

学 位 論 文 要 旨

氏 名

朽津 有紀



論 文 題 目

「TRAP1 is a predictive biomarker of platinum-based adjuvant chemotherapy benefits in patients with resected lung adenocarcinoma (TRAP1 は完全切除された肺腺癌におけるプラチナ製剤を基本とした術後補助化学療法の効果予測マーカーである)」

指 導 教 授 承 認 印

佐藤 雄一



TRAP1 is a predictive biomarker of platinum-based adjuvant chemotherapy benefits in patients with resected lung adenocarcinoma

(TRAP1 は完全切除された肺腺癌におけるプラチナ製剤を基本とした術後補助化学療法の効果予測マーカーである)

氏 名 朽津 有紀

【背景と目的】

悪性腫瘍は世界で罹患率や死亡率が高い疾患の一つであり、本邦における死亡原因の第 1 位である。中でも肺癌は、部位別罹患患者数において男女計第 3 位、部位別癌死亡者数において第 1 位と予後不良の癌である。非小細胞肺癌のうち手術適応患者は、外科治療により原発巣は完全に切除されるが、症状や検査上に現れない微小な転移が存在し、それが時間とともに増殖することにより再発が起こる可能性が報告されている。そのため、再発のリスクを低下させ、予後を改善させることを目的として、stage II-III A 期の非小細胞肺癌では手術後にプラチナ製剤をベースとした術後補助化学療法が標準治療となっている。しかし、その効果は患者によって様々であり、また高齢者やパフォーマンスステータスが良好ではない患者において、重篤な副作用が起こる可能性があるため、施行するか否かの判断が困難である。ゆえに、術後補助化学療法によって効果が得られる患者群を効果的に選び分けるバイオマーカーの獲得は急務な課題であるが、この効果予測マーカーに関する研究は現在ほとんど行われていない。

患者血清中の腫瘍関連抗原タンパク質を認識する自己抗体は免疫応答により増幅されることで、血中の腫瘍関連抗原タンパク質よりも高濃度で存在するため、高感度な検出が可能となる。それゆえ、これらの自己抗体を利用することで検出が困難な少量しか存在しない腫瘍関連抗原タンパク質をマーカー候補タンパク質として獲得することが可能となる。

本研究では stage II-III A 期の術後補助化学療法を受けた肺腺癌患者血清中の自己抗体を用いて、肺腺癌患者の術後補助化学療法に対する新規治療効果予測マーカーの獲得を目指した。

【材料と方法】

肺腺癌患者における術後補助化学療法の効果予測候補タンパク質の探索

2 種の肺腺癌細胞株 (A549, LC-2/ad) からタンパク質を抽出し、等量ずつ混合した後、二次元電気泳動法を用いて展開し、PVDF 膜に転写した。術後補助化学療法を受けた肺腺癌患者のうち、disease-free survival (DFS) が 1 年未満の患者群または 5 年以上の患者群の治療前血清 3 例ずつからなる混合血清を一次抗体として免疫ブロット法を行った。両者で反応性に差を認めた抗原スポットに関しては、対応するスポットを CBB 染色後のゲルから切り出し、トリプシンを用いた in gel digestion 法を行った後、質量分析装置を用いてタンパク質を同定した。

TNF receptor associated protein 1 (TRAP1) 発現の免疫組織化学的解析

2003 年から 2012 年までに北里大学病院において、stage II-III A 期でプラチナ製剤をベースとした術後補助化学療法を受けた肺腺癌患者 64 症例を用いた。腫瘍組織中における TRAP1 の発現量は、腫瘍細胞の各染色強度 (0-3) と陽性細胞の割合 (0-100%) を掛け合わせ合計する H-score

により数値化した後、TRAP1 の発現と臨床病理学的因子との関連性を統計学的に解析した。また、AC 患者 64 症例における TRAP1 染色スコアの中央値を基準として患者群を TRAP1 高発現群と低発現群の 2 群に分け、DFS および overall survival (OS) との関連性についても統計学的に解析した。

