

学位論文題名

Studies on a cancer-testis antigen CSTF2 as a novel biomarker for lung cancer

(肺癌における新たなバイオマーカーとしての癌精巢抗原CSTF2の研究)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】肺癌は多くの国において癌死の上位を占める疾患である。一般的に肺癌の早期診断は困難であり 現在においても予後の悪い疾患に変わりはない。また、肺癌治療につながる肺癌の様々な遺伝子学的な変化は報告されているが、肺癌における発癌の詳細な分子のメカニズムは解明されていない。肺癌の発癌メカニズムに関与している診断および治療標的分子を同定するために cDNA マイクロアレイ技術を用いゲノムワイドの遺伝子の発現プロファイルを解析することは有効であり、我々は、各種の組織系・病期の肺癌患者 120 症例の腫瘍組織より Laser microdissection 法を用いて癌細胞を選択的に回収し、27,648 の遺伝子と EST をカバーする cDNA マイクロアレイ解析を行いた遺伝子発現プロファイル解析を行った。この結果、Cleavage Stimulation Factor, 3' pre-RNA, Subunit 2, 64kDa (CSTF2) 遺伝子が、大多数の原発性肺癌で発現亢進していることを発見した。CSTF2 は、N 末端に Ribonucleoprotein (RNP) 型 RNA 結合ドメインを有している核タンパク質である。CSTF2 は分裂刺激因子複合体を形成するタンパク質の 1 つであり、*In vitro* における分裂刺激因子の構成タンパク質としての CSTF2 の機能は報告されているが、発癌メカニズムにおける CSTF2 活性化の重要性やバイオマーカーや治療標的分子としての可能性はいまだ報告されていない。本研究により、CSTF2 が新しい診断マーカー、治療標的分子、ならびに免疫治療の標的となりうるか検討した。

【材料と方法】肺癌細胞における CSTF2 の発現上昇を確認するために、肺癌臨床検体、および肺癌細胞株を用いて半定量的 RT-PCR 解析、ウェスタンブロット解析を施行した。また、正常臓器における CSTF2 の発現を検討するために multiple tissue northern blot 解析を施行した。肺発癌における CSTF2 の生物学的、また臨床病理学的重要性を確認するために、埼玉がんセンターで外科的切除した原発性非小細胞肺癌患者の組織より組織マイクロアレイを作製し、免疫組織化学的解析を行ない、CSTF2 の発現と原発性非小細胞肺癌患者の予後との関連を検討した。CSTF2 が肺癌細胞の増殖、生存にどのような影響を及ぼすか検討するために、肺癌細胞株である A549 細胞と LC319 細胞へ CSTF2 に対する合成オリゴヌクレオチド siRNAs を導入して CSTF2 発現阻害実験を行った。また、CSTF2 発現プラスミドを作製し、細胞の増殖、浸潤に与える影響を検討した。

【結果】肺癌臨床検体を用いた半定量的 RT-PCR では CSTF2 が肺腺癌、扁平上皮癌、小細胞肺癌において高頻度、高レベルの発現を認め、正常肺では発現を認めなかった。また肺癌細胞株における半定量的 RT-PCR においても同様に、肺癌細胞株において高頻度、高レベルの発現を認め、正常気道上皮由来株である SAEC では発現を認めなかった。肺癌細胞株における蛋白質レベルでの CSTF2 の発現を確認するために CSTF2 特異的抗体を用いてウェスタンブロット解析を施行したところ、mRNA レベルでの発現と同様に肺癌細胞株において発現を認め、正常気道上皮株である SAEC では発現を認めなかった。同抗体を用

