

主論文の要旨

Increased expression levels of ppGalNAc-T13 in lung cancers: Significance in the prognostic diagnosis

肺癌における ppGalNAc-T13 発現レベルの亢進：
予後診断における意義

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 呼吸器内科学分野

(指導：長谷川 好規 教授)

野木森 健一

【緒言】

これまでにマウス Lewis 肺癌細胞株においてガングリオシド GM1 が発現低下すると転移能が亢進するとともに ppGalNAc-T13 gene の発現が上昇し、Syndecan1 上に trimeric Tn 抗原が形成されることが我々の研究によって明らかになった。また *in vivo* においても ppGalNAc-T13 導入細胞をマウスに接種すると転移能、浸潤能の亢進が示された。そこで ppGalNAc-T13 およびその産物の腫瘍予後マーカーとしての可能性を検討するため、ヒトの癌細胞株および肺癌組織の ppGalNAc-T13 発現レベルと予後との相関を分析した。

【対象および方法】

十分なインフォームドコンセントを受けた非小細胞肺癌患者 91 人の凍結手術検体および凍結血清を用い RNA 抽出、cDNA 合成を行った。RNA の抽出は、肺癌組織をホモジナイズした後に TRIzol 試薬を用いて、また細胞株および血清検体からは Total RNA Purification kit を使用して行った。肺癌検体での ppGalNAc-T13 mRNA の発現レベルを real time RT-PCR にて定量し、その結果を病理学的および臨床的データと照合して評価した。定量的 real time RT-PCR は、8ng の cDNA をテンプレートに 40 サイクルの増幅(95°Cで 5 秒、62°Cで 20 秒)を行って SYBR Green 法で定量した後、GAPDH mRNA で補正した。また ppGalNAc-T13 mRNA のエクソンバリエーションの中で、腫瘍特異的な 3 バリエーション (E5、E13'、E14) を選択し発現レベルを解析した。血清サンプルからの ppGalNAc-T13 mRNA 検出のため nested PCR 法を行い 1.5%アガロースゲルで可視化した。1 回目の PCR で 8ng の cDNA を用いて増幅し、得られた産物の 50 分の 1 の DNA をテンプレートとして、内側のプライマーを用いて再度 PCR を行った (98°C10 秒、62°C30 秒の 40 サイクル)。用いたプライマー配列は Table1 に示す。ppGalNAc-T13、GM1 および ppGalNAc-T13 の産物である trimeric Tn 抗原のヒト肺癌組織における発現について、凍結切片による免疫染色を行い、予後との関連性を解析した。一次抗体として、ppGalNAc-T13 および trimeric Tn 抗原に特異的な IgG 抗体を、GM1 に対してはコレラ毒素 B サブユニットを用いた。なお、統計学的解析には IBM SPSS Statistics バージョン 22.0 を使用した。

【結果】

まず様々なヒト癌細胞株における ppGalNAc-T13 の mRNA 発現レベルを定量的 real time RT-PCR により測定した (Figure 1)。この結果、ppGalNAc-T13 mRNA は、肺癌および神経芽腫において高度に発現していることが見出された。肺癌の中では腺癌細胞株および小細胞肺癌細胞株の両方で高い発現レベルを示した。次に凍結保存手術検体を用いて、ヒト肺癌組織での ppGalNAc-T13 mRNA の発現レベルを解析した。対象とした 91 人の患者背景は Table2 の通りで、年齢、性別、喫煙状況、併存疾患、病期に差異は認められなかった。91 例のうち、ppGalNAc-T13 mRNA の発

