

学位論文題名

Over-expression of The Aldo-keto Reductase Family Protein AKR1B10 Is Highly Correlated with Smokers' Non-Small Cell Lung Carcinomas

(アルド-ケト リダクターゼ ファミリー蛋白である AKR1B10 の
発現亢進は喫煙者の非小細胞肺癌と強く相関する)

学位論文内容の要旨

【背景】

肺扁平上皮癌 (SCCA) と肺腺癌は、組織学及び疫学における明白な違いにもかかわらず、現在、非小細胞肺癌 (NSCLC) として包括的に治療されている。将来的には、発癌の違いに基づき、異なる治療を選択することが望まれる。SCCA は正常気管支上皮、化生、異形成、上皮内癌から浸潤癌への進展において一連の遺伝子変化を蓄積すると考えられている。マイクロアレイ解析は、分類、分子機構の解明、腫瘍マーカーや治療標的の検索を含めた癌研究の様々な局面に適用されており、肺癌のマイクロアレイ解析における最近の報告により、SCCA と肺腺癌が異なった遺伝子発現プロファイルを持つことが示され、発癌における異なる経路の関与が示唆されている。

【目的】

マイクロアレイ解析により、SCCA に対する診断及び治療に有用な標的分子を同定し、その臨床的有用性を評価する。

【方法】

SCCA 特異的に高発現している遺伝子を SCCA5 例、肺腺癌 5 例、小細胞肺癌 10 例、肺組織・気管支上皮・扁平上皮を含む 27 正常組織、40 癌細胞株のマイクロアレイ解析により探索した。続いて、モノクローナル抗体を新たに作成して、汎扁平上皮細胞マーカーである Keratin5/6 との発現比較を行った上で、臨床的有用性を主に免疫組織化学的解析により検討した。さらに、臨床病理学的因子や我々が以前報告した分子との関連を検討するため統計的解析を行った。

【結果】

- 1、*Aldo-keto reductase family 1, member B10 (AKR1B10)* を含む 7 遺伝子を、SCCA 特異的遺伝子として同定し、肺癌で報告のない *AKR1B10* について解析を行った。
- 2、定量的 PCR にて、SCCA の 67% (6/9) で *AKR1B10* 発現を認め、予想に反し、33% (4/12) の肺腺癌でも発現を認めた。免疫プロット解析では、*AKR1B10* 蛋白は SCCA 癌部のみで観察された。
- 3、Keratin5/6 との比較では、keratin5/6 は肺腺癌陰性で、SCCA の 83% で陽性であったが、正常扁平上皮や正常円柱上皮でも陽性であった。一方、*AKR1B10* は SCCA の 64% 及び肺腺癌の 30% で陽性であったが、正常上皮では陰性であった。
- 4、NSCLC 101 例における免疫組織化学的解析の結果、SCCA の 84.4% (27/32)、肺腺癌の 29.2% (19/65) で発現を認めた。*AKR1B10* は、正常扁平上皮や正常肺では陰性であったが、時に SCCA の前癌病変である扁平上皮化生や異形成でも観察された。
- 5、*AKR1B10* の局在は主に癌細胞の細胞質であったが、一部の細胞では核にも認められた。肺癌細胞株に対する共焦点顕微鏡解析でも、通常培養条件下では同様の所見であったが、コンフルエント条件下では核への染色は認められなかった。

6、単変量解析では、NSCLCにおいて、AKR1B10発現とSCCA($p < 0.0001$)、喫煙($p < 0.0001$)の間に正の相関を認めた。肺腺癌のみでも、AKR1B10発現と喫煙との間に正の相関($p < 0.01$)を認めた。多重回帰分析では、喫煙が、NSCLC ($P < 0.01$)及び肺腺癌($P < 0.01$)で、AKR1B10発現に影響を与える独立因子であった。

【考察】

Aldo-keto reductase は様々なカルボニル化合物の還元を触媒するNAD(P)H依存性酸化還元酵素である。AKR1B10はこのファミリーに属し、芳香族及び脂肪族アルデヒド基を還元する。

当初の研究目的は、現在用いられている、一般に扁平上皮細胞特異的なSCCAマーカーとは異なるSCCA特異的分子を同定することであった。抽出の段階で、これら扁平上皮細胞のマーカーを除き、扁平上皮細胞ではなく扁平上皮癌に特異的な遺伝子としてAKR1B10を同定した。AKR1B10は80~90%もの肺の扁平上皮癌で発現していたが、正常な気管支上皮、皮膚や食道の扁平上皮には発現していなかった。この特徴は、ケラチン5/6との比較でも検証された。

