



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Validation of histological diagnostic methods for detecting endothelin B receptor expression [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	福田, 直也
Description	配架番号 : 2066
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11194号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55521
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Naoya_Fukuda_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 福田 直也

学 位 論 文 題 名

Validation of histological diagnostic methods for detecting
endothelin B receptor expression
(Endothelin B receptor の発現を評価する適切な組織学的診断手法の確立)

【背景と目的】 浸潤性膵管癌（以下、膵癌）は極めて予後不良で治療困難な癌のひとつである。膵癌に対する唯一の効果的な治療法は外科的切除である。補助療法としての化学療法や免疫療法の研究開発が進められているが、未だに臨床的な有用性は十分とは言えない。膵癌の予後不良因子を検索する目的で、われわれは外科切除切片を用いた免疫組織学的解析を行ってきた。その中で、膵癌において腫瘍浸潤 T リンパ球の存在は有意な予後良好因子であることを示した。最近、腫瘍血管内皮における Endothelin B receptor（以下、ETBR）の過剰発現が抗腫瘍免疫を抑制する働きを示すことが卵巣癌において報告された。すなわち、ETBR が T 細胞の腫瘍への誘導を阻害し、腫瘍浸潤リンパ球を減少させる機序により、予後不良となると考えられている。しかしながら、これまで ETBR の発現を評価した報告は、客観的で再現性のある陽性・陰性組織対照に基づいた至適条件で施行されたものではなく、ETBR 発現の意義やその予後に関する影響に関して統一した見解が得られていなかった。今回、ETBR 発現の検出に必要な免疫組織染色の至適条件を確立し、膵癌患者における ETBR 発現を客観的に評価することを目的として、本研究を行った。

【対象と方法】

（Ⅰ）ETBR 遺伝子発現系の作成

サブクローニングおよびトランスフェクション：PCR 法により増幅し作製した ETBR cDNA をベクター（pcDNA3.1(+)-IRES-GFP）にサブクローニングし、pcDNA3.1(+)-ETBR-IRES-GFP を得た。これを 293FT 細胞へトランスフェクションすることで Transfectant cell [293FT (pETBR)] を作成し、客観的な陽性対照とした。同様に上記から ETBR cDNA のみを除いた Transfectant cell [293FT (pGFP)] を陰性対照とした。その後、4 種類の抗 ETBR 抗体を用いて、上記の陽性・陰性対照とヒト正常組織における ETBR タンパク検出能を評価するため、ウェスタンブロッティング、フローサイトメトリー、および免疫組織染色を行った。ヒト正常組織としては副腎・肝・膵・肺・ヒト末梢血単核細胞（PBMCs）を用いた。抗体は抗 ETBR ラビットポリクローナル抗体（抗体 1、3、4）、および抗 ETBR マウスモノクローナル抗体（抗体 2）を各検討に共通の 1 次抗体として使用した。

（Ⅱ）ETBR mRNA 発現の検討：上記発現タンパクに関して mRNA レベルでの発現との整合性を確認するために ETBR および GAPDH に対応したプライマーを用い、上記 Transfectant cell とヒト正常組織について半定量的 RT-PCR を施行した。cDNA 増幅は 25, 30, 35, 40 サイクルとした。

（Ⅲ）ヒト膵癌組織における ETBR 発現の検討：膵癌細胞株についてウェスタンブロッティングと免疫組織染色を、また、ヒト膵癌組織切片について免疫組織染色を行った。膵癌細胞株は KLM-1、KP-1N、KP4、MIAPaca2、PANC-1、PK-9、PK-45P、SUIT-2 の 8 種類を用い、それぞれの培養細胞およびマウス Xenograft を検討材料とし、副腎組織を陽性対照とした。患者腫瘍標本は当科および関連施設で切除された患者腫瘍標本 80 検体を用い、北海道大学倫理委員会の承認を得て検討に使用した。

