HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	原発性肺癌におけるMelanoma antigen family A4発現の細胞内局在と予後予測に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	藤原, 晶
Description	配架番号：2434
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13378号
Issue Date	2018-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/72403
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Aki_Fujiwara_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　藤原　晶

学 位 論 文 題 名

原発性肺癌における Melanoma antigen family A4 発現の細胞内局在と予後予測に関する研究
(Prognostic value of MAGEA4 in primary lung cancer depends on subcellular localization and p53 status)

【背景】 Melanoma antigen family A4 (MAGEA4) は，これまでに非小細胞肺癌を含むさまざまな癌での過剰発現が報告され，癌免疫療法の標的となっている癌精巣抗原の 1 つである．北海道大学消化器外科学教室 II でも MAGEA4 を対象とした癌ワクチン療法臨床試験を行なってきた．一方で，MAGEA4 の癌での発現率や生物学的機能についての報告には一定の見解がなく，未だ議論の分かれるところである．私はこの不一致の原因が，MAGEA family 遺伝子に相同性のため抗 MAGEA4 抗体が他の MAGEA タンパクに交差反応を起こしてしまうことや，p53 などの広く知られているタンパクと異なり MAGEA4 の検出方法が標準化されていないことにあるのではないかと考えた.

【目的】 MAGEA4 の生物学的機能について正確な検討を行うため，また MAGEA4 を標的とした癌ワクチン療法において適切な対象患者を選ぶためにも，MAGEA4 検出の標準化は必須であると考えられた．各種 MAGEA 遺伝子の発現コントロールを用いて MAGEA4 を他の MAGEA と区別して特異的に検出できる条件を確立すること，さらにその条件下で非小細胞肺癌における MAGEA4 の発現率や生存率への影響を検討し，MAGEA4 の予後への影響や生物学的機能をより明らかにすることを目的として本研究を行なった.

【材料・対象と方法】 ヒト精巣の cDNA から抽出した各種 MAGEA 遺伝子を PCR 法で増幅させ，vector プラスミドに組み込んだ．これを 293F または 293FT 細胞株に遺伝子導入し，各 MAGEA の発現コントロールを作製した．MAGEA4 の遺伝子導入株を用いて切断型カスパーゼ-3 の免疫組織化学染色を行い，MAGEA4 遺伝子によるアポトーシスへの影響を検討した．各種 MAGEA 遺伝子を導入した発現コントロールから mRNA やタンパクを抽出し，RT-PCR で MAGEA の mRNA の発現を，ウェスタンブロットや免疫組織化学染色法を用いて MAGEA タンパクの発現をさまざまな条件で検討し，MAGEA4 に特異的な検出条件を明らかにした．その

条件下で，1996 年から 2004 年前の間に手術的に切除された非小細胞肺癌 240 例に対し，Tissue microarray を用いて MAGEA4 の発現および細胞内局在と，術後生存率への影響を検討した．また， MAGEA4 が p53 と連携し細胞のアポトーシスに影響を与えるとする過去の報告との合理性を検証するため，p53 についても Tissue microarray 法で発現を検討し，生存率に与える影響を検討した．さらに，MAGEA4 の細胞内局在と p53 発現が他の臨床病理学的因子と独立した予後予測因子となるかについて多変量解析で検討を行なった．

【結果】非小細胞肺癌細胞株では，8 種中 4 種で MAGEA4 の発現が認められた．非小細胞肺癌切除検体では 25.4%に MAGEA4 の発現が認められた．MAGEA4 の強制発現株において切断型カスパーゼ-3 を利用したアポトーシス分析を行なうと，MAGEA4 の過剰発現はアポトーシスを減少させることがわかった．強制発現株では MAGEA4 は細胞質に局在し，シスプラチンによる外的なアポトーシス誘導下でも局在に変化は見られなかった．しかし，非小細肺癌細胞株や切除検体で発現する内因性の MAGEA4 は核でも発現が認められた．非小細胞肺癌切除検体 240 例で検討したところ，MAGEA4 の発現単独では有意な予後因子とはならなかったが，核でのみ発現している群、および細胞質のみで発現している群では MAGEA4 非発現群と比較して予後不良であった．さらに，MAGEA4 の細胞内局在と p53 の発現の有無で群分けして生存分析を行なったところ，MAGEA4 を核で発現している場合，p53 の染色陰性例は有意に予後不良である一方，p53 の染色陽性例は予後が良好であった．「MAGEA4 の核での発現および p53 の染色陰性」は，多変量解析で単独で有意な予後不良因子であった (P=0.0042).

【考察】 本研究の結果と過去の報告とを考え合わせると，MAGEA4 はアポトーシスに関し、細胞内局在と p53 発現の有無の組み合わせにより異なる機能を持つことが推測された．すなわち，癌細胞において核内の MAGE4 は野生型 p53 を阻害してアポトーシスを抑制する癌遺伝子としての機能を示し，一方，核内で p53 と共発現している場合には p53 を誘導してアポトーシスを促進している可能性が示唆された．MAGEA4 の生物学的機能や予後への影響を理解するためには，発現の有無や量のみではなく、その細胞内局在も合わせて検討する必要があると考えられた．今後，異なるエピトープを持つ複数の抗 MAGEA4 抗体の利用など，細胞内での移動や断片化を検出できる方法が明らかになれば，MAGEA4 のアポトーシスへの影響や p53 との連携機序がより詳細に評価できる可能性がある．また，本研究において標準化した検出条件下で非小細胞肺癌における MAGEA4 の発現率が 25.4% (扁平上皮癌に限ると 47%) であったことは，本抗原を用いたワクチン療法の可能性を考える上で重要な事実と考えられた．

【結論】 非小細胞肺癌における免疫組織化学染色で，MAGEA4 タンパクを特異的に検出できる方法を確立した．非小細胞肺癌において核内の MAGEA4 は p53 との連携を介してアポトーシスを誘導していることが示唆された. 本研究は MAGEA4 の生物学的機能が, その細胞内局在と p53 との連携に依存することを示した初めての研究である．