Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Overexpression of SAP-1,a Transmembrane-Type Protein Tyrosine Phosphatase,in Human Colorectal Cancers

瀬尾，靖

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1998-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲1753
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001753

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

[80]

氏名・（本籍）	瀬尾　靖（せお　やすし）　（広島県）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	博い第1148号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成10年3月31日
学位論文題目	Overexpression of SAP-1,a Transmembrane-Type Protein Tyrosine Phosphatase, in Human Colorectal Cancers （ヒト大腸癌における膜貫通型チロシンホスファターゼSAP-1の過剰発現）
審査委員	主査　教授　伊藤　宏 教授　春日雅人　教授　前田　盛

論文の内容要旨

I. 序　文

大腸癌の発生機序について，腺腫から癌に至るadenoma-carcinoma sequenceが考えており，APC，MCC，p53，DCCのような癌抑制遺伝子の欠失や変異など多数の遺伝子異常が関与している。APCの欠失や変異は腺腫の進展に，p53，DCCは腺腫から癌の発達や癌転移に関与しているとされている。また細胞癌遺伝子RASの変異によるRAS蛋白の活性化は大腸癌進展の早期に関与している。このような癌抑制遺伝子の変化やRASの変異以外にSRCファミリーのようなチロシンキナーゼの活性化が大腸癌及び，前癌ポリープなどのadenoma-carcinoma sequence早期に認められるという報告もある。SRCファミリーキナーゼはそのC末リン酸化チロシン残基の脱リン酸化により活性が増強することが知られている。そこでチロシンホスファターゼ（PTP）の活性の変化は大腸癌におけるチロシンキナーゼの活性化に関与しているかもしれない。SAP-1は最近クローニングされたヒト膜貫通型OTOである。SAP-1は細胞質領域にPTPドメインを1つもち，細胞外ドメインは8個のフイブロネクチンタイプⅢ様構造と多数のN－グライコシレーションサイトを有している。SAP-1は正常の大腸，膵臓組織には発現がみられないが，大腸癌，膵臓癌細胞株に高発現している。さらにSAP-1遺伝子は染色体第19番長腕13.4，CED遺伝子（第19番長腕13.2）の近傍に位置している。今回我々は外科的，内視鏡的に切除された大腸癌，腺腫，正常大地様組織において免疫組織科学的にまた，in situ hybridizationにてSAP-1の発現を検討した。

II. 方　法

対象：48名の大腸癌，17位の大腸腺腫患者の外科的大腸切除標本およびポリペクトミー標本であり，うち9例の大腸癌標本は切除後，液体窒素で凍結し－80℃に保存され，残りは10％ホルマリンで固定されパラフィン包埋された。

方法：（免疫染色）SAP-1細胞内ドメインをGST-SAP-1融合蛋白として発現し，これを家兎に免役しアフィニティ精製によりポリクローナル抗SAP-1抗体を作成した。前例にABC法にて免疫染色を

行った。(DNA抽出とK-RAS変異の検出) 免疫染色でSAP-1の発現を認めた15例の大腸癌パラフィン包埋組織よりフェノール・クロロホルム法にてゲノムDNAを抽出し，K-RASコドン12，13領域をPCRにて増幅した。次にPCR産物をTAクローニングキットにてサブクローニングしシークエンスした。(in situ hybridization) DIG RNA LabelingKitを用いジゴキシゲニン標識SAP-1mRNA (nucleotide 3054-3399) プローベを作成した。作成したプローベを用いたパラフィン包埋切片および凍結切片をハイブリダイズ後，Nucleic Acid Detection KitにてSAP-1mRNA シグナルを検出した。(統計学的処理)X2 検定，Ficher's exact test，Student's testを用い，P<0.05をもって有意とした。