【結果】

（Ⅰ）ETBR 遺伝子発現系の作成

- ① サブクローニングおよびトランスフェクションでは ETBR サブクローニング後のシーケンスからミスマッチのないことを確認し、陽性対照となる ETBR 発現細胞を作成しえた。
- ② ウェスタンブロッティングでは陽性対照には ETBR 分子量の理論値（49.64kDa）とは異なるサイズに複数のバンド（25, 37, 100, 200kDa）が出現した。これらは 4 種類の抗体に共

通して認められ、バンドの濃さは抗体ごとに異なった。ヒト正常組織では、いずれの臓器でも陽性対照とは異なるバンドパターンが抗体ごとに異なって出現した。

③ フローサイトメトリーでは4種類の抗体全てにおいてETBR タンパクの発現を検出した。ETBR 陽性細胞の割合は抗体ごとに異なった。

④ 免疫組織染色では陰性対照でいずれの抗体にも染色を認めず、陽性対照で4種類の抗体全てで細胞膜表面に染色を認めた。このことはpH条件を変えても同様であった。ヒト正常組織においては副腎にのみ明瞭な染色が認められた。副腎の染色は抗体ごとに染色部位や染色の濃さが異なり、それらがpH条件によっても変化した。

(II) ETBR mRNA 発現の検討

ETBR 発現陽性細胞[293FT(pETBR)]でmRNAは強い発現を示し、陰性細胞[293FT(pGFP)]でmRNA発現を認めなかった。本検討は陽性・陰性対照でのETBR発現がタンパク同様、mRNAレベルにおいても確認され、両者の検討結果には整合性があると考えられた。ヒト正常組織では副腎のみに比較的弱いETBR mRNAの発現が認められた。

(III) ヒト膵癌組織におけるETBR発現の検討

① 膵癌細胞株：ウェスタンブロッティングでは、いずれの細胞株も培養細胞とXenograft両方でETBRに特異的なバンドは確認できなかった。免疫組織染色では抗体1で副腎切片のみに染色が認められ、抗体2では全ての切片に何らかの染色を認めた。

② ヒト膵癌組織切片：上記の検討(III)①より、抗体2よりも非特異的染色が起こりにくいと考えた抗体1を用いて免疫組織染色を施行した。その結果、膵癌細胞と血管内皮細胞のいずれにもETBR過剰発現は認められなかった。膵島などの他の組織には染色を認める部位も存在した。

【考察】 本研究では適切なETBR発現系を構築し、客観性の高い陽性および陰性対照を確立することができた。特に、免疫組織染色における陽性および陰性組織対照を確立したことで、組織学的なETBR発現の適切な評価が可能になった。フローサイトメトリーと免疫組織染色の結果から、4種類の抗ETBR抗体は陽性対照細胞表面のETBR発現を適切に認識していたが、抗体ごとにETBRへの親和性が異なるため、フローサイトメトリーでの陽性細胞の割合やウェスタンブロッティングでのバンドの濃さに差が生じたと考えられた。ETBR分子量の理論値が49.64kDaであるのにもかかわらず、ウェスタンブロッティングにおいて陽性対照に25, 37, 100, 200kDaのバンドが出現した理由はETBRの重合や他の膜タンパクとの結合、splicing variant や糖鎖修飾の存在が考えられる。これらのバンドは全て陰性対照には出現しておらず、各々をETBRと考えるのが妥当である。ヒト正常組織のウェスタンブロッティングでのバンドはETBRの理論値とも陽性対照のパターンとも異なっており、mRNAの検討結果も合わせると大部分が非特異的反応と考えられる。ETBRタンパクとETBR mRNAの検討から、ヒト正常組織における免疫組織染色での染色パターンは副腎を除き、大部分が非特異的反応と考えられる。副腎は適切な条件下であれば免疫組織染色の陽性組織対照のひとつとなり得る。本検討から、ヒト膵癌組織においてはETBRの生物学的機能性は低いとも考えられた。

【結論】 膵癌においてEndothelin B receptorの発現を評価する適切な組織学的診断手法を確立した。免疫組織染色は客観性の高い陽性・陰性組織対照を用いなければ、非特異的染色を標的分子の染色と誤認するリスクを伴った診断手法であることを常に留意すべきであると考えられた。