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［全文の要約］
Author(s)	木内, 隆之
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2293 他
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/2115/66030
Type	doctoral thesis
File Information	Takayuki_Kiuchi_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文 (要約)

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)

2017 年 3 月

北 海 道 大 学

木 内 隆 之

学　位　論　文 (要約)

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)

2017 年 3 月

北 海 道 大 学

木 内 隆 之

目　次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・　1 頁

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　2 頁

略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　4 頁

方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　5 頁

結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　8 頁

1. 肺癌組織における検討 ・・・・・・・・・・・・・・・・・　8 頁

2. 肺癌細胞株における検討 ・・・・・・・・・・・・・・・・　11 頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　12 頁

総括および結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　15 頁

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　16 頁

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　17 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Expression of the immunoproteasome subunit β5i in non-small cell lung carcinomas
Takayuki Kiuchi, Utano Tomaru, Akihiro Ishizu, Makoto Imagawa, Sari Iwasaki, Akira Suzuki, Noriyuki Otsuka, Yoshihito Ohhara, Rio Honma, Ichiro Kinoshita, Yoshihiro Matsuno, Hirotoshi Dosaka-Akita, and Masanori Kasahara
Modern Pathology, submitted.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Takayuki Kiuchi, Utano Tomaru, Akihiro Ishizu, Makoto Imagawa, Sari Iwasaki, Akira Suzuki, Yoshihiro Matsuno, and Masanori Kasahara
The expression of immunoproteasome subunit β5i in non-small cell lung carcinomas
第 105 回日本病理学会総会、2016 年 5 月 12 日-14 日・仙台

緒言

肺癌は全世界において癌による主要な死因の一つである。2012 年の統計では、肺癌は男性で最も多く診断される癌であり、癌における最大の死因となっている[1]。肺癌の 80%以上は非小細胞肺癌（NSCLC）である[2]。分子標的薬や、近年注目を集めるところでは免疫チェックポイント阻害剤など、肺癌の治療法は日々進歩を遂げており[3-5]、今後の治療成績や予後の改善が期待されるが、現時点では依然として予後不良な疾患である。予後は国によって大きく異なり、本邦は最も良好な部類に属するが、それであっても 5 年生存率は 30%程度に過ぎない[2]。国立がん研究センターの最新の統計によると、日本国内での 2014 年のがんによる死亡者数が 36 万 8 千人であるのに対し、肺癌による死亡者数は 7 万 3 千人にも上り、死亡者数の 2 割を占めている。新たな治療法の開発や病態のさらなる解明が急務である。

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、腫瘍発生を含む様々な細胞機能において主要な役割を担っている[6]。プロテアソームは構成型プロテアソームのほか、免疫プロテアソーム、胸腺プロテアソームが知られている。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を含むユビキチン化タンパクを分解している[7]。ボルテゾミブは抗腫瘍薬として初めてのプロテアソーム阻害剤であり、プロテアソームのキモトリプシン様活性を阻害する[8]。本邦においては、多発性骨髄腫の治療薬として臨床応用されている。

本研究での対象分子である免疫プロテアソームは誘導型の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、体内のほとんどの細胞でサイトカイン（特にインターフェロンγ（IFN-γ））に反応して生成される。免疫プロテアソームのよく知られた機能は抗原提示ペプチドの産生であり、それによって T 細胞介在性の免疫反応を誘発する[9]。また、免疫プロテアソームは様々な自己免疫疾患や炎症疾患、腫瘍性病変の発生とも密接に関連しており、様々な疾患における有望な治療標的として期待されている[10]。しかしながら、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依然として不明確である。

本研究では、免疫プロテアソームが NSCLC において有用なバイオマーカーとして機能しうるか検討するため、免疫プロテアソーム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な検討を行うとともに、NSCLC 患者の生存期間についても検討した。155 例中 33 例で β5i の高発現を認め、腺癌で有意に高発現であった（$p < 0.0001$）。pStage I の NSCLC 患者におい

ては、β5i の高発現は良好な予後と関連し（$p = 0.031$）、有意で独立した予後良好因子でもあった。

さらに、β5i が治療標的となりうるかを検討するために、NSCLC 細胞株を用いた *in vitro* における解析を施行した。一部の細胞株では β5i の発現を認め、これらの細胞株では、免疫プロテアソーム特異的阻害剤である ONX0914 が、非特異的なプロテアソーム阻害剤である MG132 と併用されることによって、効率的に腫瘍細胞死を誘導することを示した。