Ⅲ. 結　果

48例の大腸腺癌，17例の大腸腺腫について免疫組織科学的にSAP-1の発現を調べたところ，正常大腸粘膜，軽度異型腺腫ではSAP-1の発現はみられなかったが，中，高度異型腺腫の7例中2例(11.8%) にSAP-1の発現をみた。中等度異型腺腫では，粘膜上皮細胞の間腔側優位に発現増強をみたが，高度異型腺腫ではSAP-1の発現はより強く，局在も粘膜上皮細胞の管腔側だけでなく，基低膜側にもみられた。大腸癌では48例中19例 (39.6%) にSAP-1は発現しており，細胞質にも基低膜にもびまん性に発現がみられた。癌周囲の間質や正常細胞には発現はみられなかったが，リンパろ胞組織には弱い発現をみた。SAP-1の発現頻度は高分化型腺癌では中分化，低分化型腺癌より有意に多角 (P = 0.029)，Dukes stage C (53.8%)，D (50%) 癌はDukes stage A (33.3%)，B (28.6%) 癌より高い傾向があった。In situ hybridizationの検索ではパラフィン包埋標本ではシグナルは得られなかったが，凍結標本9例についてアンチセンスSAP-1RNAプローベにて，9例中6例大腸癌細胞にソグナルを認めた。正常細胞及びセンスプローベではシグナルは検出されなかった。シグナル陽性6例中3例は免疫組織科学的にSAP-1蛋白の過剰発現を認めた。シグナル陰性3例は免疫組織科学的にも発現は認められなかった。免疫染色にてSAP-1 陽性の15例においてK-RAScodon12，13の遺伝子変異は1例も認められなかった。今回検討した大腸癌患者46名のうち21名 (45.7%) において血清CEA値が5ng／ml異常の高値を示した。SAP-1とCEAの遺伝子は同じ第19染色体張腕13に位置しているが，SAP-1発現例と血清CEA高値例との間に相関はなかった。SAP-1陽性19例中10例は血清CEA値は正常であった。大腸癌46例において血清CEA値上昇またはSAP-1過剰発現をみた例は31例 (67.4%) であった。

Ⅳ. 考　案

SAP-1の発現は正常大腸粘膜や軽度異型腺腫には認められなかったが，中，高度異型腺腫において認められた。大腸癌におけるK-RAS突然変異の頻度は，腺腫においてと同様40-50%とされており，K-RASは正常大腸粘膜から腺腫への進展に関与していると考えられている。SAP-1陽性大腸癌のK-RAS突然変異の頻度は66.7%であった。またp-53の突然変異は腺腫ではほとんどないが，大腸癌では75-80%にみられる。我々のP53抗体を使った免疫組織科学的検索ではP53過剰発現の頻度は，SAP-1の発現は大腸癌のadenoma-catcinoma sequenceにおいて比較的遅い時期に生じていると考えられる。

SAP-1は癌と腺腫で局在に違いがあったが，CERの局在も正常上皮細胞と癌細胞では異なっている。正常ではCERは大腸上皮細胞の管腔表面に結合しているが，癌細胞では基低側あるいは隣接した側方胞膜に局在してやり，その細胞接着を減弱すると考えられている。同様にSAP-1の発現もまた

癌細胞において細胞－細胞間，細胞－間質間接着を減弱し，浸潤や転移に関与するかもしれない。今回観察されたSAP-1過剰発現はDukesstageA，B癌よりDukesstageC，Dの浸潤転移癌で多い傾向にあったことは，SAP-1が大腸癌細胞の転移能を増強している可能性を示唆する。

大腸癌においてSAP-1遺伝子発現が増加した結果，SAP-1蛋白の過剰発現が生じることが，in situ hybridizationの結果から示唆された。しかしSAP-1遺伝子の発現が大腸癌で活性化されるメカニズムは不明である。p53が不活性化している大腸癌細胞株WidrにおいてSAP-1は過剰発現している。P53は多数の遺伝子の発現を抑制しているので，Widr細胞や大腸癌においてp53の欠失や突然変異がSAP-1遺伝子の過剰発現に関与しているかもしれない。しかし，野性型p53cDNA をトランスフェクトしP53蛋白を過剰発現するWidr細胞でのSAP-1の発現は，親Wide細胞と変化がなかった（unpublished data)。このことからp53の不活性化が大腸癌におけるSAP-1過剰発現の原因とは考えにくい。他の機序としてSAP-1遺伝子のプロモーター領域の変異によりSAP-1遺伝子の発現が増加することも考えられるが不明である。

大腸癌におけるSAP-1の発現はSRCファミリーキナーゼのC末チロシンナ残基の脱リン酸化により，その活性化を誘導する可能性がある。別の膜貫通型PTPであるHPTPaの過剰発現はSRCキナーゼの活性化によりRat-1fibrobblastのtransformationを誘導する。HPTPaはまた大腸癌に過剰発現していることから，これらPTPは大腸癌においてSRCファミリーキナーゼの活性化に関与しているかもしれない。

CEAは大腸癌の臨床診断において広く使われている腫瘍マーカーである。SAP-1とCEA遺伝子は染色体上近くに位置しているが，大腸癌患者における血清CEA値上昇とSAP-1過剰発現とは関連がなかった。血清CEA値が上昇していない患者の大腸癌組織においてもSAP-1は発現していた。さらに全大腸癌患者の67％においてSAP-1過剰発現あるいは血清CEA値上昇を認めた。SAP-1は膜糖化蛋白であるが，大腸癌患者の末梢血中に可溶型が存在する可能性がある。大腸癌においてSAP-1発現の頻度が高井ことはSAP-1単独あるいはCEAと組み合わせて診断および外科手術後フォローアップにおいて有益なマーカーとなりういる可能性を示唆する。