肺腺癌細胞における TRAP1 の機能解析

LC-2/ad 肺腺癌細胞株における TRAP1 の機能を明らかにするために、siRNA を用いて TRAP1 の発現を抑制し、細胞増殖や薬剤耐性に及ぼす影響を MTS assay により検討した。

【結果】

肺腺癌患者における術後補助化学療法の効果予測候補タンパク質の探索

患者血清中の自己抗体が認識する抗原タンパク質のうち、DFS が 1 年未満と 5 年以上の両群で反応性に相異を認めたタンパク質スポットを同定した結果、DFS が 1 年未満の群では 42 種、5 年以上の群では 14 種が同定できた。今回、DFS が 1 年未満の群において同定され、また腫瘍細胞において薬剤耐性との関連が報告されている TRAP1 に着目して、さらに検討を行った。

TRAP1 発現の免疫組織化学的解析

肺腺癌組織中の非腫瘍部における TRAP1 の発現は、肺胞上皮細胞では認められなかったが、気管支上皮細胞では細胞質に顆粒状に弱い発現が認められた。腫瘍部においては、TRAP1 の発現は細胞質に顆粒状症例により様々な程度で認められた。H-score の中央値を基に患者を TRAP1 高発現群および低発現群の 2 群に分け、臨床病理学的因子との関連を統計学的に解析した。その結果、TRAP1 発現は stage の進行およびリンパ節転移有りと有意に正相関していた（それぞれ、 $p = 0.005$, $p = 0.017$ ）。また、Kaplan-Meier 曲線を用いて患者の DFS および OS との関係性を調べたところ、TRAP1 高発現群では低発現群と比較して有意に DFS が短期であることがわかった ($p = 0.028$)。一方、TRAP1 発現と OS との間に有意な相関は認めなかった。

肺腺癌細胞における TRAP1 の機能解析

LC-2/ad 肺腺癌細胞株に siRNA を導入し TRAP1 の発現を抑制すると、陰性コントロール細胞に比べて 24 時間、48 時間、72 時間後の増殖能は有意に抑制された（それぞれ $p < 0.05$ ）。また、 $10\mu\text{M}$ シスプラチン存在下で 48 時間培養後の細胞生存率は、陰性コントロール細胞と比較して TRAP1 発現抑制細胞において有意に低下していた ($p < 0.05$)。

【考察】

stage II-III A 期の肺腺癌患者における術後補助化学療法の治療効果予測マーカーを獲得するため、治療前患者血清を一次抗体とした二次元免疫プロット法を行った。その結果、多数のタンパク質を同定できたが、今回 DFS が 1 年未満の患者血清中の自己抗体が認識した抗原タンパク質の 1 つである TRAP1 に着目した。TRAP1 は様々な腫瘍細胞において発現が認められ、エネルギー代謝や細胞増殖、アポトーシスなど多くの生物学的プロセスに関与していることが報告されて

いる。本研究において肺腺癌組織における TRAP1 の発現を免疫染色により評価したところ、TRAP1 の発現は stage の進行とリンパ節転移ありと有意に相関していることが示された。また TRAP1 高発現群は低発現群と比較して DFS が有意に短いことも明らかになった。大腸癌において、TRAP1 高発現群は低発現群に比して再発率が高いこと、また大腸癌細胞における TRAP1 の高発現は薬剤耐性に関連していることが報告されている。本研究においても、TRAP1 高発現群では低発現群に比して術後補助化学療法後の再発が早期に起きやすいという結果が得られ、TRAP1 が薬剤耐性に関与している可能性が示唆された。さらに、siRNA を用いた TRAP1 発現抑制実験により、TRAP1 発現抑制細胞では有意な増殖能の低下やシスプラチンに対する薬剤感受性が亢進することが明らかとなった。以上の結果より、TRAP1 発現は肺腺癌細胞における細胞増殖および薬剤耐性に関与しており、肺腺癌患者の DFS に影響を与えていること、そして肺腺癌患者に対する術後補助化学療法の有用な効果予測マーカーとなる可能性が示唆された。今後、肺腺癌患者における術後補助化学療法に対する抵抗性の機序を明らかにしていくため、TRAP1 が関与していると報告のある Akt を介したアポトーシス経路などの細胞内シグナル伝達経路について解析する必要がある。