

学位論文題名

Characterization of an Opa Interacting Protein 5 (OIP5)

Involved in Lung and Esophageal Carcinogenesis

(肺癌・食道癌の進行に関わる癌抗原OIP5の同定)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 肺癌・食道癌は共に悪性度の高い癌種であり、肺癌は本邦の悪性腫瘍による死亡数の第1位である。治療としては外科的切除、放射線化学療法による集学的治療が行われているものの未だ良好な治療成績が得られず、新たな治療法・診断法の開発が急務である。そこで我々は肺癌・食道癌において高頻度、高レベルに発現が上昇している遺伝子を同定し、その遺伝子の機能解析を行うことによって新規分子標的候補を見出すことを目的とした。

【対象と方法】 27,648 遺伝子からなる cDNA マイクロアレイを用いて肺癌・食道癌の網羅的遺伝子発現情報解析を行い、肺癌および食道癌組織において高頻度、高レベルに発現上昇している遺伝子を抽出した。抽出した複数の遺伝子に対し半定量的 RT-PCR を施行し、癌における発現の確認をすると共に、Multiple tissue northern blot を用いて正常組織での発現を確認した。これらの発現確認実験により、癌に特異的な発現をしている遺伝子として Opa interacting protein 5 (OIP5) が同定された。さらに新規診断マーカーや新規治療薬開発に向けた標的分子抽出のための high-throughput screening の延長として siRNA を用いた遺伝子発現阻害実験、肺癌・食道癌組織アレイを用いた免疫組織学的検討を行った。

OIP5 は Opa タンパクと結合するタンパクとして、Hela 細胞 cDNA ライブラリーを用いたスクリーニングにより同定された。Opa は *Neisseria Gonorrhoeae* において人の粘膜上皮などへの接着に必要なタンパクとされている。OIP5 に関してはこれまでにヒトの肺癌・食道癌での報告はなされておらず、癌悪性化との関連は未知のタンパクである。そこで我々は、OIP5 の予後診断マーカーとしての有用性と新規治療法開発のための機能解析を行った。

肺癌・食道癌組織試料：埼玉がんセンターにおいてインフォームドコンセントの得られた非小細胞肺癌患者 336 症例から切除された癌組織と、それぞれの症例に対応した非癌部組織、また北海道大学病院第二外科および恵佑会札幌病院において食道癌患者 305 症例から切除された癌組織と、それぞれの症例に対応した非癌部組織を用いて作製された組織マイクロアレイを用いて、免疫組織学的検討を行った。同様にインフォームドコンセントの得られた肺癌・食道癌患者由来の試料を用いて total RNA を抽出し、半定量的 RT-PCR を行った。

免疫組織学的検討：抗体は市販の anti-OIP5 ポリクローナル抗体を用いた。肺癌・食道癌組織アレイの判定は 3 名の臨床情報未知の医師の判定により行い、生存分析では Stat View statistical program (SaS) により log rank test を用いて p value 0.05 未満を有意差ありと判定した。

【結果】 OIP5 は正常肺、正常食道いずれでも発現を認めず、癌において mRNA レベルで強く発現している遺伝子であることが肺癌・食道癌臨床検体、細胞株を用いた半定量的 RT-PCR により示された。一方、OIP5 は Multiple tissue northern blot により正常臓器では精巣にのみ発現しており、癌精巣抗原である可能性が示唆された。

非小細胞肺癌細胞株 LC319、小細胞肺癌 SBC-5、食道癌細胞株 TE2 を用いた siRNA による発現阻

害実験において、OIP5 の発現抑制による細胞増殖抑制効果を認めた。

非小細胞肺癌、食道癌組織マイクロアレイを用いた免疫組織学的検討を施行し、OIP5 が非小細胞肺癌、食道癌組織において高頻度に発現していることを確認した。このタンパクを強く発現する症例は発現しない症例に比して有意に予後不良であることが示された。多変量解析を用いた検討では非小細胞肺癌において独立した予後因子であった。

以上より、この分子が肺癌・食道癌細胞の悪性化に関与する有望な治療標的であり、かつ有用な予後マーカーと考えられた。

OIP5 は Raf1 の結合タンパクであることが報告されており、我々はそこに着目して OIP5 と Raf1 との結合を免疫沈降にて確認した。Western blot 法により OIP5、Raf1 の発現を確認したところ、両者の発現が類似していることを確認した。OIP5 は Raf1 の発現に影響を受けていると考え、siRNA を用いた発現阻害実験、および発現ベクターを用いた実験において、Raf1 のタンパク量に依存して OIP5 タンパク量が増加することを確認した。

【考察】 我々は新規診断マーカー、新規分子標的治療薬開発のためのマイクロアレイシステムを用いて、網羅的遺伝子・タンパク発現情報解析を行うことにより、癌特異的に発現上昇を認め、正常臓器では精巣にのみ発現を認める OIP5 を同定した。

OIP5 は LAP2a と結合し cell cycle に関わること、centromere での細胞分裂に関わることなど *in vitro* の報告はあるものの、ヒトの癌における機能的な報告はなされておらず、癌悪性化との関連は未知の分子である。