これらの結果は、免疫プロテアソームが NSCLC の予後予測因子であるのみならず、治療標的としても検討されるという可能性を示している。

略語表

本文中で使用した略語は以下の通りである。

AJCC	American Joint Committee on Cancer
AML	acute myeloid leukemia
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
HE	hematoxylin and eosin
HLA	human leukocyte antigen
NSCLC	non-small cell lung carcinoma(s)
SCC	squamous cell carcinoma
WHO	World Health Organization

方法

1）組織標本および生存データ

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の対象とした。NSCLC155 症例中、80 症例が腺癌、69 症例が扁平上皮癌（SCC）、3 症例が腺扁平上皮癌、2 症例が大細胞癌、1 例が多形癌であった。1982 年の WHO 分類に基づいてすべての診断を行い、組織診断は 2004 年の WHO 分類に基づいて確認した。術後の腫瘍/リンパ節/転移による病理学的臨床病期分類（pTNM）は、AJCC の最新のガイドラインに基づいて決定した [11]。病理学的因子については、北海道大学病理診断科/病理部での診断報告書を参照し、診断報告書から確認できない項目に関しては臨床上の記録を参照した。生存期間の解析に関しては、(a) 術後 3 ヶ月以上生存、(b) 術後 5 年以内に肺癌以外の原因で死亡していない、(c) 生存している患者については術後 3 年以上経過の追跡が行われている、という 3 つの基準を満たす症例を対象とした。基準を満たす症例は全 155 例中 138 例、うち根治切除された症例は 113 例であった。本研究は北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認を得て行った。

2）β5i 免疫組織化学染色

各検体の代表的なブロックから薄切したホルマリン固定組織切片を、キシシレンで脱パラフィンし、段階的なアルコールおよび蒸留水で再水和した。β5i 抗体は Enzo Life Sciences（Lausen, Switzerland）より購入した。免疫染色は biotin-streptavidin immunoperoxidase 法（SAB-PO kit; Nichirei, Tokyo, Japan）で行った。ホルマリン固定組織切片はヘマトキシリンおよびエオジンで染色した（HE 染色）。

3）β5i 免疫化学染色の評価基準

腫瘍細胞の染色強度を強度 1～3 の 3 段階に分類した。腫瘍細胞のうち、80％以上の細胞に陽性像を示し、かつ優位な染色強度が強度 3 である症例を高発現、この基準を満たさない症例を低～中間発現とし解析を行った（評価法 1）。なお、優位な染色強度が強度 2 あるいは 3 である症例を中間～高発現、その他を低発現とする方法でも補助的方法として検討を行った（評価法 2）。

4）Western blot 法

腫瘍細胞を緩衝剤（NaCl 150 mM, 2Tris-HCl（pH 7.5）20 mM, NP-40 0.2%, DTT 1 mM）に溶解し、15,000 g で 10 分間遠心分離した。サンプルを SDS-PAGE スクラブゲルにて泳動し、メンブレンに転写後、ブロッキングを行い、β5i 抗体あるいはアクチン抗体（Abcam Japan, Tokyo, Japan）を反応させた。二次抗体として抗ウサギ IgG（Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA）を用い、化学発光法によって検出し、Image Gauge software（Fujifilm, Tokyo, Japan）を用いて解析した。

5）細胞株および細胞培養

4 種の NSCLC 細胞株（HCC827, LCD, A549, PC-9）を用いて検討を行った。そのうち、HCC827、LCD、A549 は American Type Culture Collection（Manassas, USA）より購入し、PC-9 は Japan Cancer Research Resources Bank（Tokyo, Japan）からの提供を受けた。NSCLC 細胞株は、製造業者が推奨する条件（5% CO_2, 95% O_2, 37°C）で培養し、評価を行った。同量の数の細胞（4.0×10^3 to 1.0×10^5 /well in a 12 multiwell plate）を、10%ウシ胎児血清、100 U/mL ペニシリン、100 U/mL ストレプトマイシンを添加した DMEM 培地に浮遊させたうえで、MG132（1.0 to 2.0 uM）、ONX0914（200 nM）を単独使用あるいは併用し、48 時間作用させた。MG132 の濃度は、単剤使用後に細胞生存率が 50～70%になるようにそれぞれの NSCLC 細胞株で調整した。ONX0914 の感受性は NSCLC 細胞株によって様々であるため、単独では有意な細胞死をもたらさない程度の用量である 200nM で細胞を処置した。コントロールとして、PBS を用い培地に加えた。それぞれのウェルにおける生存可能細胞数は、ATP-measurement methods using luciferase reactions（CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega, Madison, WI）によって測定した。全てのデータは薬剤処置した基質の発光と、処置していない対照の発光との比で表現した。測定はいずれも 3 回施行した。