い細胞免疫染色で細胞内局在を確認したところ CSTF2 の核局在を確認した。CSTF2 の正常臓器における発現を確認するために multiple tissue northern blot を施行したところ精巣においてのみ CSTF2 遺伝子と考えられる band を認めたが、他臓器に発現を認めなかった。また、抗 CSTF2 抗体を用いた免疫組織染色によりヒト正常組織における蛋白質レベルでの発現を確認したところ、multiple tissue northern blot と同様、心、肺、肝、腎の重要 4 臓器に発現を認めず、精巣、そして肺癌組織においてのみ発現を認めた。肺癌臨床検体における蛋白質レベルでの発現について、抗 CSTF2 抗体をもちいた組織免疫染色で確認したところ、癌組織で核に染色を認め、正常肺において発現を認めなかった。組織マイクロアレイを用いて肺癌患者の予後との関係を検討したところ、CSTF2 強陽性症例において CSTF2 陰性群および弱陽性群に比較し有意差をもって予後が不良であった。単変量解析では CSTF2 の強陽性、年齢、性別、組織系、T 因子、N 因子に有意な予後不良との相関を認め、多変量解析では CSTF2 の強発現、年齢、T 因子、N 因子が独立した予後不良因子であった。癌細胞の増殖・生存への関与を検討する目的に、CSTF2 高発現株である A549 細胞、LC319 細胞を用いて発現阻害実験 (RNAi assay) を行ったところ、siCSTF2 コンストラクトにおいて mRNA レベルでのノックダウン効果を認め、MTT assay においてそれに一致した細胞増殖抑制効果を認めた。CSTF2 ノックダウン効果についてフローサイトメトリーをもちいて解析したところ siCSTF2 を導入した A549 細胞においてコントロールに比較し導入後 72 時間の時点において subG1 期の細胞比率が増加していることを確認した。以上より CSTF2 を発現阻害することでアポトーシスを誘導する可能性が示唆された。さらなる細胞増殖・生存への関与を検討するために、CSTF2 発現ベクターを作成し COS7 細胞に一過性強制発現させたところ、ウェスタンブロットでは 64kDa 付近に band を認めた。同発現ベクターを用いて growth assay を行い細胞増殖に与える影響を検討したところ、Mock に比較し有意な細胞増殖促進効果を認めた。

【考察】CSTF2 は、557 のアミノ酸からなるタンパク質をコードする遺伝子であり、その N 末端に RNP 型 RNA 結合ドメインを有している。CSTF2 は哺乳類 mRNA 前駆体のプロセシングにおいてポリアデニル化や、3'末端の切断に関与している CstF 複合体の一つを構成している。本研究において、我々は、CSTF2 遺伝子が多くの肺癌において過剰発現し、また、肺癌細胞の生存、増殖に重要な役割を果たすことを証明した。また、組織マイクロアレイ解析による肺癌患者の臨床病理的因子との相関を検討した結果、CSTF2 発現が強陽性の NSCLC 患者が、CSTF2 弱陽性もしくは陰性の NSCLC 患者と比較し、手術後の予後が不良であること示した。これは、本研究は癌組織における CSTF2 発現の有無がヒト癌の予後マーカーとなりうる可能性を証明した最初の報告である。以上より、CSTF2 は肺癌の生存、増殖に重要な役割を果たし、手術後摘出標本による CSTF2 強陽性は、予後不良因子であり、肺癌患者への術後補助化学療法の有効な指標となりうる可能性を示唆した。さらに、本研究は、分子標的としての選択的な CSTF2 の機能阻害が、新規抗癌剤として有用である可能性が示唆された。

【結論】以上より、CSTF2 は肺癌の増殖/進行に重要な役割を果たし、肺癌組織での CSTF2 過剰発現は、肺癌患者の予後へ関与しており術後補助化学療法に対する有用な指標となる可能性があること、さらに分子標的としての選択的な CSTF2 の阻害が、新規抗癌剤として有用である可能性が示唆された。今後 CSTF2 のさらなる機能解析により、臨床応用等へ研究が発展することが期待される。

学位論文審査の要旨

主査	准教授	濱田	淳一
副査	教授	野口	昌幸
副査	教授	武富	紹信
副査	教授	平野	聡

学位論文題名

Studies on a cancer-testis antigen CSTF2 as a novel biomarker for lung cancer

(肺癌における新たなバイオマーカーとしての癌精巣抗原CSTF2の研究)