本研究において組織アレイを用いた検討により、OIP5 の発現は非小細胞肺癌、食道癌患者の予後と有意な相関を認めた。また、一過性発現系および siRNA を用いた検討により、細胞増殖との関連を認め、OIP5 の発現上昇がヒトの癌悪性化に重要な役割を示すことが類推された。

また、OIP5 の発現が Raf1 の影響下にあることが見出された。Raf1 は MAPK pathway の重要な役割を担っており、癌細胞の増殖・生存に関与する重要な分子である。本研究では Raf1 に依存する OIP5 のタンパク量の変化が見られたことから、Raf1 と OIP5 の結合阻害が治療標的となる可能性が示唆された。

【結論】 OIP5 は精巣以外の正常臓器では発現しておらず、肺癌・食道癌で高頻度、高レベルの発現を示す分子で、癌細胞の増殖や生存に極めて重要な分子であると考えられた。新規分子標的薬の治療候補、および予後予測バイオマーカーへの応用の可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 平 野 聡
副 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 松 野 吉 宏

学位論文題名

Characterization of an Opa Interacting Protein 5 (OIP5) Involved in Lung and Esophageal Carcinogenesis

(肺癌・食道癌の進行に関わる癌抗原OIP5の同定)

肺癌・食道癌は共に悪性度の高い癌種であり、外科的切除、放射線化学療法による集学的治療が行われているものの未だ良好な治療成績が得られず、新たな治療法・診断法の開発が急務である。そこで我々は肺癌・食道癌において高頻度、高レベルに発現が上昇している遺伝子を同定し、その遺伝子の機能解析を行うことによって新規分子標的候補を見出すことを目的とした。

27,648 遺伝子からなる cDNA マイクロアレイを用いて肺癌・食道癌の網羅的遺伝子発現情報解析を行い、肺癌および食道癌組織において高頻度、高レベルに発現上昇している遺伝子として Opa interacting protein 5(OIP5)が同定された。

OIP5 は正常肺、正常食道いずれでも発現を認めず、癌において mRNA レベルで強く発現している遺伝子であることが肺癌・食道癌臨床検体、細胞株を用いた半定量的 RT-PCR により示された。Multiple tissue northern blot により正常臓器では精巣にのみ発現しており、癌精巣抗原である可能性が示唆された。非小細胞肺癌細胞株 LC319、小細胞肺癌 SBC-5、食道癌細胞株 TE2 を用いた siRNA による発現阻害実験において、OIP5 の発現抑制による細胞増殖抑制効果を認めた。

非小細胞肺癌、食道癌組織マイクロアレイを用いた免疫組織学的検討を施行し、OIP5 が非小細胞肺癌、食道癌組織において高頻度に発現していることを確認した。このタンパクを強く発現する症例は発現しない症例に比して有意に予後不良であることが示された。多変量解析を用いた検討では非小細胞肺癌において独立した予後因子であった。

OIP5 は Raf1 の結合タンパクであることが報告されており、我々はそのに着目して OIP5 と Raf1 との結合を免疫沈降にて確認した。OIP5 は Raf1 の発現に影響を受けていると考え、siRNA を用いた発現阻害実験、および発現ベクターを用いた実験において、Raf1 のタンパク量に依存して OIP5 タンパク量に変化することを確認した。

本研究において組織アレイを用いた検討により、OIP5 の発現は非小細胞肺癌、食道癌患者の予後と有意な相関を認めた。また、一過性発現系および siRNA を用いた検討により、細胞増殖との関連を認め、OIP5 の発現上昇がヒトの癌悪性化に重要な役割を示すことが類推された。また、OIP5 の発現が Raf1 の影響下にあることが見出された。Raf1 は MAPK pathway の重要な役割を担っており、癌細胞の増殖・生存に関与する重要な分子である。本研究では Raf1 に依存する OIP5 のタンパク量の変化が見られたことから、Raf1 と OIP5 の結合阻害が治療標的となる可能性が示唆された。以上より OIP5 は新規分子標的薬の治療候補、および予後予測バイオマーカーへの応用の可能性が示唆された。

口頭発表に続き、副査秋田弘俊教授より①肺癌、食道癌以外での発現情報について、②この分子の今後の応用に関する展望について質問があった。続いて副査松野吉宏教授より①腺癌の発現頻度が扁平上皮癌に比して少ないが、腺癌における臨床応用の可能性はあるのか、②既知の分子標的に対する治療無効もしくは適応とならない症例に対する有効性は見込めるのか、という質問があった。最後に主査平野聡教授より①今回の遺伝子の他に候補となる遺伝子はなかったのか、②精巢抗原とする根拠はどこにあるのかという質問があった。他、フローアより、半定量的 RT-PCRでの発現頻度と、TMAでの発現頻度に解離はないかとの質問があった。

いずれの質問に対しても申請者はその主旨をよく理解し、自らの研究内容と文献的考察を交えて適切に回答した。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、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医学博士の学位を受けるのに十分な資格を有すると判断した。