現レベルが高い患者は低い患者と比較し、全生存期間で有意差はなかったが、無再発生存期間は有意に短縮していた (Figure 2)。腫瘍特異的な 3 つのエクソンバリエント (E5、E13'、E14 ; 配列は Figure 3 に示す) についても生存期間を比較検討した。E5 では、陽性群と陰性群との間で全生存期間、無再発生存期間ともに有意な差は認めなかったが、E13 陽性群で全生存期間が有意に短縮していた。一方、E14 では陽性群は無再発生存期間が延長しており、バリエントによって予後に関して異なる影響が認められた (Figure 4)。続いて血清中の ppGalNAc-T13 の検出の可能性を調べた。手術患者からの凍結血清の一部を使って PCR で *ppGalNAc-T13* mRNA の発現を検討したが検出できなかった。そこで、nested PCR 法を用いたところ、Figure 5A に示すように一部の検体で検出することができた。手術患者からの凍結血清 61 サンプルおよび Stage4 患者からの 2 個の新鮮血清サンプル、合計 63 の血清のうち、検体で *ppGalNAc-T13* mRNA が検出された。これらの 4 患者の状態を Figure 5B に示す。さらに免疫染色を用いて、肺癌組織上の ppGalNAc-T13、GM1、および trimeric Tn 抗原の発現を検討し予後との関連を解析した (Figure 6)。ppGalNAc-T13 陽性群では、無再発生存期間の短縮と有意に相関しており、mRNA の発現レベルと同様の傾向を示した。GM1 に関しては、陽性群でより長い生存期間を示す傾向が認められた。ppGalNAc-T13 の産物である trimeric Tn 抗原においては、ppGalNAc-T13 と同様に陽性群で有意に無再発生存期間が短縮していた (Figure 7)。ppGalNAc-T13、GM1、および trimeric Tn 抗原それぞれの発現の相関を Table 3 に示す。ppGalNAc-T13 と GM1 の発現の間には負の相関が認められた。対照的に、ppGalNAc-T13 および trimeric Tn 抗原の発現においては正の相関が観察され、マウスにおける転移モデルの結果に矛盾しない結果であった。

【考察】

我々の以前の研究において、マウス Lewis 肺癌細胞株では、ガングリオシド GM1 が発現低下すると *ppGalNAc-T13* mRNA の発現が上昇し、Syndecan1 上に trimeric Tn 抗原が形成され転移能が増強することが示されていた。本研究では、ヒト肺癌組織において、*ppGalNAc-T13* mRNA 発現レベルや免疫染色での ppGalNAc-T13、trimeric Tn 抗原の発現が予後と相関していることが見出された。これらの結果は、マウス転移モデルにおける結果と一致し、ヒトにおいても ppGalNAc-T13 の産物が同様の役割を果たしていることが推測された。また、*ppGalNAc-T13* mRNA のいくつかのエクソンバリエントを用いた分析では、あるバリエントの発現は不良な予後と関連し、別のバリエントでは良好な予後との関連が認められ、興味深い結果となった。それぞれのバリエントはレクチン様ドメインの配列が異なっており、糖鎖認識の違いによるものと考えられる。これらの結果は、ppGalNAc-T13 やそのバリエントおよび trimeric Tn 抗原が予後予測マーカーや腫瘍マーカーとして有用であることを示唆する。しかし、nested PCR 法を用いた血清からの *ppGalNAc-T13* mRNA の検出は感度が低く定量性も担保できない。したがって、ppGalNAc-T13 または trimeric

Tn の血清中での検出についてさらなる検討が必要である。本研究の一つの欠点は、検討の対象が手術で得られた原発腫瘍のみであることである。転移巣および転移リンパ節組織を得ることによって、原発性腫瘍と転移性腫瘍の発現レベルの差を調べることで、より興味深い結果が期待される。

【結語】

本研究において、定量的 real time RT-PCR を用いることにより、*ppGalNAc-T13* mRNA の高発現が肺癌患者の予後不良のマーカーとなることが示唆された。さらに、免疫染色における *ppGalNAc-T13* および trimeric Tn 抗原の発現は無再発生存期間の短縮と強く関連していた。これらの結果は、*ppGalNAc-T13* が有用な予後予測因子であることを示すと同時に、癌治療の新たな標的となりうることを示唆した。