HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | 非小細胞肺癌における免疫プロテアソームサブユニットβ5iの発現［論文内容及び審査の要旨］ |
| Author(s) | 木内, 隆之 |
| Description | 配架番号：2293 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(医学) |
| Dissertation Number | 甲第12552号 |
| Issue Date | 2017-03-23 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/66028 |
| Rights(URL) | https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/ |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Takayuki_Kiuchi_abstract.pdf, 論文内容の要旨 |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

# 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　木内隆之

## 学 位 論 文 題 名

## 非小細胞肺癌における免疫プロテアソームサブユニット β5i の発現
## (Expression of the immunoproteasome subunit β5i in non-small cell lung cancers)

【背景と目的】肺癌は癌による主要な死因の一つである。免疫チェックポイント阻害剤など治療法の開発が進んでいるが依然として予後不良であり、本邦における 5 年生存率は 30%程度である。

ユビキチン・プロテアソーム経路は、ホメオスターシスの調整や腫瘍発生など様々な局面で主要な役割を担っている。構成型プロテアソームは全身の体細胞に発現し、転写因子や細胞周期の進行に必要なタンパクなどユビキチン化タンパクを分解している。プロテアソームは悪性腫瘍の治療標的にもなり、ボルテゾミブは抗腫瘍薬として初のプロテアソーム阻害剤である。

免疫プロテアソームは誘導型プロテアソームであり、リンパ球や抗原提示細胞などの免疫細胞に発現している。また、体内の大部分の細胞でもサイトカインに反応して生成される。免疫プロテアソームの主な機能は抗原提示ペプチドの産生であり、T 細胞性の免疫反応を誘発する。免疫プロテアソームは自己免疫疾患や腫瘍性病変とも関連し、治療標的として期待されているが、悪性腫瘍における免疫プロテアソーム発現の臨床的意義は不明確である。本研究では、免疫プロテアソームが NSCLC のバイオマーカーとして機能しうるか検討するため、そのサブユニットである β5i の発現について免疫組織化学的検討を行うとともに、NSCLC 細胞株を用いた *in vitro* での解析を施行した。

【対象と方法】北海道大学病院において、1981 年から 1994 年までの間に手術を施行された NSCLC 患者 155 名から摘出された腫瘍組織を検討対象とした。対象症例中 80 症例が腺癌、69 症例が扁平上皮癌、その他組織型が 6 症例であった。染色性の評価方法としては、腫瘍細胞のうち 80%に染色性を示し、かつ優位な染色強度が高度であるものを高発現とし、その他の検体を低～中間発現とした。この基準を用い、病理学的あるいは臨床的因子と β5i 発現の関連について解析を行った。予後の検討では、追跡期間等一定条件を満たさない症例を除外し、138 例を評価対象とした。また、β5i が治療標的となりうるか検討するために、NSCLC 細胞株（HCC827, LCD, A549, PC-9）を用いた解析を施行した。免疫組織化学染色および Western blot（WB）法における β5i 発現の検討とともに、免疫プロテアソーム特異的阻害剤である ONX0914、非特異的プロテアソーム阻害剤である MG132 を使用し、阻害剤負荷による細胞死の誘導について検討を行った。

【結果】β5i 高発現は NSCLC 155 例中 33 例で見られた（21%）。男性よりも女性（$p < 0.0001$）、喫煙者よりも非喫煙者（$p < 0.0001$）、非腺癌よりも腺癌（$p < 0.0001$）、低分化症例よりも高～中分化症例で有意に認めた（$p = 0.002$）。Multivariate logistic regression analysis では、β5i 発現は喫煙と組織型に関連し、非腺癌の症例と比べて腺癌（odds ratio 28.2, $p = 0.002$）、喫煙者と比べて非喫煙者で有意に認めた（odds ratio 5.30, $p = 0.042$）。腺癌では、β5i の高発現は喫煙者よりも非喫煙者（$p = 0.003$）、低分化腫瘍よりも高～中分化腫瘍で有意に認めた（$p = 0.012$）。Multivariate logistic

regression analysis では、β5i 発現は喫煙習慣と関連し、喫煙者と比較して非喫煙者で有意に認めた（odds ratio 3.53, $p = 0.021$）。

根治切除症例および pStage I 症例において、β5i 発現と生存期間との関連について解析したところ、pStage I の NSCLC71 例では、β5i 高発現を示す患者の生存期間が、低発現～中間発現患者に比べ有意に長期間であった（5 年生存率各 82%、61%; $p = 0.031$）。根治切除症例でも同様の傾向は見られたが有意差は認めなかった。pStage I 症例における多変量解析では、β5i 高発現が予後良好と関連する唯一の有意な因子であった（ハザード比 0.29, $p = 0.043$）。

NSCLC 細胞株を用いた実験では、WB で HCC827 および PC-9 で β5i の発現が観察され、HCC827 で高発現、PC-9 では低発現であった。これに対し、LCD および A549 では発現を認めなかった。細胞クロットを用いた β5i の免疫染色による染色性は、WB による β5i 発現量と相関する傾向を認め、本抗体を用いた免疫組織化学的解析で β5i の定量的検討がある程度可能であることが確認された。

NSCLC 細胞を MG132、ONX0914 単独あるいは併用して 48 時間作用させ、細胞生存率を検討した結果では、β5i 発現細胞株である HCC827 および PC-9 に MG132 と ONX0914 を併用した際、MG132 単独使用の場合に比較し腫瘍細胞死が有意に増加した。一方、β5i 陰性である LCD および A549 では両剤の併用による細胞死の増加は観察されなかった。以上より、β5i を発現する NSCLC では、β5i が治療標的としても有用である可能性が考えられた。

【考察】悪性腫瘍における免疫プロテアソームの発現や、予後との関連については未だ不明な点が多い。本研究では、免疫プロテアソームサブユニットである β5i が、NSCLC の約 20%で高発現を示すこと、β5i の高発現が pStage I の NSCLC において独立した予後良好因子であることを示した。

腫瘍細胞に免疫プロテアソームが発現する生理的意義については依然として議論がある。免疫プロテアソームは、T 細胞を介した免疫反応に必要な HLA ペプチド産生に重要な役割を果たしている。免疫プロテアソームの発現は腫瘍抗原の提示を増強し、CD8 陽性 T 細胞の腫瘍内浸潤を誘導する可能性が示唆される。実際、肺癌で腫瘍内リンパ球数が多い症例において、予後良好であることが報告されている。本研究の予備的検討では、腫瘍における β5i 発現と浸潤リンパ球数に有意な相関を認めなかった。今後は浸潤リンパ球の CD4/CD8 分画に分けた解析など、詳細な検討を進めることが必要と考えられる。

ボルテゾミブは、代表的プロテアソーム阻害剤であり、多発性骨髄腫患者に対して著明な効果有するが、固形腫瘍に対する治療効果は部分的である。今回の研究で、β5i を発現する NSCLC 細胞では、β5i 特異的阻害剤である ONX0914 に感受性を示すだけでなく、MG132 と ONX0914 を併用することで、より効率的に細胞死を誘導できることが明らかとなった。β5i を発現する NSCLC 症例において、免疫プロテアソームは有望な治療標的となり得ることが期待される。

【結論】β5i 高発現である pStage I の NSCLC 症例はより長期生存を示し、β5i は NSCLC において予後予測のバイオマーカーとなりうることを明らかにした。また、肺癌細胞を用いた検討から、β5i 発現症例では薬剤治療の標的となりうると考えられる。