V．結　論

SAP-1は大腸癌及び異型性の高いヒト大腸腺腫において過剰発現していた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【審査の要旨】

大腸癌の発生機序について，腺腫から癌に至るadenoma-carcinoma sequenceが考えられており，様々な癌抑制遺伝子の欠失や変異，癌遺伝子の変異など多数の遺伝子異常が関与している。またSRCファミリーのようなチロシンキナーゼの活性化が大腸癌及び，前癌ポリープなどに認められるという報告もある。SRCファミリーキナーゼはそのC末リン酸化チロシン残基の脱リン酸化により活性が増強すことが知られている。そこでチロンシンホスファターゼ(PTP)の活性の変化は大腸癌におけるチロシンキナーゼの活性化に関与している可能性が考えられる。SAP-1は最近クローニングされたヒト膜貫通型PTPで，大腸癌，膵臓癌細胞株に高発現している。そこで本研究者は外科的，内視鏡的に切除された大腸癌，腺腫，正常大腸組織においてSAP-1の発現を検討した。

【方　法】

対象として48名の大腸癌，17名の大腸腺腫感じやの外科的大腸切除標本およびポリペクトミー標本を用いた。SAP-1細胞内ドメインに対するポリクローナル抗SAP-1抗体を作成し，全例にABC方にて免疫染色を行った。免疫染色でSAP-1の発現を認めた15例の大腸癌組織よりゲノムDNAを抽出し，K-RASコドン12，13領域わPCRにて増幅しシークエンスした。またジゴキシゲニン標識SAP-1mRNAプローベにて，大腸組織をハイブリダイズ後，SAP-1mRNAシグナルを検出した。

【結　果】

免疫組織科学的に正常大腸粘膜，軽度異型腺腫ではSAP-1の発現はみられなかったが，中，高度異型腺腫の7例中2例に発現をみた。中等度異型腺腫では，粘膜上皮細胞の管腔側優位に発現をみたが，高度異型腺腫では発現より強く，局在も管腔側だけでなく基低膜側にもみられた。大腸癌では48例中19例（39.6%）に発現しており，局在もびまん性であった。SAP-1の発現頻度は高分化型腺癌では中分化，低分化型腺癌より有意に高く，Dukesstage C，D癌はDukes stageA，B癌より高い傾向があった。In situhybridizationでは凍結標本9例中6例の大腸癌細胞にシグナルを認めた。正常細胞にはシグナルは検出されなかった。シグナル陽性6例中3例は免疫染色でもSAP-1の過剰発現を認め，シグナル陰性3例は免疫組織化学的にも発現は認められなかった。免疫染色でSAP-1陽性15例中10例（66.7%）にK-RAScodon12の点突然変異を認めた。大腸癌患者46名のうち21名（45.7%）において血清CEA値が5ng／ml異常の高値を示したが，SAP-1発現例と血清CEA高値例との間に相関はなかった。SAP-1陽性19例中10例は血清CEA値は正常であった。今回検討した大腸癌例において血清CEA値上昇またはSAP-1過剰発現をみた例は67.4%であった。

【結　論】

SAP-1の発現は正常大腸粘膜や軽度異型腺腫には認められなかったが，中，高度異型腺腫，癌において認められた。SAP-1陽性大腸癌のK-RAS突然変異の頻度は66.7%であった。このことからSAP-1の発現は大腸癌のadenoma-carcinoma sequenceにおいて比較的遅い時期に生じていると考えられる。

SAP-1は癌と腺腫で局在に違いがあったが，CEAと同様にSAP-1の過剰発現もまた癌細胞において細胞－細胞間，細胞－間質間接着を減弱し，浸潤や転移に関与するかもしれない。今回観察されたSAP-1過剰発現はDukes stage A，B癌よりDukes stageC，Dの浸潤転移癌で多い傾向にあったことは，SAP-1が大腸癌細胞の転移能を臓器様している可能性を示唆する。大腸癌においてSAP-1遺伝子発現が増加した結果，SAP-1蛋白の過剰発現が生じることが，in situ hybridizationの結果から示唆された。

SAP-1とCEA遺伝子は染色体上近くに位置しているが，両者に関連がなく，血清CEA値が上昇していない患者の大腸癌組織においてもSAP-1は発現していた。大腸癌においてSAP-1発現の頻度が高井ことはSAP-1単独あるいはCEAと組み合わせて診断および術後フォローアップにおいて有益なマーカーとなりうる可能性を示唆する。

本研究は，今までに大腸癌組織におけるチロシンホスファターゼの発現は検討されておらず，SAP-1の大腸癌においての関与について重要な知見を得たものとして，価値ある研究と認める。よって，本研究者は，博士（医学）として学位を得る資格があると認める。