

組織アレイを用いたPodoplaninの発現解析

産業技術総合研究所 糖鎖工学研究センター
加藤 幸成 先生

表1 今回使用したCybrdi社組織アレイの一覧

Cat#	Product name
CS17-01-001	Brain glioma
CS17-01-002	Brain glioma
CS17-01-003	Brain glioma
CS17-01-004	Brain glioma
CC04-01-001	Lung carcinoma
CS04-03-001	Lung squamous cell carcinoma
CS04-07-001	Lung adenocarcinoma
CS04-08-001	Lung adenocarcinoma
CS04-10-001	Large cell carcinoma of lung
CS04-11-001	Lung small cell carcinoma
CC23-01-001	Testis carcinoma
CC02-01-002	Esophagus squamous cell carcinoma
CS38-01-001	Skin malignant melanoma
CS01-01-002	Stomach adenocarcinoma
CC05-01-002	Colon carcinoma
CC06-01-001	Rectum carcinoma

表2 Cybrdi社の組織アレイを用いたPodoplaninの解析 (578症例)

Tumor type	No. of cases	Podoplanin immunostaining			
		+++	++	+	-
Brain glioma					
diffuse astrocytoma (grade 2)	22	0	0	0	22
anaplastic astrocytoma (grade 3)	29	3	2	1	23
glioblastoma (grade 4)	81	23	8	5	45
Lung carcinoma					
squamous cell carcinoma	23	2	2	1	18
adenocarcinoma	51	0	0	0	51
large cell carcinoma	23	0	0	0	23
small cell carcinoma	31	0	0	0	31
Testicular tumor					
seminoma	13	13	0	0	0
B cell lymphoma	7	0	0	0	7
Esophagus squamous cell carcinoma	65	5	3	6	51
Malignant melanoma	38	0	0	0	38
Stomach adenocarcinoma	72	0	0	0	72
Colon adenocarcinoma	66	0	0	0	66
Rectal adenocarcinoma	57	0	0	0	57

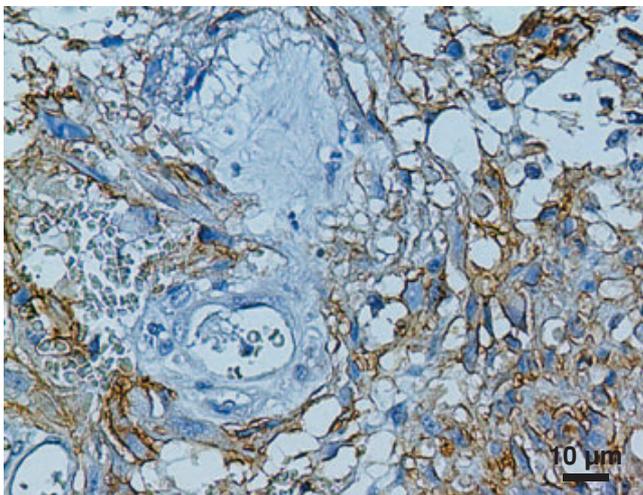


図1 : glioblastomaにおけるPodoplaninの発現
抗Podoplanin抗体により腫瘍細胞の膜が特異的に染色されている。
使用パネル：CS17-01-004

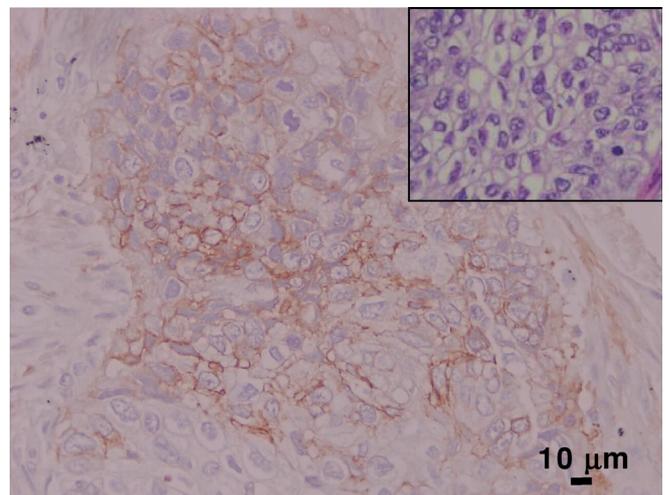


図2 : 肺扁平上皮癌におけるPodoplaninの発現
肺癌では扁平上皮癌に特異的にPodoplaninの発現が見られる。
(挿入図：HE染色)
使用パネル：CS04-03-001