6）統計解析

β5i と年齢との関係は Student's *t*-test で解析した。β5i とその他の臨床病理学的パラメータとの関連は、χ^2 test または Fisher's exact test で解析した。生存曲線は Kaplan-Meier method を用いて評価し、生存期間の分布の差は log-rank test で評価した。Cox's proportional hazards model は生存に有意な影響を与える因子を同定するために用いた。*p* 値は 0.05 未満を統計学的に有

意とした。すべての検定は両側検定で行った。3 つ以上の一致しない集団の解析のため、one-way ANOVA with multiple comparisons/post-hoc tests を行った。統計解析は R（The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria）用のグラフィカルユーザーインターフェイスであり、生物統計で高頻度に用いられる統計関数を付加した EZR（Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan）を用いて行った[12]。

結果

1. 肺癌組織における検討

1）正常肺組織および NSCLC 細胞株における β5i の発現

各検体で HE 染色および β5i 免疫染色を施行した。非腫瘍部において、気管支上皮は高頻度に中等度の β5i 発現を示し、肺胞内マクロファージは強い β5i 発現を示した。

2）β5i 染色性の評価の確立

上記の通り、気管支上皮では中程度の β5i 染色を認め、肺胞マクロファージでは強い β5i 染色を認めた。このため、それぞれを強度 2、強度 3 の内部コントロールとして設定し､肺胞上皮とほぼ同様の染色性を示すものを強度 2、肺胞マクロファージとほぼ同様の染色性を示すものを強度 3 とした。

免疫組織化学染色の評価法としては、1）各検体における染色強度のみで評価する、2）各検体における染色強度に、腫瘍細胞に占める陽性細胞の割合を加味して評価する、という 2 通りの方法が考えられる。本検討では、後者を採用し、腫瘍細胞に占める陽性細胞の割合を 10%単位で評価した。染色性を評価した結果、陽性細胞割合の中央値が 80%であったため、80%を陽性判定のカットオフ値として、評価法を以下のように設定した。

評価法 1 : 腫瘍細胞における発現増加群を評価する目的で、優位な染色強度が強度 3 であるものを高発現（high）、それ以外を低～中間発現（low/medium)とする。

評価法 2 : 腫瘍細胞における発現低下群を評価する目的で、優位な染色強度が 2 あるいは 3 であるものを中間～高発現（medium/high）、それ以外を低発現（low）とする。

予備的検討として、pStage I 症例について、両方の評価法を用いて検討を行った。まず、代表的な組織型である腺癌と SCC における β5i 発現の差を比較したところ、いずれにおいても有意差を認めたが、評価法 1 では *p* 値がより低値であった。また、肺癌との関連が深い臨床項目として、喫煙の有無で比較したところ、評価法 1 では有意差を認めるのに対し、評価法 2 では有意差を認めなかった。そのため、評価法 1 を主たる解析法として用いることとしたが、評価法 1 では高発現となる SCC 症例がほとんどなかったため、

評価法 2 を補助的方法とし、一部の項目について解析を行った。

3）NSCLC における β5i の発現

全 155 例の NSCLC を抗 β5i 抗体で染色し、方法に記載した基準に基づいて評価した。

β5i の高発現は NSCLC 155 例中 33 例で見られた（21%）。臨床的項目で検討すると、男性よりも女性の症例で有意に認め（$p < 0.0001$）、喫煙者よりも非喫煙者の症例で有意に認めた（$p < 0.0001$）。組織学的項目では、非腺癌よりも腺癌で有意に認め（$p < 0.0001$）、低分化症例よりも高～中分化症例で有意に認められた （$p = 0.002$）。これに対し、T 因子、N 因子、M 因子、およびこれらに基づいて決定される病期では、有意差を認めなかった。β5i 発現と各項目との関連について、multivariate logistic regression analysis での解析では、β5i 発現は喫煙と組織型に関連があり、非腺癌の症例と比べて腺癌で有意に認め（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, $p = 0.042$）。