本研究は、癌精巣抗原 CSTF2 の発現および機能解析を行い、肺癌の予後マーカーおよび新規治療標的分子としての CSTF2 の有用性を報告したものである。副査の野口教授が体調不良により欠席されたため、学位審査は 3 名の審査員により非公開で行われ、申請者の発表後、質疑応答が行われた。

副査 武富教授より本研究のきっかけとなったcDNAマイクロアレイ解析の結果から数多くの解析候補遺伝子が挙っていたが、その中からCSTF遺伝子を選択した理由について質問があった。申請者はCSTF2を解析候補遺伝子として選択した理由について、マイクロアレイのデータ上、癌における発現、特異性の高さに加え、癌における既報告がなく、その新規性を重視したことを挙げた。続いてCSTF2以外のCleavage stimulation factor複合体を構成する蛋白質であるCSTF1およびCSTF3の癌細胞および正常臓器における発現について質問があった。申請者はCSTF1とCSTF3は癌細胞特異的な発現パターンを示さず、多くの正常臓器において発現している遺伝子である旨回答した。引き続きCleavage stimulation factor複合体の構成蛋白群においてCSTF2のみが癌特異的に発現している意義についての質問があった。申請者はCSTF2にはvariant遺伝子CSTF2Tが存在し、このCSTF2Tの発現が正常臓器において高いことから、正常細胞ではCSTF2TがCleavage stimulation factor複合体の機能を担っている可能性を回答した。

濱田准教授より、肺癌以外の他の癌種におけるCSTF2の発現について質問があった。申請者はマイクロアレイ解析において、肺癌の他、膀胱癌、子宮頸癌でCSTF2の発現が上昇

している旨回答した。次に、CSTF2が細胞免疫染色において核に発現しているが、核の中での局在に関連した機能についての質問があった。申請者はCSTF2が核の中で不均一に分布しており、機能を解析する上で重要な指標となりうる可能性があること、また、今後の解析対象とすべきである旨を回答した。また、血液中にCSTF2が検出されるか否かにつき質問があった。申請者は抗CSTF2抗体を用いたELISA等による検討を施行していないが、血清のMS解析にてCSTF2は同定されず、血液中ではCSTF2は検出されない可能性が高いと回答した。

最後に副査 平野教授より癌精巣抗原を治療標的とする意義について質問があった。申請者は、正常臓器では精巣でのみ発現していること、悪性腫瘍は多くは、生殖年齢を過ぎてからの発症することが多いこと、また、希望者には精子保存等の手段も選択可能であること、ならびに癌精巣抗原はワクチン作製の際に免疫誘導も得られやすく治療標的分子として適している旨回答した。次に、組織マイクロアレイを用いた非小細胞肺癌患者の予後解析において、年齢が独立した予後不良因子となっている理由についての質問があった。申請者は本検討で用いた症例はリンパ節転移陽性例に対するadjuvant therapyでCDDPをベースに1剤追加する他は特に制約を設けていないため、追加治療の可否も年齢でみられた有意差に影響した可能性がある旨回答した。続いて組織マイクロアレイにおいて同一患者の腫瘍採取部位によってCSTF2の発現強度や細胞の悪性度に不均一性がある可能性について質問があった。申請者はCSTF2の発現強度の同一患者組織内での不均一性は少なく、また、悪性度の不均一性を考慮し、同一患者の癌組織より複数の領域を採取している旨回答した。さらに、本研究で得られた知見を臨床の場で活かす方策および展望について意見を求められた。申請者はDrug delivery systemの確立が問題となるが、siRNAを用いた創薬や癌ワクチンといった免疫治療への応用の可能性がある旨を回答した。

今回の研究により、CSTF2は肺癌および精巣に特異的に発現していること、肺癌組織でのCSTF2過剰発現は肺癌患者の予後に関与しており術後補助化学療法の要否を決定する指標となりうること、ならびにCSTF2は非小細胞肺癌の分子標的として有用であることが示唆された。

欠席された野口教授とは、後日主査濱田准教授が論文および審査の内容について協議を行った。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、申請者が博士(医学)の学位を授与されるのに十分な資格を有すると判定した。