

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト肺腺癌における小胞体ストレス関連遺伝子発現と臨床病理学的検討

氏名 酒谷俊雄

小胞体はタンパク質の品質管理、細胞内カルシウム濃度制御、脂質膜合成などにおいて重要な役割を果たしている細胞内小器官である。小胞体内はホメオスタシスが保たれているが、低酸素血症や低栄養などといった様々な刺激により折りたたみ不全タンパク質が蓄積すると、細胞へのストレスが生じ、小胞体ストレスという状態に陥ることが示されている。細胞はこのような小胞体ストレスに対して、新規のタンパク質の合成を抑制したり、合成されたタンパク質を処理したりすることで小胞体にかかる負荷を軽減し、小胞体内の恒常性を保とうとする。こういった一連の小胞体におけるタンパク質の品質管理機構は小胞体ストレス応答 (unfolded protein response: UPR) とよばれる。近年、小胞体ストレスが様々な疾患の発症に関わることが示唆され、実際にそれぞれの疾患において小胞体ストレスマーカーの発現上昇が認められている。さらに小胞体ストレスをターゲットとした創薬研究が進展してきており、様々な疾患への応用が期待されている。しかし、現状では肺癌と小胞体ストレス関連遺伝子発現との間の関係についてはまだわかっていないことは少ない。そこで本研究では、当院で手術を受けた肺腺癌患者 126 例の臨床検体を用いて、小胞体ストレス関連遺伝子の発現と術後経過との関係について検討を行った。

小胞体ストレス関連遺伝子としては、小胞体膜に存在し小胞体ストレスを感知するタンパク質としてよく知られている PERK、ATF6、IRE1 の 3 つと、Affymetrix GeneChipR Human Genome U133 Plus 2.0 Array を用いて解析されたデータから GSE10245 の肺腺癌症例において高発現であり、かつ正常肺においては発現が見られず、また Oncomine™ でも生存率と発現量に相関があることがわかっている小胞体内の酸化還元酵素である ERO1L の 4 つについて調べることとした。

小胞体ストレス関連遺伝子の発現量は、リアルタイム逆転写 PCR によって定量を行った。臨床検体は、肺癌手術後に切除検体から一部採取されたもので RNA later で一晚保管した後に -20°C で保管したものを使用した。臨床検体からの total RNA 抽出はハサミで細切した後、Precellys 24 で破碎をおこない RNAiso Plus により行った。抽出した RNA から逆転写により cDNA を合成し、THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (Toyobo) を用いて Applied Biosystems 7500 リアルタイム PCR システムによりリアルタイム PCR を行った。サンプル間の cDNA 量の変動を補正するため GAPDH を内在性コントロールとして用いた。

上記によって得られた小胞体ストレス関連遺伝子の ΔCt 値を中央値で 2 群にわけて、高発現群・低発現群と定義して検討を行った。以下の患者パラメーターを記録し解析に用いた：年齢、性別、病理病期、喫煙歴、リンパ管侵襲、血管侵襲、EGFR 遺伝子変異。無再発生存期間 (RFS) は肺切除の日から画像的に再発が認められた日までの期間と定義し、全生存期間 (OS) は肺切除の日から死亡もしくは最後に生存を確認した日までの期間と定義した。

小胞体ストレス関連遺伝子 4 遺伝子すべてにおいて、高発現群では、低発現群と比べ病理病期が早

期で、血管侵襲も少ない傾向が認められた。一方、小胞体ストレス関連遺伝子発現レベルと性別、喫煙歴、リンパ管侵襲、EGFR 遺伝子変異の有無との間には明らかな関係は認められなかった。

また、4つの小胞体ストレス関連遺伝子間の発現の相関を検討した結果、すべての小胞体ストレス関連遺伝子の中で正の相関関係が認められた。その中で特に PERK と IRE1 との間に強い相関が認められた ($r=0.899, P<0.001$)。

病理病期ごとに小胞体ストレス関連遺伝子の発現を検討したところ、小胞体ストレス関連遺伝子 4 遺伝子全てにおいて、病理病期が進むごとに発現が下がることがわかった。各々の遺伝子の病期ごとの発現量は正規分布に従わないデータ分布であったため、ノンパラメトリック手法である Kruskal-Wallis 検定によって病期間の発現量を評価した。その結果、異なる病理病期群の間の中央値において明らかな有意差が認められた (ERO1L, $P=0.002$; PERK, $P<0.001$; ATF6, $P=0.001$; IRE1, $P<0.001$)。そのため、私たちは肺腺癌患者の術後の予後と小胞体ストレス遺伝子発現との間に何らかの関連があることを疑い検討を進めた。

RFS の単変量解析を行ったところ、病理病期 ($P<0.001$)、リンパ管侵襲の有無 ($P<0.001$)、血管侵襲の有無 ($P<0.001$)、PERK 発現 ($P=0.003$)、ATF6 発現 ($P=0.001$)、IRE1 発現 ($P<0.001$) は統計学的に有意な RFS の予後規定因子であった。RFS に対する多変量解析については、IRE1 発現、リンパ管侵襲の有無、血管侵襲の有無、病理病期が独立した予後規定因子であり、ハザード比はそれぞれ 2.16 倍、0.44 倍、0.41 倍、そして 0.40 倍であった ($P=0.028, 0.037, 0.031$ そして 0.002)。