腺癌は NSCLC 症例の中で β5i を高発現している主要な組織型であるので、β5i の発現と臨床的､臨床病理的項目との関連について､別に検討を行った。腺癌患者において、β5i の高発現は喫煙者よりも非喫煙者の病変で多く認め（$p = 0.003$）､低分化腫瘍よりも高～中分化腫瘍で有意に認めた（$p = 0.012$）。性差は見られなかったが、全 NSCLC と概ね同様の結果であった。また、multivariate logistic regression analysis では､β5i の高発現は喫煙習慣と関連しており、β5i 高発現は喫煙者と比較して非喫煙者で有意であることが明らかになった（odds ratio 3.53, $p = 0.02$）。

また、評価法 2 によって SCC についても検討したが、いずれの項目においても有意差を認めなかった。

4）NSCLC 患者 β5i 発現と予後との関連

次に、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の解析を行った。予後評価の対象とした pStage I NSCLC の 71 例で検討すると、β5i 高発現を示す患者の生存期間は、低～中間発現患者に比べて有意に長期間であった（5 年生存率各 82%、61%; $p = 0.031$）。根治切除された NSCLC でも同様の傾向は見られたものの、有意差は認められなかった。腺癌でも検討を行い、根治切除症例および pStage I 症例いずれにおいても同様の傾向を示したが、有意差は認めなかった。

根治切除および pStage I の NSCLC 症例で解析を行い、β5i 発現の予後因

子としての意義について検討した。多変量解析では、pStage I 症例において、β5i の高発現が良好な予後と有意に関連する唯一のパラメータであることが示された（hazard ratio 0.29, $p = 0.043$）。

SCC についても評価法 2 で検討したところ、pStage I の症例では、中間～高発現症例に比べて、低発現症例の方が予後良好な傾向を認め、生存曲線が逆転している。本結果に関しては、より症例数を増やした解析が必要であるが、SCC においては、β5i 発現と予後との関連が、腺癌など他の組織型と異なる可能性も考えられる。

2. 肺癌細胞株における検討

1）肺癌細胞株における β5i 発現

タンパクの発現レベルと免疫染色との関連を確認するため、NSCLC 細胞株を用いての *in vitro* での検討を行った。Western blot 法では、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。免疫組織化学染色による検討でも、PC-9 と比較して HCC827 で β5i 高発現であった。LCD、A549 では同様に発現を認めなかった。以上より、本抗体を用いた免疫組織学的解析では、β5i 発現量をある程度定量的に解析することが可能であることが示された。

2）免疫プロテアソーム阻害剤による細胞死誘導

免疫プロテアソーム阻害剤が抗腫瘍薬として機能しうるかを検討するため、NSCLC 細胞株での検討を行った。

予備的検討として、非特異的なプロテアソーム阻害剤である MG132 と、免疫プロテアソーム特異的阻害剤である ONX0914 を用い、単剤で細胞死を誘導する濃度を検討した。MG132 について 50%程度の細胞死を誘導する濃度は細胞間で大きな違いがなかったが、ONX0914 に関しては β5i 発現細胞株で感受性が高く、細胞死がより誘導される傾向が見られた。

MG132（1.0 to 2.0 uM）、ONX0914（200 nM）を単独使用あるいは併用し、48 時間作用させ、細胞生存率を検討した。方法で述べたように、MG132 の濃度は単剤使用後に細胞生存率が 50～70％になるように調整した。ONX0914 に関しては、感受性が β5i 発現により NSCLC 細胞株によって様々であるため、単独では有意な細胞死をもたらさない 200nM で細胞を処置した。

HCC827 および PC-9 を MG132 と ONX0914 併用で処理すると、MG132 単独使用の場合に比較して、腫瘍細胞の細胞死は有意に増加した。これと対照的に、LCD および A549 においては、MG132 単独で使用した場合とほとんど同じであった。これらの結果から、β5i を発現している NSCLC では、MG132 と ONX0914 を併用することで、相加的に細胞死が誘導されるということが示された。

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。一般的に、腫瘍ではプロテアソームの発現が増加している。しかしながら、腫瘍組織における免疫プロテアソームの発現は一様ではなく、これまでの報告では、多くの癌種において、免疫プロテアソームの発現と予後に有意な相関は見られていない[13]。最近の他施設の検討で、肺癌早期例で免疫プロテアソームの発現が低い群において再発や転移を高頻度に認めるという報告がある[14]。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、NSCLC155例中33例（21%）で高発現を示すこと、β5iの高発現がpStage IのNSCLCにおいては、独立した予後良好因子であるということを示した。

