

論文の内容の要旨

論文題目 Methionine aminopeptidase type2 (MetAP2)のヒトリンパ組織、
リンパ腫、上皮組織、上皮性腫瘍における発現に関する研究

指導教官 深山正久教授

東京大学大学院医学系研究科

平成8年4月1日入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 菅野隆行

〔研究の背景と目的〕

蛋白質の翻訳時、翻訳後の修飾は、蛋白質の細胞内での配置、活性化、機能の調節、最終的には分解に重要だと考えられている。すべての蛋白質合成が N 末端から始まるので、蛋白質の成熟過程における早期の重要な蛋白質のプロセッシングは N 末端で行われる。特に N 末端メチオニン残基の切断は 60%以上の蛋白質に認められ、メチオニンを除去したあとの翻訳後修飾へつながる過程、例えば N 末端のミリストイル化や、ユビキチン化へつながるステップとして重要なのではないかと考えられている。

Methionine aminopeptidase(MetAP) は、合成された蛋白質の N 末端のメチオニンを特異的に切りはずす酵素であり、活性中心にコバルトを 2つ持つ金属酵素であること、活性部位のアミノ酸残基は生物種をこえてよく保存されていること、真核生物には type1(MetAP1), type2(MetAP2)の 2種類が存在することなどがわかっている。また N 末端側の付加領域に存在する zinc-finger domain や、好酸性、好塩基性の領域により、核酸あるいは蛋白質と結合して MetAP の機能制御が行われていると想定されている。

MetAP2 については、蛋白質翻訳開始に不可欠な eukaryotic initiation factor 2(eIF2)の α サブユニット(eIF2 α)のリン酸化 inhibitor、p67 の Rat homologue として報告された遺伝子が MetAP2 と同一であるという報告がなされた。このことは、MetAP2 の蛋白質合成促進機能が eIF2 α のリン酸化を阻害するという機能によっていることを示唆している。また、MetAP2 は新たな癌治療薬として注目される抗血管新生薬 TNP-470 の target protein であることが示され、関心を集めている。

我々は、転移関連遺伝子産物である S100A4 蛋白質と会合する蛋白質の同定を試みている過程で Two hybrid 法によって MetAP2 がこれに会合しうる蛋白質であることを見出

した。私はこの研究の過程で MetAP2 のヒト生体および腫瘍において果たす役割を知ることに関心を持ち、まずその発現の様態をあきらかにすることを試みた。また、MetAP2 に対する抗体を作製し、ヒト諸臓器、諸腫瘍を検索する過程で、MetAP2 がリンパ装置濾胞胚中心 B 細胞特異的に高発現していること、さらに胚中心 B 細胞と類似した性格を有する悪性リンパ腫に高発現することを見出したので、特に悪性リンパ腫について重点的に解析を行った。

B 細胞性リンパ腫は最近の REAL 分類では、11 型に亜分類されているが、このうち濾胞性リンパ腫のすべて、びまん性大細胞型リンパ腫の 50%以上およびバーキットリンパ腫のほぼすべてについては正常胚中心 B 細胞の性格をしめしているところから、胚中心がその発生母地であるとされている。そこで、これらの胚中心由来と考えられている B 細胞性リンパ腫で MetAP2 がどのように発現しているかを免疫組織化学的に検索した。特に DLBCL 50 例に対し、Bcl-6, CD10 も MetAP2 とともに検索した。なお、ヒト腫瘍としては、リンパ腫以外に大腸癌、乳癌などの上皮性腫瘍についても検索をした。

〔抗体の作成法〕

正常ヒト末梢単核球より抽出した RNA から、RT-PCR で正常ヒト MetAP2 の cDNA を得、これを鋳型として PCR にて全長 479 アミノ酸の MetAP2 の 224~479 アミノ酸部分にあたる cDNA fragment を得た。GST 融合蛋白質発現プラスミドにこれを組み込み、大腸菌を形質転換し、Glutathione S Transferase (GST) 融合蛋白質 GST-hM224-479 を大腸菌から精製した。この GST 融合蛋白質は、大腸菌に産生させると不溶化してしまうため、高濃度の尿素を用いて可溶化し、さらにアクリルアミドゲルに泳動したものを切り出して抽出し、精製カラムを用いて 0.1% SDS 溶液に可溶化した抗原蛋白質 GST-hM224-479 を得た。さらに、第 135 から 150 アミノ酸残基に相当する合成ペプチドを作製し、これをヘモシアニンに結合させ抗原蛋白質 hM135-150 とした。これら 2 種の抗原蛋白質を Freund's adjuvant と混和し、ウサギに免疫した。

hM224-479 を免疫したウサギより得られた抗ウサギ血清を硫酸沈殿したのち、GST カラムを通すことにより、GST に対する抗体を除いた。最終的な精製は、ニトロセルロースメンブランに抗原蛋白質を transfer したのを用いて行った。hM135-150 に対する抗体は、合成ペプチドを結合させたアフィニティーカラムを作製し、抗体を精製した。

抗 hM224-479 抗体の特異性の確認には、293T 細胞に、FLAG-tag をつけた抗原蛋白質 FLAG-hM224-479 を発現させ、その lysate の Western blot と、cell pellet をホルマリン固定パラフィン包埋して作製した薄切切片の免疫組織化学で確認した。さらに抗 hM135-150 抗体、抗 hM224-479 抗体それぞれによる免疫沈降物の Western blot を行った。

