

学 位 論 文 要 旨

氏 名 小林 信



論文題目 「抗体を活用した肺癌の血清・組織診断マーカー候補
タンパク質の獲得」

指 導 教 授 承 認 印

佐藤 雄一



「抗体を活用した肺癌の血清・組織診断マーカー候補タンパク質の獲得」

氏名 小林 信

【目的と背景】

肺癌は肺癌とともに難治性癌の代表であり、本邦では男性癌死の第1位、女性でも第2位を占めている。また初診時にすでに Stage III 以上の進行癌であることが多く、化学療法としてはプラチナ製剤を用いた多剤併用療法が用いられているが、その効果は依然として不十分であることが予後不良の原因と考えられる。

肺癌は約 80%を占める非小細胞性肺癌 (NSCLC) と、約 20%を占める小細胞性肺癌 (SCLC) に大別され、前者はさらに肺腺癌 (AC)、肺扁平上皮癌 (SCC) と大細胞癌等に分類されている。NSCLC の血清診断マーカーとして AC では CEA、SLX、SCC では CYFRA21-1 等が知られている。しかし、いずれも臓器特異性や腫瘍特異性が低く早期診断への応用は難しいのが現状であり、新たな診断マーカーの獲得が求められている。

新規マーカーの主な獲得方法は、患者血清中の腫瘍関連抗原タンパク質を直接探索する方法であるが、血清中に約 99 %含まれているアルブミン・免疫グロブリン等の主要血清タンパク質がその探索を困難にしている。そこで、ランダム免疫法を用いて作製した腫瘍と特異的に反応するモノクローナル抗体と、癌患者血清中で早期かつ高感度に検出が可能であると報告のある自己抗体の「2種の抗体を活用した」新規診断マーカー候補タンパク質の獲得を行った。特に前者では獲得したモノクローナル抗体の中から抗 Carbonic anhydrase XII (CAXII) 抗体に着目し、肺癌組織や肺癌患者血清等の臨床材料を用いた多検体評価を行い、臨床への応用を目指した検討を行った。後者では AC における同一患者の癌組織と血清を用いた自己抗体の探索を行い、既存の方法では獲得できない腫瘍間質由来タンパク質を抗原とする自己抗体の獲得を試みた。

【材料と方法】

1. モノクローナル抗体の作製及び有用性の評価

AC 由来細胞株 A549 細胞を免疫源に、BALB/c マウスに2週間おきに3回免疫を施行、脾臓摘出後にマウス骨髄腫細胞株 SP-2/O と細胞融合を行い、ハイブリドーマを作製した。限界希釈を2回行い、モノクローナル抗体を樹立した。免疫源に用いた A549 細胞で発現亢進を認めた Ku-Lu-5 抗体については免疫沈降法による抗原タンパク質の同定を行ったのち、AC 由来細胞株 A549、LC-2/ad、SCC 由来細胞株 RERF-LC-AI、SCLC 由来細胞株 N231、大細胞性神経内分泌肺癌 (LCNEC) 由来細胞株 LCN1 を用いた免疫ブロット (IB) 法、免疫染色 (IHC) 法により発現の程度と局在の解析を行った。さらに、この抗体を用いて血清中のタンパク質量を肺癌患者 96 例、健常者 60 例を対象としたドットブロット法により測定した。

2. 同一 AC 患者の癌組織と血清を用いた自己抗体の探索

北里大学病院にて外科切除された3例の肺腺癌組織と同一患者の血清を用いて、2次元電気泳動 (2-DE) 法と IB 法を組み合わせた 2DE-IB 法を行い、自己抗体の認識する抗原タンパク質の獲得を行った。この中から Annexin A2 (ANXA2)、Transforming growth factor ig-h3 (BIGH3)、Macrophage capping protein (CAPG)、Hyaluronan and proteoglycan link protein 1 (HAPLN1) の4種については抗原タンパク質が検出された肺癌組織と各種肺癌細胞株における発現と局在を解析し

た。

【結果】

1. CAXII モノクローナル抗体

本作製法により免疫に用いた A549 細胞の様々な部位に発現を認める 188 個の抗体産生クローンを樹立した。この中の Ku-Lu-5 抗体は各種肺癌細胞株を用いた IB 法、IHC 法より AD 由来細胞株にのみ強い発現を認め、免疫沈降法の結果 CAXII を認識する抗体であることが明らかとなった。AC 28 例、SCC 9 例の肺癌組織を用いた IHC 法より、AC 2/28 (7.1%)、SCC 2/9 (22.2%) で腫瘍細胞の細胞膜に染色を認めた。ドットブロット法による血清中 CAXII 抗原タンパク質の測定は Training set (肺癌 70 例、健常者 30 例) と Validation set (肺癌 26 例、健常者 30 例) の 2 群に分けて行った。前者では健常者に比して肺癌患者で有意な発現亢進 ($P < 0.01$) を認め、ROC 解析により $AUC = 0.794$ で両者を鑑別できることが分かった。さらに AC に比して SCC で有意 ($P < 0.03$)、SCC では低分化型に比して高・中分化型で有意な発現亢進を認めた ($P < 0.02$)。Validation set での測定においても健常者に比して肺癌患者で有意な発現の亢進を認めた ($P < 0.03$)。