生理学的に肺は慢性炎症や空気中の有害物質による影響を受けやすい部位である。このため、肺胞や気管支上皮を含む肺実質では、生理的に免疫プロテアソームの発現を認める[15,16]。本研究で、組織型によるβ5iの発現を検討した結果では、β5iの高発現例はSCCに比べて腺癌で有意に多く認めた。上述のように、β5iは生理的に肺胞や気管支上皮に発現するため、腺癌におけるβ5iの発現は組織発生を反映した結果であるとも考えられる。しかしながら、40%の腺癌ではβ5iの高発現を認めることから、腺癌細胞において免疫プロテアソームの発現は増強していると考えられる。免疫プロテアソームはサイトカインや病原体、あるいは酸化ストレスへの曝露下で誘導されるので[17,18]、β5iは腫瘍微小環境に反応して腫瘍細胞で高発現している可能性も否定できない。一方、SCCではβ5i発現と臨床病理学的因子に関連性は認めなかった。興味深いことに、SCCではβ5iの高発現例で予後不良の傾向を示し、SCCと腺癌ではβ5i発現の腫瘍発生や腫瘍増殖における役割が異なっている可能性も考えられる。

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。癌細胞における免疫プロテアソームの発現は腫瘍抗原の提示を増強する作用があると推定され、β5i発現の増加は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[14]。実際、大腸癌や乳癌では、腫瘍内に浸潤するCD8陽性リンパ球が多い症例で予後が良いとの報告がある[19-22]。肺癌でも腫瘍内リンパ球数が多い症例において、長期の生存を認めること、再発率が低いことが報告されている

[23-26]。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との間に有意な相関を認めなかった。しかしながら、免疫プロテアソームの発現が T 細胞性免疫反応の惹起に連動する可能性が考えられ、今後は抗 CD4 あるいは抗 CD8 抗体を用いて、浸潤リンパ球の分画による解析など、詳細な検討を進めたい。一方、腫瘍細胞に免疫プロテアソームが発現することで、腫瘍の増殖性を増強しているという報告もある。急性骨髄性白血病（AML）においては、免疫プロテアソームを発現する遺伝子が、細胞代謝や増殖、ミトコンドリア活性、ストレス応答に関連する遺伝子と協同して発現しており、細胞ストレス抵抗性となり、腫瘍増殖に有利に働いていると考えられている[13]。

β5i を高発現する症例は非喫煙者の NSCLC で高頻度に見られた。この結果は Tripathi らの最近の報告と異なっており、彼らの報告では免疫プロテアソーム発現と喫煙に相関性は認められない[14]。この相違に関しては、本研究と Tripathi らの β5i 発現の評価基準の違いに加え、解析症例に含まれる民族・人種の差を反映している可能性もある。本研究における患者のほとんどは東アジア人であるが、非喫煙者における肺癌は、東アジアの女性でより高頻度に発生する[27-29]。興味深いことに、β5i 発現は腺癌で有意に高かったが、喫煙者では β5i 高発現例が有意に減少していた。β5i の低～中間発現を示す喫煙者の腺癌患者のうち、30 例中 20 例（66.7%）では β5i 低発現を示した。喫煙例における β5i 低発現の機序としては、喫煙に関連したストレスが肺組織全体の β5i 遺伝子発現を減少させている可能性があるが、喫煙が β5i 発現自体に影響するか否かに関しては、一定の見解が得られていない[30]。喫煙が遺伝子発現の変化や癌の発生をもたらすことはよく知られているところであり、[31,32] β5i 発現は癌が発生する過程で二次的に減少している可能性がある。例えば、STAT3 はニコチンなど環境中の発癌物質によって活性化され、免疫プロテアソームに関連した遺伝子の発現低下に寄与するということが報告されている[33,34]。しかしながら、NSCLC における β5i 発現変化の分子メカニズムは現時点では明らかになっていない。

ボルテゾミブは、造血器系悪性腫瘍および固形腫瘍に対して臨床試験が進められている代表的プロテアソーム阻害剤である[8]。ボルテゾミブは多発性骨髄腫患者に対して著明な効果をもたらしているが、残念ながら、固形腫瘍に対する治療効果は部分的である。実験的検討や臨床試験の結果から、ボルテゾミブを従来の抗癌剤と組み合わせることにより、固形腫瘍においても抗腫瘍効果が向上することが期待されている[35]。ボルテゾミブにドセタキセルを併用する臨床試験からは、進行した NSCLC 患者において、ボルテゾミ