〔結果と考察〕

1. 抗MetAP2抗体の特異性

得られた2種類の抗MetAP2抗体を用いて、FLAG tag付きの融合抗原蛋白質FLAG-hM224-479を強制発現させた293T細胞のlysateのWestern blotを行ったところ、それぞれに融合蛋白質に対応する40kDaのバンドと内因性のMetAP2に対応する67kDaのバンドが確認でき、その他のバンドは認められず、いずれの抗体もWestern blotレベルでは特異性の高い抗体であることが確認された。また、その細胞ペレットをホルマリン固定パラフィン包埋し薄切切片を作製し、免疫組織化学を行ったところ、融合蛋白質を発現させた細胞では染色性の強い細胞が散見されたが、コントロールの293T細胞ではごく弱い染色性を示す細胞が散見されるのみであった。Western blotの結果とよく対応し、免疫組織化学でも、抗体がよく抗原を認識することが示された。リンパ系細胞株を用いたWestern blotと免疫染色においても結果が良く対応した。さらにhM135-150を認識する抗ペプチド抗体で、抗hM224-479抗体の免疫沈降物が検出され、抗hM135-150抗体による免疫沈降物が抗hM224-479抗体により検出されることを確認した。以上より2種類の抗体が内因性のMetAP2と特異的に反応することが示された。

2. ヒトリンパ組織におけるMetAP2の発現

ヒトリンパ組織である扁桃において、免疫組織学的検索により濾胞胚中心B細胞にMetAP2が高発現していることを見出した。さらに、暗調域に発現が強く、明調域では、発現が弱いという点で、極性が認められた。抗CD3抗体、抗CD20抗体を用いた免疫蛍光二重染色の結果からMetAP2は濾胞胚中心B細胞に発現していることが判明した。

3. ヒトリンパ腫組織でのMetAP2蛋白質の発現

抗hM 224-479抗体を用いて127例のヒト悪性リンパ腫症例におけるMetAP2の発現を検索した。T細胞性リンパ腫では、強陽性 0%、陽性 40%であったのに対して、B細胞性リンパ腫では、強陽性 15%、陽性 54%と、あきらかにB細胞性リンパ腫のほうが陽性率が高かった。このことは、B細胞およびB細胞リンパ腫におけるMetAP2の高発現が単に分裂能、蛋白質合成能の亢進によるだけではない可能性を示している。濾胞胚中心由来と考えられる濾胞性リンパ腫では、78%(7/9例)で陽性、バーキットリンパ腫は、2例全例とも強発現していた。びまん性大細胞型リンパ腫(DLBCL)では、73%(53/73例)で陽性であった。これらの結果から、悪性リンパ腫においては、MetAP2の発現は、CDマーカーや、その他の抗原マーカーと同様、ある程度、リンパ腫の由来、あるいは性格を反映しているものと考えられる。T細胞性リンパ腫で陽性例が40%あることについては、eIF2 α のリン酸化阻害因子とい

う機能から考えると、蛋白質合成が特に亢進しているリンパ腫では細胞の系統にかかわらずこの程度の陽性所見を示すことが考えられる。T細胞性リンパ腫の中では、anaplastic large cell lymphomaが4例中4例陽性、adult T cell leukemiaが1例中1例陽性であった。このことは増殖能の高い腫瘍で陽性率が高い可能性を示唆している。Hodgkin病8例の検索では、8例全例が陽性所見を示した。

50例のDLBCLについて、MetAP2、Bcl-6、CD10についてその発現を免疫組織学的に検索した。MetAP2、Bcl-6、CD10に関してそれぞれの陽性率は、36/50例 (72%)、47/50例 (94%)、13/50例 (26%)であった。MetAP2とBcl-6、MetAP2とCD10、Bcl-6とCD10のそれぞれの組み合わせについて、DLBCL症例での発現に相関を認めたのは、MetAP2とBcl-6のみであった。

4. ヒト上皮性腫瘍でのMetAP2蛋白質の発現

乳腺疾患 10例、大腸癌 10例、胃癌 10例、肝癌 6例、食道癌 4例についてMetAP2の免疫染色を行い、その発現を検討した。使用した切片内の乳腺正常上皮では、6例中6例 (100%)が陽性、乳腺腺腫 1例が陽性、乳癌 9例中6例(67%)が陽性であった。正常上皮での陽性率が悪性腫瘍の陽性率より高いことから、乳腺上皮では、乳腺上皮特異的な役割があり、癌化する過程でその発現が逆に抑えられる可能性が考えられる。大腸癌症例では、10例中1例が強陽性、8例が陽性、1例が陰性であった。また、正常上皮、腺腫、癌と連続している切片では、癌、腺腫、正常上皮の順に染色性が高かった。大腸癌においてMetAP2の発現は悪性度と相関する可能性のあることが示唆された。胃癌 10例では、1例が陽性、9例が陰性、肝癌 6例では、6例全例で陰性、食道癌4例は、1例陽性、3例陰性であった。いずれの症例にも、強陽性像を示すものはなかった。