次に OS の単変量解析を行ったところ、病理病期 ($P=0.010$)、血管侵襲の有無 ($P=0.004$)、IRE1 発現 ($P=0.009$) は統計学的に有意な OS の予後規定因子であった。OS に対する多変量解析については、血管侵襲の有無が独立した予後規定因子であり、ハザード比は 0.09 倍であった ($P=0.022$)。

Kaplan-Meier method による解析では、小胞体ストレス関連遺伝子の高発現群と低発現群における RFS および OS は明らかに有意差が認められた。RFS に関して、PERK (高発現群; 2527 日, 低発現群; 1992 日, $P=0.003$)、ATF6 (高発現群; 2575 日, 低発現群; 1951 日, $P=0.001$)、IRE1 (高発現群; 2720 日, 低発現群; 1844 日, $P<0.001$) において高発現群で有意に長かった。OS に関しても同様に、IRE1 において高発現群で有意に長かった (高発現群; 3185 日, 低発現群; 2728 日, $P=0.009$) が認められた。

RFS、OS とともに統計学的に有意に高発現群で良好な結果が認められた IRE1 について、病理病期 I 期のみで検討したところ、IRE1 高発現群の方が RFS は長い傾向にあったものの統計学的な有意差は認められなかった (高発現群; 2918 日, 低発現群; 2461 日, $P=0.098$)。そこでよりよいカットオフ値を導入することで病理病期 I 期の肺腺癌患者の RFS の予後規定因子として IRE1 発現を利用できないか検証した。ROC 曲線から得られたカットオフ値として理想的な左上隅から最も近い点 (ベストポイント) や Youden index を用いる方法が知られており、それらを用いたところ IRE1 のカットオフ Δ Ct 値は -5.5 および -5.79 であった。これらを用いたところ、IRE1 Δ Ct 値 -5.5 のときで $P=0.010$ 、IRE1 Δ Ct 値 -5.79 のときで $P=0.002$ と統計学的有意差が認められた。以上より IRE1 発現が RFS 予後規定因子として有用な可能性が示された。

乳癌と胃癌では、ERO1L 発現と臨床的予後との関係についての報告があり、ERO1L 発現が VEGFR などの血管新生因子発現と相関し低酸素状態で ERO1L 発現が増えること、また臨床例においては ERO1L 高発現群の方が予後不良とのことで、本研究の結果とは矛盾した内容であった。また一方で、大腸癌においては ERO1L 高発現が MHC class I 分子の高発現と相関し、臨床的に良好な予後と関係し

ている可能性があるといった報告もある。さらに非小細胞肺癌においては、小胞体内に局在し新規に合成されたタンパク質の品質管理やフォールディングに関わるカルレティキュリン高発現と臨床的に良好な予後との関係が報告されており、それらの報告は本研究結果と似たものであった。乳癌と胃癌の報告において本研究と矛盾した結果であったことについては、公共データベースである **Cancer Cell Line Encyclopedia** で確認すると、癌種により **ERO1L** 発現量が大きく異なっており、癌種ごとに臨床経過に対する役割が異なる可能性が考えられる。いままでの報告および本研究結果から、小胞体ストレス関連遺伝子高発現群は、小胞体ストレスに対する対応力が上がり癌細胞生存に有利に働く側面を持っている一方で、小胞体ストレス関連遺伝子高発現群は、分化度が高く、癌免疫に関わり癌細胞の転移・進展に不利な側面も持っていることが示唆されている。その結果として、癌種により高発現群のどちらの側面がより強く表れるかによって、臨床経過が異なっている可能性がある。

本研究において、肺腺癌術後検体を用いた評価により **IRE1** 発現と **RFS**、**OS** において有意な差が認められ、**IRE1** 発現が独立した予後規定因子であることが示された。他の小胞体ストレス関連遺伝子よりも **IRE1** がより強く **RFS** や **OS** といった臨床経過に強く影響を与えた理由としては、**IRE1** が **UPR** に関与するシャペロンタンパク遺伝子の誘導だけではなく、**JNK** 経路や **NF- κ B** 経路といった面からのアポトーシス制御といったように、小胞体内のホメオスタシス維持に多方面から影響を及ぼすセンサータンパク質であることが、他の **PERK** や **ATF6** といったセンサータンパク質と異なる部分である。そういった複数の経路をもつことが **RFS** や **OS** などの経過に強く寄与した可能性は考えられる。また、**IRE1** 発現と **PERK** 発現との間には強い正の相関があり、他の小胞体ストレス関連遺伝子よりも **PERK** と **IRE1** との間には何らかのクロストークがある可能性が示唆された。

以上、本研究はヒト肺腺癌における小胞体ストレス関連遺伝子発現と術後経過との関係を検討し、小胞体ストレス関連遺伝子が高発現であることで術後予後が良好であり、とくに **IRE1** は独立した再発予後規定因子であることを明らかにした。本研究では簡便な腫瘍部分のリアルタイム **PCR** による **IRE1** 発現評価により、術後再発リスクなどを予測することにより、術後補助化学療法の対象患者や使用薬剤の検討などに応用できる可能性がある。またこれらの知見は、小胞体ストレスが関与する肺癌の臨床経過との関係を明らかにし、小胞体ストレス関連経路を標的とした創薬につながる可能性がある。