ブ単剤で軽度の効果があり、ドセタキセルの併用で治療効果がやや増強されることが示された[36]。しかしながら、ボルテゾミブの問題点として、末梢神経障害や無力症などの深刻な副作用が一部の症例に認められ、幅広い利用が制約されている。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。

総括および結論

本研究は、NSCLC における免疫プロテアソームサブユニットである β5i の発現を、免疫組織化学的方法を用いて検討した。加えて、NSCLC 細胞株を用いて、免疫プロテアソーム阻害剤に対する反応性を検討した。本研究で得られた知見は以下の通りである。

- pStage I の NSCLC において、β5i を高発現する症例は良好な予後を示す。
- β5i を発現する NSCLC 細胞株においては、免疫プロテアソーム阻害剤である ONX0914 が、非特異的なプロテアソーム阻害剤である MG132 との併用によって効果的に細胞死を誘導する。

以上の新知見より、β5i は NSCLC のバイオマーカーとして有用であり、β5i 発現症例においては、β5i は新たな治療標的となりうる可能性が示された。

今後展開されうる研究や課題としては、腫瘍間質と β5i 発現との関連や、β5i 発現と免疫応答の関連性について検討を進めたい。本研究では評価対象としなかったが、腫瘍間質の一部では β5i の発現が見られた。また、さらに多数の症例を解析することにより、組織型による β5i 発現の意義等、より詳細な臨床病理学的検討が可能であると考えられる。

肺癌は頻度の高い癌であり、また予後不良な癌の一つでもある。このため、新しい有効な治療法の開発や、予後因子の検討、また疾患のメカニズムの解明などの必要性は極めて高い。本研究においては、単に免疫プロテアソーム阻害剤が抗腫瘍効果を示しうるだけではなく、非特異的プロテアソーム阻害剤との併用で抗腫瘍効果が上昇しうるということも示された。プロテアソーム阻害剤による治療の障壁となる、有害事象を軽減するという観点からも有効な治療戦略となる可能性がある。

本研究が、今後の肺癌治療の発展の一助となることが期待される。

謝辞

本研究の機会を与えて頂いた、北海道大学大学院医学研究科病理学講座分子病理学分野　笠原正典教授に深く感謝いたします。

また、本研究において直接ご指導頂いた北海道大学大学院医学研究科病理学講座分子病理学分野　外丸詩野准教授に心から感謝いたします。

最後に、本研究を支えて下さった、分子病理学分野、北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野、KKR 札幌医療センター病理診断科、北海道大学大学院医学研究科内科学講座腫瘍内科学分野、北海道大学病院病理診断科の皆様に心よりお礼申し上げます。

引用文献

1 Torre, L. A. *et al.* Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* **65**, 87-108 (2015).

2 Cheng, T. Y. *et al.* The International Epidemiology of Lung Cancer: Latest Trends, Disparities, and Tumor Characteristics. *J. Thorac. Oncol.* **11**, 1653-1671 (2016).

3 Aldarouish, M. & Wang, C. Trends and advances in tumor immunology and lung cancer immunotherapy. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **35**, 157 (2016).

4 Chen, Y. M. Immune checkpoint inhibitors for nonsmall cell lung cancer treatment. *J. Chin. Med. Assoc.* **16**, 30162 (2016).

5 Hirsch, F. R., Suda, K., Wiens, J. & Bunn, P. A. New and emerging targeted treatments in advanced non-small-cell lung cancer. *Lancet* **388**, 1012-1024 (2016).

6 Adams, J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 349-360 (2004).

7 Kimura, H., Caturegli, P., Takahashi, M. & Suzuki, K. New Insights into the Function of the Immunoproteasome in Immune and Nonimmune Cells. *J. Immunol. Res.* **2015**, 541984 (2015).

8 Chen, D., Frezza, M., Schmitt, S., Kanwar, J. & Dou, Q. P. Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Curr. Cancer Drug Targets* **11**, 239-253 (2011).

9 Chen, W., Norbury, C. C., Cho, Y., Yewdell, J. W. & Bennink, J. R. Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. *J. Exp. Med.* **193**, 1319-1326 (2001).