2. 同一 AC 患者の癌組織と血清を用いた自己抗体の獲得

2DE-IB 法の結果、癌組織を用いた検討から計 58 スポット (45 種)、AC 由来細胞株を用いた検討から計 53 スポット (41 種) の自己抗体が認識する抗原タンパク質を検出、同定した。内訳は癌組織のみから検出されたもの 36 種、細胞株のみから検出されたもの 32 種、両者に共通に共通して検出されたものは 9 種のタンパク質であった。癌組織のみから検出されたものの中で、ANXA2、CAPG、HAPLN1 は腫瘍細胞に加えて腫瘍間質の線維芽細胞やリンパ球にも局在が認められ、BIGH3 は腫瘍細胞における発現は認められず、腫瘍間質の線維芽細胞やリンパ球に発現が認められた。

【考察】

1. CAXII モノクローナル抗体

NSCLC や浸潤性乳癌患者において、CAXII の発現亢進群の予後は低発現群に比して良好であるとの報告がされている。一方、星状細胞腫組織における発現の亢進は予後不良であるとの相反する報告もされている。腫瘍における CAXII タンパク質における報告の多くは腫瘍組織中の発現を対象にしており、患者の血清におけるタンパク質量の報告は未だされていない。今回の肺癌組織を用いた IB と IHC の相関性の検討では、IHC での腫瘍組織における陽性率の低さが影響し得られていない。よって、腫瘍組織での発現と患者血清中での濃度の相関性は不明であるが、肺癌患者血清中の発現量は健常者に比して有意に高く、ROC 解析からも CAXII は肺癌の新規血清診断マーカーとしての有用性が示唆された。

2. 同一 AC 患者の癌組織と血清を用いた自己抗体の獲得と有用性の評価

生体内における「癌」は腫瘍細胞だけではなくリンパ球、マクロファージを含む炎症性細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞等のいわゆる腫瘍間質を構成する多種多様な成分から成り立って

いる。また、腫瘍細胞の周囲の微小環境を形成する腫瘍間質は腫瘍細胞の接着、増殖、進展に大きく関与しており、これらに由来する分子を探索することが新規バイオマーカーや抗癌剤の分子標的となり得ることが報告されている。さらに腫瘍間質に局在する繊維芽細胞は腫瘍の浸潤、転移に大きな影響を及ぼすとの報告からも、腫瘍細胞に加え、腫瘍間質成分に対する自己抗体に着目することでより幅広く腫瘍の浸潤や転移を予測するマーカーの獲得が可能と考えられた。

今回の研究で肺癌組織を用いた場合のみから獲得された ANXA2 は、約 38kDa のリン脂質結合タンパク質である。腫瘍においては胃癌、膵臓癌等の種々の癌において発現の亢進が報告されているが、前立腺癌では逆に発現の低下が報告されている。さらにこのタンパク質は S100A10 タンパク質等と相互作用し Tissue-plasminogen activator と結合、MMP の活性化を通して間接的に腫瘍の浸潤・転移に関与していることが報告されている。これまで、腫瘍における抗 ANXA2 自己抗体に関する詳細な報告はなく、同一 AC 患者の腫瘍組織と血清を用いた自己抗体解析により、癌の早期検出ならびに浸潤転移に関する分子の一つとして獲得に成功した。現在、AC に加えて他組織型肺癌患者血清を追加した検討を行っている。

抗体を基盤としたプロテオミクス手法によるバイオマーカー探索は診断マーカー獲得法として有用であることが報告されている。しかしモノクローナル抗体あるいは自己抗体の片方のみに着目した報告が大半であり、両者を組み合わせた血清・組織診断マーカー獲得の試みはなされていない。自己抗体解析は疾患の早期診断に有用であると報告されており、血中の腫瘍関連タンパク質は腫瘍の進行と共に増加することも報告されている。この2つを組み合わせることで検索することにより、腫瘍の早期から進行癌まで幅広いステージにおける腫瘍関連分子の獲得が可能であり、病態の変化を的確に捉えることができる可能性がある。