The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Proteomics-based identification of α-enolase as a tumor antigen in non-small cell lung cancer
Author(s)	和, 平
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48915
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【35】

氏　　名	和（ワ）　平（ヘイ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２１８２５　号
学位授与年月日	平成 20 年３月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学　位　論　文　名	Proteomics-based identification of α-enolase as a tumor antigen in non-small cell lung cancer （プロテオミクス手法による非小細胞肺癌自己抗原としてのα-enolase の同定）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　川瀬　一郎 （副査） 教　授　金倉　　譲　　教　授　青笹　克之

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

原発性肺癌は、悪性腫瘍臓器別死亡率において第一位を占め、その診断や治療のなお一層の向上が望まれる。腫瘍マーカーは肺癌などの腫瘍の存在の有無やその進行度を診断するだけでなく、治療の経過観察や予後判定として非常に重要である。癌患者の血清中には自己抗体が産生されており、これら自己抗体やその抗体を認識する自己抗原タンパク質は癌マーカーとして知られている。また、特異的腫瘍マーカーの発見は、その産生メカニズムを解明する事により病因の解明及び特異的治療法の開発に結びつく可能性がある。これまでの遺伝子解析により癌組織において発現している遺伝子の変動を網羅的に解析することはできたが、癌における自己抗原の情報を直接得ることは出来なかった。そこで、本研究ではプロテオミクス手法を用いて患者血清を直接解析することにより非小細胞肺癌新規自己抗原の同定とその解析を行った。

〔　方法ならびに成績　〕

非小細胞肺癌組織よりタンパク質を抽出し、SDS-PAGE または二次元電気泳動法によりタンパク質を展開し、非小細胞肺癌患者血清を一次抗体として用いてウェスタンブロット法を行った。健常人血清でのウェスタンブロットパターンと比較して、患者血清において特異的に反応するバンドおよびスポットを自己抗原と判定した。自己抗原に対応するタンパク質のバンドあるいはスポットはゲル内消化法と LC-MS や MALDI-TOF/MS などの質量分析機を用いた解析、及び MASCOT サーチエンジンによるデータベースサーチにより解析し、非小細胞肺癌の抗原タンパク質を同定した。この結果、alpha-enolase を含む、患者血清が認識する複数の自己抗原が検出された。また、市販の alpha-enolase 抗体を用いてウェスタンブロットを行った結果、患者血清でのウェスタンブロットと同じ位置にバンドが検出された。以上の結果から、非小細胞肺癌患者血清中に抗-alpha-enolase 抗体が存在することが考えられた。

次に、非小細胞肺癌患者血清中に抗 alpha-enolase 抗体が存在することを確認するために、alpha-enolase 遺伝子組み換えタンパク質を大腸菌発現系により発現、精製した。精製 alpha-enolase に対して非小細胞患者血清、及び健常人血清を用いてウェスタンブロット法を行った結果、非小細胞肺癌患者血清でのみ alpha-enolase との反応が認められた。Enolase には alpha、beta、gamma の３種類のアイソザイムが存在するため、これらの精製タンパク質につ

いて、患者血清、及び健常人血清を用いてウェスタンブロット法を行った結果、非小細胞肺癌患者血清はalpha-enolaseのみに特異的に反応することを確認した。

続いて、ELISA法により大規模な検体数の患者血清を用いて自己抗原陽性率を解析し、疾患マーカーの有効性を検証した。“Mean $OD_{healthy\ control\ sera}$＋3 $SD_{healthy\ control\ sera}$”カットオフ値として、非小細胞肺癌94例、小細胞肺癌15例、胃癌及び大腸癌18例、非定型抗酸菌症9例、正常コントロール60例に対してELISAで解析を行った結果、非小細胞肺癌において27.7%（26/94）の陽性例が認められた。小細胞肺癌、胃癌及び大腸癌、非定型抗酸菌症では抗alpha-enolase抗体の陽性例はなく、正常コントロールでは1.7%（1/60）であった。さらに、既存の癌マーカー（CEA, CYFRA 21-1）と抗-alpha-enolase自己抗体の併用により非小細胞肺癌の診断における陽性率が相加的に向上することが示唆された。

免疫組織染色解析により、正常肺組織に比べ、非小細胞肺癌組織においてalpha-enolaseの発現が上昇していることが明らかになった。Alpha-enolaseは解糖系の酵素で、細胞質に主に局在することが知られているが、非小細胞肺癌組織において、細胞膜にも局在が見られた。さらに、フローサイトメトリーによりalpha-enolaseが非小細胞肺癌細胞表面にも発現していることを確認し、発現の増強と細胞膜への局在が自己抗原としての認識されている事が示唆された。

最後にalpha-enolaseについてdeletion mutantを作成し、ウェスタンブロット法によりepitope部位を決定した結果、非小細胞肺癌におけるepitope部位はN-末端領域（1-134 a.a.）に存在することが示唆された。

〔　総　　括　〕

本研究の結果、プロテオミクス手法により新規非小細胞肺癌自己抗原としてalpha-enolaseを同定した。ELISA解析により抗 alpha-enolase 自己抗体は非小細胞肺癌のマーカーとしての有用性が示唆された。癌組織においてalpha-enolase発現の増加と細胞膜への局在は自己抗体が産生される原因の一つと考えられた。

論文審査の結果の要旨

腫瘍マーカーは肺癌などの腫瘍の存在の有無やその進行度を診断するだけでなく、治療の経過観察、予後判定及び病因の解明として非常に重要である。癌患者の血清中には自己抗体が産生されており、これら自己抗体やその抗体が認識する自己抗原タンパク質は癌マーカーとして知られている。学位申請者は、２次元電気泳動法と非小細胞肺癌患者血清を用いたウェスタンブロット法を組み合わせたプロテオミクス手法により、新規自己抗原のスクリーニングを行い、α-enolaseを同定した。そして、ELISA解析により抗α-enolase自己抗体は非小細胞肺癌に高く検出されること、及び、既存の腫瘍マーカーとの併用により非小細胞肺癌の診断における陽性率が相加的に向上することを明らかにした。以上のことから、抗α-enolase自己抗体は新しい非小細胞肺癌の腫瘍マーカーとして有用であると考えられる。申請者は学位の授与に値するものと認める。