10 Kaur, G. & Batra, S. Emerging role of immunoproteasomes in pathophysiology. *Immunol. Cell Biol.* **94**, 812-820 (2016).

11 Goldstraw, P. *et al.* The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J. Thorac. Oncol.* **2**, 706-714 (2007).

12 Kanda, Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* **48**, 452-458 (2013).

13 Rouette, A. *et al.* Expression of immunoproteasome genes is regulated by

cell-intrinsic and -extrinsic factors in human cancers. *Sci. Rep.* **6**, 34019 (2016).

14 Tripathi, S. C. *et al.* Immunoproteasome deficiency is a feature of non-small cell lung cancer with a mesenchymal phenotype and is associated with a poor outcome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E1555-1564 (2016).

15 Keller, I. E. *et al.* Regulation of immunoproteasome function in the lung. *Sci. Rep.* **5**, 10230 (2015).

16 Baker, T. A., Bach, H. H., Gamelli, R. L., Love, R. B. & Majetschak, M. Proteasomes in lungs from organ donors and patients with end-stage pulmonary diseases. *Physiol. Res.* **63**, 311-319 (2014).

17 Hisamatsu, H. *et al.* Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon gamma. *J. Exp. Med.* **183**, 1807-1816 (1996).

18 Ferrington, D. A. & Gregerson, D. S. Immunoproteasomes: structure, function, and antigen presentation. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **109**, 75-112 (2012).

19 Fridman, W. H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 298-306 (2012).

20 Mlecnik, B., Bindea, G., Pagès, F. & Galon, J. Tumor immunosurveillance in human cancers. *Cancer Metastasis Rev.* **30**, 5-12 (2011).

21 Mlecnik, B. *et al.* Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J. Clin. Oncol.* **29**, 610-618 (2011).

22 Mahmoud, S. M. *et al.* Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **29**, 1949-1955 (2011).

23 Kawai, O. *et al.* Predominant infiltration of macrophages and CD8(+) T Cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer. *Cancer* **113**, 1387-1395 (2008).

24 Al-Shibli, K. I. *et al.* Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **14**, 5220-5227 (2008).

25 Wakabayashi, O. *et al.* CD4+ T cells in cancer stroma, not CD8+ T cells in cancer cell nests, are associated with favorable prognosis in human non-small cell lung cancers. *Cancer Sci.* **94**, 1003-1009 (2003).

26 Kilic, A., Landreneau, R. J., Luketich, J. D., Pennathur, A. & Schuchert, M. J. Density of tumor-infiltrating lymphocytes correlates with disease recurrence and survival in patients with large non-small-cell lung cancer tumors. *J. Surg.*

Res. **167**, 207-210 (2011).

27 Woolston, A. *et al.* Putative effectors for prognosis in lung adenocarcinoma are ethnic and gender specific. *Oncotarget* **6**, 19483-19499 (2015).

28 Sun, S., Schiller, J. H. & Gazdar, A. F. Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 778-790 (2007).

29 Lam, W. K. Lung cancer in Asian women-the environment and genes. *Respirology* **10**, 408-417 (2005).

30 Kammerl, I. E. *et al.* Impairment of Immunoproteasome Function by Cigarette Smoke and in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **193**, 1230-1241 (2016).

31 Saito, M. *et al.* Gene aberrations for precision medicine against lung adenocarcinoma. *Cancer Sci.* **107**, 713-720 (2016).

32 Karlsson, A. *et al.* Genomic and transcriptional alterations in lung adenocarcinoma in relation to smoking history. *Clin. Cancer Res.* **20**, 4912-4924 (2014).

33 Chen, R. J., Ho, Y. S., Guo, H. R. & Wang, Y. J. Rapid activation of Stat3 and ERK1/2 by nicotine modulates cell proliferation in human bladder cancer cells. *Toxicol. Sci.* **104**, 283-293 (2008).

34 Zhang, Q. *et al.* STAT3 induces transcription of the DNA methyltransferase 1 gene (DNMT1) in malignant T lymphocytes. *Blood* **108**, 1058-1064 (2006).

35 Yang, H., Zonder, J. A. & Dou, Q. P. Clinical development of novel proteasome inhibitors for cancer treatment. *Expert Opin. Investig. Drugs* **18**, 957-971 (2009).

36 Fanucchi, M. P. *et al.* Randomized phase II study of bortezomib alone and bortezomib in combination with docetaxel in previously treated advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **24**, 5025-5033 (2006).