

氏 名 (本 籍) 尾 崎 良 智 (京 都 府)

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博 士 第 4 6 2 号

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 6 年 3 月 2 5 日

学 位 論 文 題 目 Expression and Immunogenicity of a Tumor-Associated Antigen, 90K/Mac-2 Binding Protein, in Lung Carcinoma: The Possibility of Its Clinical Use as a Tumor Marker and a Target Antigen in Cancer Immunotherapy

(肺癌における腫瘍関連抗原 90K/Mac-2 Binding Protein の発現およびその免疫原性：腫瘍マーカーおよび癌免疫療法における標的抗原としての臨床応用の可能性)

審 査 委 員 主 査 教 授 小 笠 原 一 誠

副 査 教 授 服 部 隆 則

副 査 教 授 村 田 喜 代 史

論文内容要旨

*整理番号	464	(よりがな) 氏名	おぎき よしとも 尾崎 良智
学位論文題目	Expression and Immunogenicity of a Tumor-Associated Antigen, 90K/Mac-2 Binding Protein, in Lung Carcinoma: The Possibility of Its Clinical Use as a Tumor Marker and a Target Antigen in Cancer Immunotherapy (肺癌における腫瘍関連抗原 90K/Mac-2 Binding Protein の発現およびその免疫原性: 腫瘍マーカーおよび癌免疫療法における標的抗原としての臨床応用の可能性)		
<p>【目的】近年腫瘍抗原に関する研究が急速に進み、宿主に強い抗腫瘍免疫応答を誘導しうる多くの抗原が同定されている。いくつかは癌免疫療法に臨床応用されているものもあるが現時点では満足のいく臨床効果は得られていない。この腫瘍抗原を標的とした癌免疫療法の臨床効果を高めるためには、複数の癌抗原を標的とすることが必要と思われる。腫瘍関連抗原である 90K/Mac-2 Binding Protein (以下 M2BP) は分子量約 90kDa の分泌糖蛋白で、ヒトマクロファージレクチンである Mac-2 のリガンドとして同定された。M2BP は健常人の血清、体液中においても微量に認められるが、悪性腫瘍患者や HIV などのウィルス感染症患者では有意に増加している。このタンパクの生体内における詳細な機能についてはいまだ不明な点が多いが、主要組織適合抗原 (MHC) や接着分子などの発現調節、Natural Killer(NK)細胞や Lymphokine Activated Killer(LAK)細胞の活性化などに関与することから、宿主における免疫賦活因子としての役割を果たしていると考えられている。これまで乳癌や卵巣腫瘍患者において M2BP の過剰発現が報告されてきたが肺癌での発現に関する報告はわずかである。肺癌において特異的に高発現し強い腫瘍抗原性を有する抗原の同定とその生物学的解析は腫瘍免疫における重要な課題の一つであり、著者らは原発性肺癌組織における M2BP の発現および臨床病理学的背景との関連ならびに M2BP の抗原性について検討した。</p> <p>【方法】(1) M2BP の抽出: 癌細胞株 QG56 の培養上清から硫酸分画を濃縮し、ゲル濾過およびイオン交換クロマトグラフィーにて M2BP を抽出した。(2) ノーザンプロット法: Kothら (1993 年) によりクローニングされた M2BP の cDNA 配列にしたがって、ハイブリダイゼーションに用いるオリゴヌクレオチドプローブを合成した。肺癌細胞株 (8 株) および原発性肺癌 28 例の切除標本 (男性 18 例、女性 10 例; 腺癌 15 例、扁平上皮癌 9 例、大細胞癌 2 例、小細胞癌 1 例、腺扁平上皮癌 1 例) より mRNA をグアニジンチオシアネート法により抽出し、肺癌細胞における M2BP の mRNA レベルを解析した。(3) 免疫組織染色: M2BP 由来合成オリゴペプチドを家兎に免疫して得られた抗血清を用いて、ABC 法にて肺癌組織における M2BP の蛋白の発現および局在について検討した。(4) ELISA: 肺癌患者 23 例および対照 (健常人) 19 例について、血清中の抗 M2BP ペプチド抗体価を解析した。</p> <p>【結果】(1) 肺癌細胞株 QG56 より抽出した >500kDa の糖蛋白をエドマン分解にてアミノ酸配列解析したところ、M2BP の配列と一致した。(2) ノーザンプロット法では肺癌細胞株で 7/8 株 (87.5%)、切除腫瘍組織で 17/28 例 (60.7%) と高率に M2BP mRNA の過剰発現を認めた。組織型別では腺癌 8/15 例 (53.3%)、扁平上皮癌 6/9 例 (66.7%)、大細胞癌 1/2 例 (50%)、</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、
2 千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

