

Title	肺がんの個別化医療の最適化に叶う診断バイオマーカーの探索とその基盤技術開発
Author(s)	山下, 琢矢
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59426
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	山 下 琢 矢
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬学)
学位記番号	第 2 5 1 7 6 号
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	肺がんの個別化医療の最適化に叶う診断バイオマーカーの探索とその基盤技術開発
論文審査委員	(主査) 教授 堤 康央 (副査) 教授 藤尾 慈 教授 辻川 和丈 教授 小比賀 聡

論文内容の要旨

近年の医学・薬学の進展に伴い、がんに対して様々な治療法が開発・利用できるようになった。しかし、がんは同じ臓器・組織由来であっても、患者・症例ごとに転移性の違いや抗がん剤抵抗性の有無、分子標的薬のターゲット分子の発現レベルの差といった多様な「個性」を持ち、一つの治療法が全ての患者に対して同様の効果を示すとは限らない。従って、各症例に対して有効な治療法を選択する個別化医療(治療の個別化)の推進が、治療効果の向上や副作用の低減、患者のQOL向上に繋がると期待される。この個別化医療を実現するためには、がんの形態学的な分類だけでなく、がんの個性を決定づける分子レベルの評価が必須であると考えられており、その指標となるたん白質や遺伝子などの「バイオマーカー」の開発が求められている。とりわけ、たん白質は生命活動の直接的な担い手であり、その量的・質的变化が、がんの個性を最も色濃く反映するものと期待される。そこで本研究では、個別化医療に叶う新たな『がんバイオマーカーたん白質』の同定を目指し、プロテオミクスの技術を駆使した“たん白質レベルでの探索法の応用と最適化”を試みた。

まず第一章では、がんの重要な予後決定因子であり、治療法の選択を左右する①「転移性」の指標となるバイオマーカーたん白質と、②抗がん剤の感受性を評価しうるバイオマーカーたん白質を同定するため、①転移性の異なるがん細胞間、②抗がん剤感受性の異なるがん細胞間のプロテオームを比較解析した。その結果、新規バイオマーカーたん白質候補として、高転移性の大腸がん細胞で高発現するRho GDP-dissociation inhibitor (Rho GDI)とシスプラチン低感受性の悪性中皮腫細胞で高発現するAnnexin A4 (ANXA4)をそれぞれ同定した。さらに、Rho GDIの発現は患者の原発腫瘍組織のリンパ節転移、ならびに大腸がん細胞の転移性と正の相関性を示すこと、ANXA4の発現は悪性中皮腫細胞のシスプラチン感受性と負の相関性を示すことを明らかとした。以上の結果より、Rho GDIは手術前にリンパ節の切除範囲を決定するためのバイオマーカーたん白質として、ANXA4はシスプラチン適用を判断し、他の薬剤(ペメトレキセドなど)への変更を検討するためのバイオマーカーたん白質として有望であると考えられる。さらに両分子は転移抑制・抗がん剤感受性亢進のためのターゲットたん白質として、診断薬や治療薬の開発へ展開が期待される。

一方、バイオマーカーたん白質が血液中で検出できない場合、患者から組織を採取し、検査する必要があるため、患者への心理的・身体的負担が大きい。従って、低侵襲的にがんの個性を判別でき、血液診断可能なバイオマーカーたん白質の同定が求められている。そこで第二章では、細胞から血中に分泌される膜小胞 (Exosome) に着目し、搭載分子の中でもEpidermal growth factor receptor (EGFR)のように、がん細胞の性質(増殖性など)を規定しており、さらに抗体を活用することで血液から直接検出できると考えられる、Exosome上の膜たん白質を対象とした新規バイオマーカーたん白質の探索とその検出系の構築を試みた。がん細胞特異性の高いExosome上の膜たん白質を同定するため、