本研究で、AKR1B10が喫煙と密接に関連するSCCAで発現していることを示した。加えて、同様に喫煙と関連がありSCCAの前癌状態とみなされている化生や異形成においても発現を認めた。予想外に、肺腺癌の1/3近い症例で発現していたが、喫煙が肺腺癌においてAKR1B10発現の最も重要な決定因子であることが多重回帰分析により示された。肺腺癌は発現プロファイルに基づくいくつかのサブクラスに分類されると報告されている。約40%の肺腺癌が喫煙者に起こるという最近の報告をあわせると、AKR1B10は喫煙と関連する一部の肺腺癌を特徴づける可能性がある。

扁平上皮癌の多段階発癌への、AKR1B10のどのような関与が考えられるか？次の2つの可能性がある；1つは、AKR1B10が細胞の増殖に関与している可能性である。AKR1B10は我々が以前報告した予後不良因子(Ki67、cyclinE等)との間に正の相関を認めた。さらに、AKR1B10の核への局在は、コンフルエント条件下で消失した。これらの結果は、AKR1B10が細胞周期の間に移行し、何らかの方法で細胞周期の調節に関与している可能性を示唆する。

もう一つは、AKR1B10が β カロチンのレチノイン酸(RA)への変換に拮抗するその酵素活性によりSCCAの発癌を促進するのではという可能性である。RAの欠乏は気道上皮の扁平上皮化生や異形成を引き起こすことが報告されている。多くの癌標本の解析を通じて、SCCAの化生・異形成部位でのAKR1B10の染色を認めた。本研究では、化生を含む標本は少数であったため、特異性肺線維症の標本でさらに検討したところ、扁平上皮化生の41%(23/56)でAKR1B10陽性であった。これらの結果は、AKR1B10が前癌状態において陽性で、RAを減少させる可能性があり、その結果、SCCAの発癌に関与するかもしれないことを示唆する。AKR1B10は解毒に関与する酵素であり、何らかのタバコ中の化学物質により直接誘導されるかもしれない。興味深いことに、我々はまた、喫煙と関連がある咽喉頭及び食道の扁平上皮癌でのAKR1B10の高頻度な発現と食道過形成や異形成での発現を認めた。扁平上皮癌特異的なAKR1B10の発現亢進が高頻度に見られることから、扁平上皮癌発癌におけるAKR1B10の関与について更なる研究が望まれる。

β カロチン等のレチノイドが、乳癌、皮膚癌、腎癌を含めた幾つかの癌の治療や予防に有効であることが報告されているが、 β カロチンによる肺癌の臨床化学予防試験は無効であった。この結果の基礎を成す分子機構は現在のところ解っていないが、喫煙者の気管支上皮における前癌病変でのAKR1B10の発現亢進が、肺において観察された β カロチンの無効性を一部には説明するかもしれない。

【結語】

我々は、AKR1B10が、喫煙と密接な関係があるSCCA患者の大部分と喫煙者の肺腺癌患者の多くで高発現であり、前癌病変でも発現していることを示した。その、RA代謝経路への関与を考慮すると、AKR1B10は単なる代理指標ではなく、喫煙関連NSCLC発癌に関与する分子である可能性がある。AKR1B10の喫煙者NSCLCに対する診断マーカーとしての可能性に加えて、化学予防や治療の標的としての可能性を評価するために、今後、発癌におけるその役割の解明が必要である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 笠 原 正 典
副 査 教 授 葛 巻 暹
副 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 西 村 正 治

学 位 論 文 題 名

Over-expression of The Aldo-keto Reductase Family Protein AKR1B10 Is Highly Correlated with Smokers' Non-Small Cell Lung Carcinomas

(アルド-ケト リダクターゼ ファミリー蛋白である AKR1B10の
発現亢進は喫煙者の非小細胞肺癌と強く相関する)

肺扁平上皮癌 (SCCA) と肺腺癌は、組織学及び疫学的に明らかに異なるにもかかわらず、非小細胞肺癌 (NSCLC) として包括的に治療されている。そこで、両者の分子レベルでの違いを明らかにするため、マイクロアレイを用いて、SCCA 特異的分子を同定し、その臨床的有用性を検討した。SCCA5 例、肺腺癌 5 例、小細胞肺癌 10 例、27 正常組織、40 癌細胞株について、約 40000 遺伝子の発現解析が可能な Affymetrix 社 Gene chip U133 を用いた解析を行い、SCCA 特異的に高発現している遺伝子を探索した。その結果、*Aldo-keto reductase family 1, member B10 (AKR1B10)* を含む 7 遺伝子を同定し、肺癌で報告のない *AKR1B10* について解析を行った。定量的 PCR にて、*AKR1B10* の SCCA での発現を確認した後、癌組織における蛋白レベルでの発現を検討するため、ヒト *AKR1B10* の完全長 GST-融合蛋白を免疫することでモノクローナル抗体を作成した。免疫ブロット解析にて SCCA 癌部での蛋白発現を確認し、アーカイブ標本 (SCCA23 例、腺癌 24 例、正常気管支上皮、正常扁平上皮) を用いた免疫組織化学的解析にて Keratin5/6 との比較を行った。keratin5/6 は肺腺癌陰性で、扁平上皮癌の 83% で陽性だったが、正常気管支上皮や正常扁平上皮でも陽性だった。一方、*AKR1B10* は正常上皮では陰性であり、keratin5/6 とは違って、単なる扁平上皮細胞マーカーではなく癌特異的マーカーであることが示された。さらに、上記サンプルとは別の NSCLC 101 例における免疫組織化学的解析を行ったところ、SCCA の 84.4% (27/32 例)、肺腺癌の 29.2% (19/65 例) で発現を認めた。*AKR1B10* は、正常扁平上皮や正常肺では陰性であったが、時に SCCA の前癌病変である扁平上皮化生や異形成でも観察された。そこで、前癌病変での発現の可能性を検証するため、特発性肺線維症 24 例における扁平上皮化生 56 病変につい

て検討した。その結果、扁平上皮化生の41%で陽性であり、一方、背景の94正常気管支では全て陰性だった。AKR1B10と臨床的特徴との相関を統計的に検討したところ、単変量解析では、NSCLC($p < 0.0001$)及び腺癌($p < 0.01$)ともにAKR1B10発現と喫煙の間に正の相関を認めた。多重回帰分析でも、喫煙が、NSCLC($P < 0.01$)及び肺腺癌($P < 0.01$)で、AKR1B10発現に影響を与える独立因子であった。AKR1B10はレチノイン酸合成の律速反応であるレチナールをレチノールに還元する反応を触媒する酵素であり、レチノイン酸の生理活性に重要な役割を果たす。レチノイン酸は気道の正常な分化を促進し、SCCA発癌を抑制することが知られ、レチノイン酸欠乏の結果SCCA発癌が促進されることも報告されている。我々の検討の結果、SCCAの前癌病変及び癌部でのAKR1B10発現が認められたが、それによりレチナールが還元され、その結果、レチノイン酸減少に伴う癌化が進展する可能性がある。

本研究により、AKR1B10は喫煙者の非小細胞肺癌とくに扁平上皮癌に関与しており、また、前癌病変でも一部に発現していることから、レチノイン酸合成抑制を介する発癌に関与している可能性が示された。従って、AKR1B10の喫煙者非小細胞肺癌に対する診断マーカーとしての可能性に加えて、化学予防や治療の標的としての可能性を評価するために、今後、発癌におけるその役割の解明が必要と思われる。審査にあたり、副査葛巻教授より、1)他のisoformでの同様の報告の有無や癌への関与、2)発癌物質との関連についての質問があり、副査西村教授より1)胎生期での発現、2)発癌に直接関与する分子である証拠、3)肺扁平上皮癌でAKR1B10蛋白が発現してくる理由についての質問があった。また、副査秋田教授より1)AKR1B10の癌での機能解析についての展望、2)診断マーカーなど臨床への応用の可能性についての質問があった。次いで、主査笠原教授より、1)AKR1B10陽性例と陰性例の臨床的な違い、2)肺以外の扁平上皮癌での発現の意義3)AKR1B10の転写調節、4)喫煙関与の検討方法についての質問があった。申請者はこれらの質問に対して、自験データと文献を引用して概ね適切な回答を行った。

審査員一同は、本研究が、喫煙関連肺非小細胞肺癌とくに肺扁平上皮癌発癌におけるAKR1B10の関与を初めて明らかにした点で高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。