【解説】

Podoplaninは、LYVE-1, Prox1, VEGFR-3とともに、リンパ管内皮細胞の特異的マーカーとして発見され、これまで困難であった血管内皮細胞との組織学的鑑別が容易となった。我々は、Podoplanin (別名Aggrus) が血小板凝集活性を持つことを発見し、癌細胞による血小板凝集や、ある種の癌細胞の血行性転移に重要であることを報告してきた(参考文献1、2)。さらに近年、精巣腫瘍、肺癌、脳腫瘍などのヒト腫瘍において、Podoplaninが組織型特異的に発現していることも発見し、腫瘍マーカーとしての開発も期待されている(参考文献3-6)。また、ヒトPodoplaninに対する特異的抗体が何種類か販売されているが、特に我々が作製した抗Podoplanin抗体(AngioBio社)は、感度、特異度共に高く、免疫組織学的染色においても有用性が高い。

Podoplaninがどの腫瘍で、どのような組織型に発現しているかを調べるには、感度、特異度の高い抗体を使うことだけでなく、多くのヒト腫瘍組織での発現解析が重要である。今回、Cybrdi社の各種ヒト腫瘍組織アレイ(表1)を用いて、Podoplaninの発現解析を行った。合計578症例におけるPodoplaninの発現解析の結果を表2に示した。それぞれの症例について、以下簡単に結果を示す。

脳腫瘍では、astrocytic tumorにおけるPodoplaninの発現解析を行った。astrocytic tumorはWHOの分類で、

grade 1からgrade 4に分類される。gradeが上がると臨床的悪性度が高くなるが、Podoplaninの発現がgradeと相関して上昇していることが示された(図1)。また、皮膚の扁平上皮癌でPodoplaninが発現していることが報告されていたが、今回、肺や食道の扁平上皮癌においてもPodoplaninの発現が確認された(図2、3)。精巣腫瘍の組織アレイでは、セミノーマの全例においてPodoplaninの発現が見られたのに対し、他の組織型では全く発現が見られなかった(図4)。

使用した組織アレイスライドガラスには、直径1.5 mmの腫瘍組織がパネルとしてのせられている。特にヒト肺癌の各種組織アレイは、症例数が多いだけでなく、手術件数が少なく入手困難な組織型である小細胞癌や大細胞癌も多く含まれている。また、精巣腫瘍の症例数は世界的に非常に少ないため、一度に多くの病理切片を集めることが困難であるが、Cybrdi社の組織アレイを用いることにより、これまでの結果を症例数を増やして確認することができた。またWebサイトですべてのHE染色像と臨床的・病理学的診断を確認できるので、最も目的に合ったアレイを選択することができる。直径1.5 mmと組織片は小さいが、各診断に相当する代表的な視野が選ばれており、Podoplaninの発現の判定をするには十分な面積であった。各標本の固定状態は良好であり病理診断に適した切片である。実際に今回は、通常の病理切片

