<0.0001$)。生存期間に関しては、DARPP-32 発現群は非発現群に比較して生存期間が長かった($p=0.0453$)。

食道扁平上皮癌細胞株の 57.1%においても DARPP-32 が発現していることを確認した。さらに食道扁平上皮癌切除検体においても 57.1%の癌組織に DARPP-32 の発現が認められ、DARPP-32 発現および非発現食道扁平上皮癌があることを確認した。t-DARPP の発現は細胞株ならびに切除検体において認められなかったことから、免疫染色により染色された蛋白は t-DARPP ではなく DARPP-32 であると考えられた。DARPP-32 を発現する食道扁平上皮癌は、非発現のものより転移・浸潤傾向が少ないと考えられ、さらに正常扁平上皮から異型上皮に変化する過程以後に発現するものと考えられた。

口頭発表において、副査浅香教授より食道扁平上皮癌において胃癌とは違い DARPP-32 が異型上皮期以後に発現してくる意義について、また DARPP-32 が発現している食道扁平上皮癌細胞株の悪性度についての質問があった。ついで副査近藤教授より免疫染色において DARPP-32 発現陽性群と陰性群を 10%で分けた理由について、また染色頻度の分布が 2 峰性を示すかどうかについての質問があった。主査秋田教授から病期を限定した場合も DARPP-32 の発現が予後に関与しているのかどうか、また DARPP-32 と RCAS1/Caveolin1 との関連性についての質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をした。

食道扁平上皮癌における多段階発癌について本研究の意義は大きく、また DARPP-32 の新しいバイオマーカーとしての臨床的有用性も高く、審査員一同協議の結果、申請者が博士(医学)の学位授与に値するものと判定した。