小細胞癌 1/1 例 (100%)、腺扁平上皮癌 1/1 例 (100%) に発現を認めた。(3) 免疫組織染色では腫瘍細胞の細胞質がび慢性に強く染色され、11/28 例 (39.3%) でタンパク発現陽性であった。Stage 3 + 4 期 (6/10 例 : 60.0%) では 1 + 2 期 (5/18 例 : 27.8%) に比べ陽性例が多い傾向があったが統計学的有意差は認められなかった。(4) 肺癌患者 7/23 例 (30.4%) で血清中の抗 M2BP 抗体が上昇しており、それら抗体上昇例すべてにおいて抗 M2BPIgG 抗体価の上昇が認められた。対照例では同抗体の上昇は認められなかった。

【考察】 M2BP の分子量は通常 ~70-90kDa であるが、著者らが肺癌細胞株培養上清から抽出した M2BP の分子量は 500kDa を越えていた。これはタンパクのグリコシル化あるいは構造上システインを豊富に含むことからジスルフィド結合を介したオリゴマー形成によるものと考えられた。肺癌細胞株、肺癌組織いずれにおいても M2BP mRNA とタンパク過剰発現が認められた。しかし肺癌組織において mRNA のみ過剰発現しておりタンパク発現が欠如している症例がいくつか存在した。主な理由として著者らの作成した抗 M2BP ポリクローナル抗体は M2BP のコアタンパク由来ペプチドを認識するため、高度にグリコシル化したタンパクに対して反応しなかった可能性が考えられた。著者らは初めて多くの肺癌患者において抗 M2BP 抗体価が上昇していることを明らかにした。その頻度は MAGE(4.2%) や MUC1(8.3%) など他の腫瘍抗原と比較してもかなり高く、さらに全例に IgM から IgG へのクラススイッチが起こっていることから、肺癌患者では M2BP に対しヘルパー T 細胞を含む細胞性免疫応答が関与していることが示唆された。肺癌において免疫療法の標的として確立された腫瘍抗原はいまだ少なく、抗原性の高い M2BP は肺癌の標的腫瘍抗原として有望であると考えられた。

【結論】 M2BP は肺癌細胞に高発現しており、それ自体免疫賦活作用と免疫原性を併せ持つユニークなタンパクである。M2BP を標的とした癌免疫療法の有用性が今後期待される。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	464	氏名	尾崎 良智
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>近年癌特異的抗原を標的とする癌免疫療法の研究開発が進んでいるが、肺癌において臨床応用可能な癌特異的標的抗原は限られている。Mac-2 Binding Protein (M2BP) は多くの癌において高発現していることが知られているが、肺癌における発現についての解析はほとんどなされていない。また腫瘍抗原としての免疫原性についても不明である。本研究は、肺癌細胞株および原発性肺癌組織における M2BP mRNA 発現とタンパク質発現の解析を行うとともに、M2BP の免疫原性について検討を行ったものである。</p> <p>その結果、1) M2BP は組織型に関係なく肺癌細胞に高発現している。2) 肺癌患者においては血清中に抗 M2BP IgG 抗体価の上昇が見られることが確認され、M2BP に対する免疫応答が惹起されていることが明らかとなった。</p> <p>以上の成果は、肺癌患者に対する M2BP を標的腫瘍抗原とした新たな癌免疫療法の開発の可能性を初めて示したもので、博士(医学)の学位論文に値するものと認める。</p>			
(平成16年2月17日)			