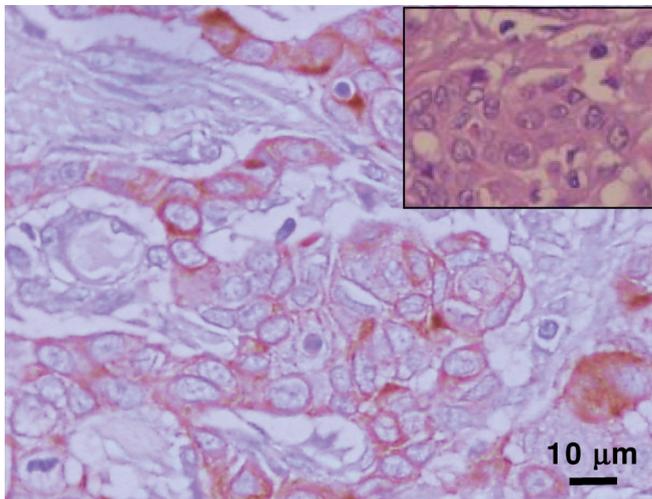


図3：食道癌におけるPodoplaninの発現
(挿入図：HE染色)
使用パネル：CC02-01-002

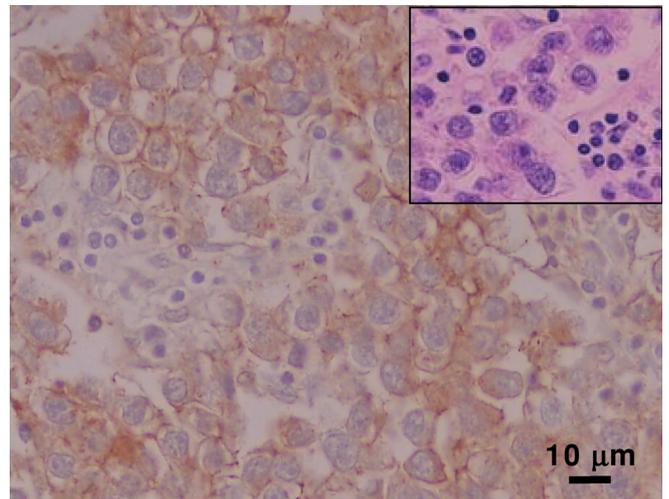


図4：セミノーマにおけるPodoplaninの発現
精巣腫瘍ではセミノーマに特異的にPodoplaninの発現が見られる。(挿入図：HE染色)
使用パネル：CC23-01-001



でのPodoplaninの発現解析も平行して行い、同様の結果が得られたことから、組織アレイを用いた解析が有効であることを示すことができた（参考文献6）。組織アレイで最も問題となるのは、腫瘍のheterogeneityであるが、事前に解析したいタンパクの発現パターンを通常の病理切片で調べておくことが重要である。Cybrdi社の組織アレイでは、同一症例から複数個サンプリングされているものもあり、この問題をある程度は解決できるものと思われる。

このように、今回のような大量の症例に対しても、組織アレイを用いることにより、抗体の希釈濃度、反応時間、検出方法による差が生じない点や、検鏡や評価が簡便な点が利点として挙げられる。さらに、少数の病理切片で特定のタンパクの発現が確認された場合、その症例数を有意に増やすことができる。繰り返しになるが、組織アレイと通常の病理切片とを組み合わせることで発現解析を行うことが重要であり、研究の信頼性も上がることを強調したい。

参考文献

1. Kato Y. et al. *J Biol Chem.* 2003; 278(51):51599-51605. (Podoplaninのクローニング)
2. Kaneko M., Kato Y. et al. *J Biol Chem.* 2004; 279(37):38838-38843. (Podoplaninの糖鎖構造解析)
3. Kato Y. et al. *Oncogene.* 2004 ;23(52):8552-8556. (精巣腫瘍におけるPodoplaninの発現解析)
4. Kato Y. et al. *Tumour Biol.* 2005; 26(4):195-200. (肺癌におけるPodoplaninの発現解析)
5. Mishima K., Kato Y. et al. *Acta Neuropathologica.* in press (脳腫瘍(germ cell tumor)におけるPodoplaninの発現解析)
6. Mishima K., Kato Y. et al. *Acta Neuropathologica.* in press (脳腫瘍(astrocytic tumor)におけるPodoplaninの発現解析)

