

氏名（本籍） <sup>かね</sup>金子 <sup>こ</sup>子 <sup>なお</sup>直 <sup>き</sup>樹（新潟県）  
学位の種類 博士（理学）  
学位記番号 甲第1053号  
学位授与の日付 平成26年3月20日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
学位論文題目 腫瘍マーカーの探索と腎がん診断に向けた評価解析

論文審査委員 （主査）教授 池北 雅彦  
教授 小祝 修 教授 古市 貞一  
教授 深井 文雄 教授 樋上 賀一

## 論文内容の要旨

日本では社会や生活習慣の変化によりがん患者数は増え続け、腎がん（腎細胞がん）も例外ではなく増加の一途をたどっている。腎がんは血尿や腹痛、発熱といった症状が現れるが、これらの症状がみられた患者はすでに進行がんの場合が多い。早期がんの予後は良好で手術後の5年生存率は90%前後であるが、進行がんでは20%程度に低下する。人間ドックでMRIやCTにより発見されるケースが増えてきたがこれらの診断方法は高額な医療費、検診時間の長さ、被ばく等の理由により頻繁に受診できる方法ではない。早期発見のためには簡易的で非侵襲的な血液検査が必要となるが、腎がんは有効な血中腫瘍マーカーが存在しない。そこで我々は腎がんの血中診断マーカーを見つけることにした。

まず、腎がん患者から抽出されたがん組織と正常組織を用いて2-nitrobenzene sulfenyl (NBS) 試薬を用いたプロテオーム解析を行った。その結果、腎がん組織と正常組織間で発現差のあるタンパク質が92種類同定された。次に、プロテオーム解析で示された腎がん高発現タンパク質のバリデーションを行うことにした。まず、ウェスタンブロットで腎がん組織と正常組織におけるgalactin-1およびCNDP2の発現比較を行った。その結果、解析した症例の全てにおいて腎がん組織の方で高いことが確認され、プロテオーム解析の結果と一致していた。さらにgalactin-1のmRNA発現量も正常組織より腎がん組織で有意に増加していることが確認された。

プロテオーム解析で明らかにされた腎がん高発現タンパク質の中に、血液中でも濃度が上昇するタンパク質が存在したら、それは腎がんマーカー候補になる可能性がある。その可能性を検討するために、腎がん患者と健常者の血漿中の各タンパク質濃度を解析した。プ

ロテオーム解析で同定してきた腎がん高発現タンパク質の中の8種類のタンパク質のELISAを構築し、腎がん患者15症例と健常者51症例の血漿中濃度を測定した。その結果、 $\alpha$ -enolaseとcalnexin, galectin-1, -3, lectin mannose-binding 2の血漿中濃度は健常者群よりも腎がん患者群で統計的有意に高かった。さらに、これら5つのタンパク質のROC曲線を描いたところ、AUCはcalnexinとgalectin-1, galectin-3, lectin mannose-binding 2で0.7以上を示した。galectin-1とgalectin-3は80-100%のSpecificityの範囲において高いSensitivityを示したことから、galectin-1, -3は腎がん患者と健常者を区別するための初期診断用マーカーとして有用であることがわかった。galectin-1, -3のカットオフ値をそれぞれ48.4ng/mLと18.4ng/mLに定め、これらのカットオフ値以上を陽性とするときSpecificityは98%でSensitivityは47%を示した。したがって、galectin-1, -3の両方を用いることにより高いSpecificityで腎がんを判別できる初期診断マーカーとして利用できる可能性を示した。腎がん患者の手術前後における血漿タンパク質濃度の変化を調べると、 $\alpha$ -enolase濃度のみが術後4週間後で統計的有意に減少しており、その低濃度状態は12週目も続いていた。このことから、術後患者の再発の発見や、患者の薬効評価をモニタリングするための経過観察用マーカーとして利用できる可能性がある。これらのタンパク質が腎がん細胞から細胞外へ分泌されることを培養細胞株を用いて検証した。まず、腎がん細胞で各タンパク質発現量が増加しているかどうかを調べるために、ヒト胎児腎細胞由来細胞株293細胞と4クローンのヒト腎がん由来細胞株のそれぞれの細胞溶解液に対してウェスタンブロットを行い6種類のタンパク質発現量を測定した。galectin-1やgalectin-3は腎臓の非がん細胞である293細胞よりも腎がん細胞株で発現量が高かった。高発現していたgalectin-1の細胞外分泌を調べるために各細胞株の培養上清中galectin-1濃度を解析した結果、293細胞よりも4種類の腎がん細胞株の全てにおいて分泌量が増加していることが示された。現在、腎がんに対する血中腫瘍マーカーは存在しない。そのため腎がん診断のほとんどはCTやMRIなどの画像診断に頼った状態である。本研究における解析症例数は少ないが、初期診断用マーカーとしてのgalectin-1とgalectin-3、経過観察用マーカーに $\alpha$ -enolaseが有用である可能性を示した。将来的に腫瘍マーカーとしての十分な有効性を示すことができれば腎がん診断への大きな貢献が期待される。

## 論文審査の結果の要旨

本論文ではNBS法を用いてプロテオーム解析を行い、腎がん組織で高発現している34種類のタンパク質を同定し、そのうち25種類が本研究にて腎がんを高発現していることを新規に明らかにした。これら腎がん組織高発現タンパク質のヒト血中濃度を解析したところ、galectin-1, galectin-3,  $\alpha$ -enolaseが健常者よりも腎がん患者において有意に増加しており、血中腫瘍マーカーとして利用できる可能性を明らかにした。これら3

種類のタンパク質に対して腎がん診断へ向けた評価解析をした報告は本研究が初めてである。

学位論文を中心として、その内容に関連する細胞生物学、化学生物学、タンパク質化学とその周辺学術分野に関する審査の結果、申請者は博士（理学）の学位を取得するに十分な学識を有していると判定した。