初代ヒト正常肺上皮細胞と各種ヒト肺がん細胞株由来Exosomeを精製し、質量分析により各Exosomeのプロテオームを比較解析した。その結果、肺がん細胞株由来Exosomeに共通して発現する膜たん白質の中から、肺がんの代表的マーカーであるEGFRを同定した。さらに、新規バイオマーカーたん白質候補としてEph receptor A2(EphA2)とContactin-1(CNTN-1)を見出した。そこで、新規に同定された両分子の特性を解析し、バイオマーカーとしての有用性を検証するため、これらたん白質の発現分布を解析した。その結果、CNTN-1は肺がん特異性が高く、非小細胞肺がんの一種である肺腺扁平上皮がんを高率に発現していた。さらに肺がんの分化度やリンパ節転移、ステージには、CNTN-1の発現レベルとの相関関係が認められ、肺がんの血中バイオマーカーたん白質として有望である可能性が示された。一方でEphA2は、がん組織のみならず広範な正常組織にも発現していたが、CNTN-1との共発現症例では、CNTN-1の単独発現症例で認められた各種臨床情報との相関傾向が強くなったことから、今後、他の肺がん関連バイオマーカーとの組み合わせを検証することで、がん個別化医療に叶う、より高確度な検査・診断法の開発に繋がるものと期待される。上述のようにExosomeには、がんの特性に関わるバイオマーカー膜たん白質が発現しているが、これらを測定する方法論は現在確立されていない。そこで、見出したバイオマーカー膜たん白質の血液検査への応用を目指して、ExosomeマーカーであるCD81に対する抗体で血中のExosomeを捕捉し、目的分子に対する抗体でExosome上のバイオマーカーたん白質を検出するELISA系を組み上げ、その有用性を検証した。EGFR・CNTN-1・EphA2を発現するがん細胞を移植したマウスモデルの血液を用いて、各バイオマーカーたん白質を検出した結果、組織由来のExosome上に発現する各たん白質が検出されたことから、上記検出系にてがんの検査が可能であることが示された。また、Exosome上のがん関連膜たん白質は、将来的に抗体医薬の創薬ターゲットとして利用できる可能性も考えられ、選択する抗がん剤の適用の可否や治療効果を血液から判定するコンパニオン診断への応用も期待される。

以上、本博士論文では、がんの個別化医療の最適化に叶う新規診断バイオマーカーたん白質候補として、Rho GDI・ANXA4・CNTN-1・EphA2を同定した。さらに、がん組織から分泌されるExosomeを活用した新規がん血液検査法の基盤技術を構築し、今後のがん薬物療法の安全性確保やその結果として得られる安心確保など、薬物療法の最適化に資する有用な知見を得た。今後、本研究で提示したバイオマーカーたん白質とその解析手法が、患者目線からの安全でしかも安心な次世代がん医療の幕開けに貢献することを心から期待している。

論文審査の結果の要旨

本研究では、個別化医療の最適化に叶うバイオマーカーたんぱく質の開発を目的に、大腸がんや悪性中皮腫の組織由来のバイオマーカーたんぱく質の探索に加え、肺がん由来の血液バイオマーカーたんぱく質の探索では、世界的にも先端的な取組と言える、がん細胞由来Exosomeの膜たんぱく質に着目したプロテオーム解析に挑戦し、その中で、同定膜たんぱく質を血液中から簡便かつ直接的に測定可能なELISA系を組み上げるなど、下記のように、多くの新しく、有用な結論を得ている。

1. Rho GDIが大腸がんにおける転移性バイオマーカーたんぱく質となり得ること、ANXA4が悪性中皮腫におけるCDDP感受性バイオマーカーたんぱく質となり得ることを見出した。
2. CNTN-1は肺がん組織および肺がん分泌Exosome上に発現しており、肺がん特異性にも優れることから、肺がんの新規血中バイオマーカーたんぱく質となり得ることを先駆けて見出した。
3. CD81と目的分子に対する抗体でExosome上のバイオマーカーたんぱく質を検出するELISA系が、血中Exosome上のバイオマーカーたんぱく質発現レベルの測定、および、それによるがん組織でのバイオマーカーたんぱく質の発現評価に応用でき

る可能性を示した。

がんの個別化医療の最適化に叶う診断バイオマーカーたんぱく質として、上記3種類のたんぱく質を同定し、一方で、がん組織から分泌されるExosomeを活用した、新規がん血液検査法の基盤技術を構築するなど、以上の知見・成果は、今後のがん薬物療法の安全性確保やその先の安心確保など、その最適化に資するものと考えられ、博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいものと考えられる。