

氏名・(本籍)	花岡 淳 (滋賀県)				
学位の種類	博士(医学)				
学位記番号	博士第372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13年3月26日				
学位論文題目	肺癌における MUC4 ムチン発現の解析				
	審査委員	主査 教授	岡部 英俊		
		副査 教授	大久保 岩男		
		副査 教授	西 克治		

論文内容の要旨

【目的】

MUC4 ムチンは、肺癌をはじめ種々の上皮性腫瘍において mRNA レベルで高発現することが報告されてきた。ムチン蛋白の中で最も解析の進んでいる MUC1 ムチンは、癌化にともなう過剰発現や糖鎖形成異常によりホストに抗腫瘍免疫応答を誘導することが分かっており、癌免疫治療の標的腫瘍抗原として臨床応用されている。MUC1 ムチンと類似構造を持つ MUC4 ムチンも、分子上に免疫原性の高い抗原エピトープが存在する可能性が示唆される。本研究では MUC4 ムチンが癌免疫治療の標的抗原となる可能性を検討する目的で、新たに作成した MUC4 コア特異的抗体を用いて肺癌組織における MUC4 蛋白発現を解析するとともに、MUC4 mRNA 発現との比較検討を行った。さらに MUC4 発現と肺癌患者の臨床所見との相関についての解析も行った。

【方法】

MUC4 コア繰り返し部分の塩基およびアミノ酸配列に従い、33塩基の核酸プローブとその前後に4アミノ酸を付加した24アミノ酸長の合成ペプチドを作成した。同ペプチドを家兎に免疫し、これより得られた抗血清は spot test および immunoabsorption test にて MUC4 コアペプチドに対する特異性を確認した。肺癌切除組織の MUC4 蛋白発現は家兎抗血清を用いた免疫組織化学法を行い、mRNA 発現は核酸プローブを用いた Northern blot 法により解析した。統計学的検討は2群間の比較を t 検定で行い、危険率 $p < 0.05$ をもって統計学的有意とした。

【結果】

MUC4 ペプチドを家兎に免疫して得られた抗血清は、spot test および immunoabsorption test において MUC4 コアペプチドを特異的に認識していた。同抗血清を用いた正常肺組織の免疫組織化学染色では、細気管支上皮細胞の管腔側のみが弱く染色された。これに対し、肺癌組織では多くの癌細胞の細胞質がびまん性に強く染色された。66.7%の肺癌症例で MUC4 蛋白発現が陽性であった。Northern blot 法では、肺癌組織の72.4%で MUC4 mRNA の強発現が認められ、そのシグナル強度は近傍正常肺組織と比較し明らかに増強していた。MUC4 mRNA 発現と蛋白発現の比較が可能であった19症例中16例で mRNA と蛋白発現が一致していた。残り3症例中2例では mRNA の発現を認めるものの蛋白発現は認めず、1例は蛋白発現のみ確認できた。MUC4 蛋白および mRNA 発現は、肺腺癌症例ではそれぞれ53.8%と77.8%、肺扁平上皮癌症例ではそれぞれ66.7%と71.2%であり、両組織間に統計学的有意差は認められなかった。他の組織型では全例 MUC4 の発現が認められたが、症例数が少ないためその組織特異性の評価は行い得なかった。MUC4 発現と臨床病期、T 因子および N 因子との間には有意な相関関係は認められなかった。

【考察】

MUC4 ムチンは長く複雑な糖側鎖を持つ繰り返し配列がコア蛋白上に数百回以上も繰り返す構造的特徴を有している。そのため従来の方法では分離・抽出が困難であり、蛋白解析を行うための有用な抗体を作成したという報告はなされていない。本研究では、作成した MUC4 コア特異的抗体を用いて切除肺癌組織での蛋白解析をはじめて行った。今回検討した切除肺癌組織の66.7%に

MUC4 蛋白発現を認め、72.4%で MUC4 mRNA レベルが上昇していた。症例の80%は mRNA と蛋白の同時発現が認められた。しかし MUC4 mRNA が高発現しているにもかかわらず蛋白発現は認められない症例もあり、コア蛋白上の抗原エピトープが糖鎖によりマスクされている可能性が考えられた。今回の検討では、MUC4 発現と肺癌の組織型をはじめ臨床所見との間に相関関係は得られなかった。予後との関係については今後検討を行うつもりである。

【結 論】

MUC4 コア蛋白に対する特異的抗体を作成し、肺癌組織における MUC4 蛋白発現をはじめて解析するとともに、MUC4 mRNA 発現との比較検討を行った。MUC4 蛋白は肺癌組織に高発現しており、これは mRNA レベルでの発現増加と糖鎖の形成不全によりコア蛋白が露出するためと考えられた。MUC4 発現と臨床所見との間に相関関係は認められなかった。以上より、MUC4 ムチンは腫瘍抗原として臨床応用される可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

上皮細胞に発現するムチンは、癌化に伴いその発現やタンパク質構造が変化することが知られている。MUC4 ムチンはこれまで mRNA レベルで肺癌に高発現することが示されてきたが、タンパク質発現や構造解析はいまだ行われていない。

本研究は、新たに作成した抗 MUC4 特異抗体（抗ペプチド抗体）を用いて、ヒト肺癌組織でのタンパク質発現解析を行うとともに、それと mRNA 発現との相関性および肺癌組織型・臨床病期との関連について検討を行ったものである。

その結果、1) MUC4 は組織型・臨床病期に関係なく肺癌細胞に高発現していること、2) MUC4 の mRNA 過剰発現と糖鎖形成不全によるコアタンパク質露出が肺癌での高発現に寄与していることを初めて明らかにした。

この成果は、肺癌の生物学的・免疫学的特性を解析する上で重要と考えられ、博士（医学）の学位論文に値するものである。

尚、本学位申請者は平成13年2月27日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた。