

2006.7

特集号



(題字：相良祐輔学長)

国立大学法人 高知大学学報

高知大学学位授与記録第十三号

評価広報課 発行

本学は、次の者に博士（医学）の学位を授与したので、高知大学学位規則第15条に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

目 次

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲医博第 31 号	石原 剛	Carbonic anhydrase-related protein VIII increases invasiveness of non-small cell lung adenocarcinoma (炭酸脱水酵素関連蛋白VIIIは非小細胞性肺癌の浸潤能を増強する)	1
乙医博第 25 号	久保 亨	Lifelong left ventricular remodeling of hypertrophic cardiomyopathy caused by a founder frameshift deletion mutation in the cardiac myosin-binding protein C gene among Japanese (心筋ミオシン結合蛋白C遺伝子のフレームシフト変異による肥大型心筋症の左室リモデリング)	5

氏名(本籍)	石原 剛 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第31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18年4月28日
学位論文題目	Carbonic anhydrase-related protein VIII increases invasiveness of non-small cell lung adenocarcinoma (炭酸脱水酵素関連蛋白Ⅷは非小細胞性肺癌の浸潤能を増強する)
発表誌名	Virchows archive 2006年(in press)

審査委員	主査	教授	麻生 悌二郎
	副査	教授	今井 章介
	副査	教授	田口 博國

論文の内容の要旨

(背景)

炭酸脱水酵素 (Carbonic anhydrase; CA) は二酸化炭素の水和反応 $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ を可逆的に触媒する亜鉛要求性の酵素であり、これまで12種類のヒトCA アイソザイムが報告されている。一方、CAと高い分子相同性を持つが、亜鉛との結合に必須であるヒスチジン残基を欠失するためCAとしての酵素活性を持たない蛋白群があり、炭酸脱水酵素関連蛋白 (carbonic anhydrase-related protein; CA-RP) と呼ばれる。CA-RP (CA-RP VIII, X, XI) の生物学的機能は不明であるが、大腸癌および非小細胞性肺癌では正常上皮細胞に比べCA-RP VIIIが過剰に発現 (特に浸潤先端部において発現) することが報告されている。また、CA-RP VIIIは胎児肺組織でも発現が見られ、癌胎児性抗原としての性格を有する可能性がある。

(目的)

本研究では非小細胞性肺癌、特に腺癌細胞におけるCA-RP VIIIの機能を検討するため、肺腫瘍組織でのCA-RP VIIIの発現を免疫組織学的に検討した。さらにCA-RP VIIIを過剰に発現する培養肺腺癌細胞を作製し、肺癌細胞の形態および浸潤能の変化を検討した。

(方法、結果)

1. サイトメガロウイルスプロモーター活性を持つ pCI-neo、あるいはヒトEF-1 α プロモーター配列を上流にもつ pEF1-His の2つの発現ベクターを用い、肺の高分化型腺癌由来の細胞株であるPC-9にCA-RP VIII遺伝子を導入した (以後、CA-RP VIIIを導入したPC-9をそれぞれ pCI-CA8-PC9、pEF-CA8-PC9と表記する)。半定量RT-PCRでCA-RP VIIIのm-RNA発現を検討した結果、コントロールPC-9では発現が見られなかったのに対し、pCI-CA8-PC9では有意な

transcriptsの発現が見られ、pEF-CA8-PC9ではさらに強いCA-RP VIIIのm-RNA発現が確認された (Real-time PCRではpCI-CA8-PC9でコントロールPC-9の5.5倍、pEF-CA8-PC9で10.5倍の発現量)。

2. 電子顕微鏡にて観察した結果、pEF-CA8-PC9、pCI-CA8-PC9では細胞質内に多くの内腔状構造を含み、内腔の裏打ちには多数の絨毛様突起を認めた。一方、コントロールPC-9ではほとんど内腔状構造が見られなかった。また、pEF-CA8-PC9では核の偏在を伴う印環細胞癌様細胞が観察された。PC-9、pCI-CA8-PC9とpEF-CA8-PC9の印環細胞の出現率はそれぞれ0.2%、 $1.7 \pm 0.9\%$ 、 $3.7 \pm 0.08\%$ であった。
3. 免疫組織染色の結果、正常の気管支肺胞上皮細胞、Atypical adenomatous hyperplasia (AAH)、および病理組織学的にnon-invasiveであるbronchioloalveolar cancer (BAC) ではCA-RP VIIIの発現はほとんど見られなかった。一方、BACを周辺に示しそれからの進行と考えられるinvasive cancerのmixed type adenocarcinoma (MX) では73% (n=11) に、BACを示さず発生段階より浸潤癌と考えるMXではすべての組織標本 (n=8) において、CA-RP VIIIの強い発現が見られた。特に、肺腺癌の印環細胞成分 (n=3) で強いCA-RP VIIIの発現が見られた。なお、浸潤性粘液性腺癌では強いCA-RP VIIIの発現が見られたが、粘液産生性のBACではCA-RP VIIIの発現がほとんど見られなかった。
4. pEF-CA8-PC9、pCI-CA8-PC9及びPC-9において細胞の遊走能および浸潤能を検討した結果、3種類の細胞において遊走能の変化は見られなかったが、CA-RP VIIIを高発現している細胞に強い浸潤能の増強が見られた。
5. pEF-CA8-PC9、pCI-CA8-PC9及びPC-9においてMMP-2/MMP-9 およびMUC 1/2/4/5A/5B/7のmRNA量をRT-PCRにより検討したが、いずれの細胞株でも有意な発現は確認されなかった。

(結論)

1. CA-RP VIIIは浸潤性の肺腺癌組織において強い発現が見られ、CA-RP VIIIを強制発現させた培養肺腺癌細胞では浸潤能が増強されたことより、CA-RP VIIIは肺癌の浸潤能を増強することが示された。CA-RP VIIIによる浸潤能の増強においてMMPの関与は否定的であった。
2. CA-RP VIIIを強制発現させた培養肺腺癌細胞では細胞質内腔状構造 (印環細胞) の出現が多く、肺腺癌の印環細胞成分で強いCA-RP VIIIの発現が見られた。しかし、印環細胞様の形態を示さない細胞でもCA-RP VIIIの発現が見られること、CA-RP VIIIはMUCの発現に影響しないことより、CA-RP VIIIは粘液産生能を増強するのではなく、肺腺癌細胞の脱分化を促した結果、印環細胞様の形態変化ならびに浸潤能の増強を示すと考えられた。

論文審査の結果の要旨

炭酸脱水酵素 (Carbonic anhydrase: CA) は、二酸化炭素の水付加と炭酸水素イオンの脱水の過程を触媒する亜鉛要求性の酵素であり、ヒトでは12種類のアイソザイムが存在する。また、CA と高い相同性を有するが亜鉛との結合に必要なヒスチジン残基を欠失するために CA としての酵素活性をもたない蛋白群が存在し、炭酸脱水酵素関連蛋白 (Carbonic anhydrase-related protein: CA-RP) と呼ばれている。CA-RP として、これまでに CA-RPVIII、X、XI の3つの分子が単離されているが、それらの生物学的意義については不明な点が多い。最近、申請者らのグループは、CA-RPVIII が大腸癌および非小細胞性肺癌の組織において高発現を示すこと、また、成人肺では検出不能だが胎生期の肺で発現を認めることを見出し、同蛋白が癌胎児性抗原の1つである可能性を報告している。

本申請論文では、CA-RPVIII の非小細胞性肺癌、特に腺癌の病態への関与について明らかにするため、前癌状態および Stage IA の腫瘍内における CA-RPVIII の発現を免疫組織学的に検討した。さらに、CA-RPVIII を過剰発現する肺腺癌細胞株を作製し、発現レベルと腫瘍細胞の形態、ならびに浸潤、遊走能との関連について解析を行なった。

得られた結果は、以下のようにまとめられる。

(1) Cytomegalovirus のエンハンサー/プロモーターを持つ pCI-neo ベクターとヒト Elongation factor-1 α 遺伝子のプロモーターを持つ pEF1 ベクターとを用いて CA-RPVIII 遺伝子を肺の高分化型腺癌由来の細胞株 PC-9 に導入し、CA-RPVIII の安定発現細胞株の単離を試みた。その結果、空ベクターを入れたコントロール PC-9 に比べて mRNA レベルで 5.5 倍と 10.5 倍の発現量を示す CA-RPVIII 過剰発現型 PC-9 細胞が得られた。以下、5.5 倍のものを中等度発現型 PC-9 細胞、10.5 倍のものを高度発現型 PC-9 細胞と記す。

(2) 電子顕微鏡による観察の結果、コントロール PC-9 細胞は胞体内に内腔状構造をもたないのに対して、中等度および高度発現型 PC-9 細胞は、表面が絨毛様突起で覆われた多数の内腔状構造を伴うことが明らかになった。また、過剰発現群には核の偏在を伴う印環細胞の出現が認められた。コントロール、中等度、および高度発現型 PC-9 細胞における印環細胞の割合は、各々 0.2%、1.7%、3.7% であった。

(3) 前癌状態および Stage IA の肺腫瘍組織内における CA-RPVIII の発現状況を免疫組織染色により検討した。正常気管支肺胞上皮細胞、前癌状態の Atypical adenomatous hyperplasia (AAH)、および非浸潤癌である Bronchioalveolar cancer (BAC) では、CA-RPVIII の発現がほとんど認められなかった。一方、BAC を周辺に示しそれから進行したと推定される浸潤癌の Mixed type adenocarcinoma (MX) では 11 例中 8 例 (73%) に、BAC を伴わず発生段階より浸潤癌であったと推定される MX では 8 例中 8 例 (100%) において CA-RPVIII の強い発現が認められた。また、肺腺癌の印環細胞成分でも CA-RPVIII の強い発現が認められた。しかし、浸潤性粘液性腺癌では CA-RPVIII の強い発現が認められたものの、粘液産生性の BAC では発現がほとんど認められず、CA-RPVIII の発現と腫瘍の粘液産生能との間には直接の関連がないことが示唆された。

(4) 免疫組織学的検討の結果、CA-RPVIII の発現と腫瘍の浸潤性との間に関連があることが示唆されたので、作製した 3 種の PC-9 細胞株間で遊走能と浸潤能について比較検討した。Transwell chamber を用いた解析の結果、遊走能には差を認めなかったが、浸潤能が CA-RPVIII の発現増加に伴い有意に亢進することが判明した。

(5) 肺癌の浸潤に伴い Matrix metalloproteinase (MMP) やムチンコアタンパクの発現量が増加することが知られている。そこで、RT-PCR により MMP-2 および-9、MUC-1、-2、-4、-5AC、-5B、および-7 の発現量について検討したが、コントロール、中等度および高度発現型 PC-9 細胞の間に有意差を認めなかった。

以上のように、CA-RPVIII が浸潤性の肺腺癌組織において高発現を示し、また、CA-RPVIII を強制発現させた肺腺癌細胞株で発現レベルと浸潤能との間に正の相関が認められたことより、申請者らは、CA-RPVIII が肺腺癌の浸潤能増強にはたらく候補因子の 1 つであると結論した。これらの結果は、CA-RPVIII が肺腺癌に対する分子標的治療の標的となり得ることを示唆するものであり、医学的に高い価値を有すると認められた。今後、RNA interference 等を用いた CA-RPVIII の浸潤能増強への関与の直接的な証明、当該機能に必要な CA-RPVIII タンパクのドメインの決定、等の作用メカニズムに迫る解析、ならびにマウス等を用いた in vivo の系での CA-RPVIII の作用の検討が必要と考えられた。

氏名(本籍)	久保 亨 (香川県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙医博第25号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成18年6月6日
学位論文題目	Lifelong left ventricular remodeling of hypertrophic cardiomyopathy caused by a founder frameshift deletion mutation in the cardiac myosin-binding protein C gene among Japanese (心筋ミオシン結合蛋白C遺伝子のフレームシフト変異による肥大型心筋症の左室リモデリング)
発表誌名	Journal of the American College of Cardiology 2005;46(9):1737-1743 2005年11月

審査委員	主査	教授	杉浦	哲朗
	副査	教授	佐藤	隆幸
	副査	教授	笹栗	志朗

論文の内容の要旨

(背景)

肥大型心筋症 (HCM) は、原因不明の心肥大を呈する疾患で約半数に家族内発症がみられる。現在ではサルコメア蛋白の遺伝子群を中心に60%前後に原因遺伝子変異認め、1990年以降、HCMの遺伝型と表現型の関連性 (genotype-phenotype correlation) の研究が多く施設から報告されてきた。ミオシン重鎖の遺伝子変異は著明な左室肥大の原因となり予後が不良であり、心筋ミオシン結合蛋白C遺伝子変異は遅発性心肥大を呈し比較的良好な経過を示すとされた。しかしながら、そのほとんどが横断研究である。HCMは、形態や機能の変化が生涯を通じて進行する疾患と考えられ、時間経過とともに左室リモデリング (肥大の出現から進展さらには拡大に至る) をきたすにもかかわらず、genotype-phenotype correlationについて長期的視点での縦断的評価は行われていない。

(目的)

今回我々は、同一心筋ミオシン結合蛋白C変異 (V592fs/8) を有するHCM患者において長期縦断的な視点からその左室リモデリングについて検討した。

(方法)

1982~2004年までに高知大学医学部附属病院を受診されたHCM 94家系について遺伝子解析を施行した。発端者のHCMの診断は、高血圧症や大動脈弁狭窄症などの明らかな原因を認めない心肥大 (心エコーにて最大壁厚15mm以上) とした。また、可能な範囲で家系内スクリーニング (原因不明の心肥大の有無ならびに遺伝子解析) を施行した。

臨床病型 (phenotype) の評価には、心電図、心エコー検査、ホルター心電図を用いた。

遺伝型 (genotype) の解析は、direct sequenceにて変異の有無を確認した。また、同一遺伝子変異 (V592fs/8) を有する家系がお互いに祖先のレベルで関連があるか否かに関してハプロタイプ解析を行った。

(結果)

Genetic results

HCM 94家系のうち15家系に同一の心筋ミオシン結合蛋白C変異 (V592fs/8) を認めた。さらに家系内スクリーニングで、合計39人に同一遺伝子変異を認めた (genotype陽性)。

ハプロタイプ解析では、15家系に共通のハプロタイプを認め、この遺伝子変異は共通の先祖から生じた (founder effect) 可能性が高いことが示唆された。

Clinical manifestation

Genotype陽性39人の初診時よりの平均フォローアップ期間は 8.0 ± 5.4 年であり、そのうち30人がphenotype陽性であった。この遺伝子変異における浸透率は50歳以上で100%、50歳未満で65%であった。Phenotype陽性30人の診断時平均年齢は47歳で、19人 (63%) に心症状を認めた。初診時の左室最大壁厚は 21 ± 5.3 mm、3人 (10%) が安静時に30mmHg以上の左室流出路の圧較差を有していた。

突然死の家族歴は15家系中の4家系6人に認め、6人中5人が50歳以上での突然死であった。

Clinical course

Phenotype陽性30人の平均フォローアップ期間は 9.2 ± 5.5 年であり、10人に心房細動がみられ、うち2人が脳塞栓による死亡を起こした。

心エコーでの縦断的な観察では、左室拡張末期径は年齢とともに拡大を認めた (初診時平均 44 ± 7.4 mm、最終フォローアップ時 47 ± 8.1 mm)。左室収縮能は中年期までは保たれているが、中年以降に駆出率の低下がみられた。左室駆出率50%未満を呈する'end-stage' HCMへの移行はgenotype陽性39人中7人 (18人) に認められた。

7人の'end-stage' HCM患者全員は、経過中にNYHAの増悪を示し最終フォローアップ時まで心房細動の合併を認めている。

最終的にphenotype陽性30人のフォローアップ (平均 9.2 ± 5.5 年) にて、7人 (23%) に心不全による入院歴を認め、4人 (13%) が死亡あるいは植込み型除細動器の作動を認めた。

(考察)

本研究は、遺伝的な側面をふまえたHCM患者の病態変化を長期縦断的な視点から明らかにした初めての報告である。すなわち、心筋ミオシン結合蛋白C変異 (V592fs/8) を有する患者は、発症年齢は比較的遅いが、年齢とともに左室リモデリング (左室拡大と収縮能低下) が進行してくる例が多く、臨床経過は必ずしも良好ではないことが明らかにされた。これまでHCMは比較的予後の良好な疾患と認識されていたが、今回の研究では、経過中に 'end-stage' HCMへの移行が高頻度で見られ、心不全や心房細動発症が多く、長期間にわたる注意深い観察が必要と考えられた。

(今後の展望)

Genotype陽性39人において、年齢とともに左室収縮能の低下をきたしたのは全例ではなかった。原因遺伝子変異は共通しているにもかかわらずこのように臨床経過が異なるには、その他の修飾因子 (遺伝的あるいは環境的因子) の存在が考えられる。今後は、病態を修飾する因子の同定を明らかにすることが重要と考えられる。

論文審査の結果の要旨

【背景】肥大型心筋症 (HCM) は原因不明の心肥大を呈する心筋疾患で、時間経過とともに左室リモデリングをきたし、心臓の形態や機能変化が進行する。HCMの約半数に家族内発症がみられ、現在ではサルコメアタンパクの遺伝子群を中心に原因遺伝子が明らかになっている。HCMの遺伝型と臨床病態や生存予後などの表現型との関連 (genotype-phenotype correlation) の研究は臨床的に重要な意義を持つが、そのほとんどが横断的研究で長期的視点での縦断的評価は行われていない。

今回申請者らは、遅発性心肥大を呈し、比較的良好な経過を示すとされた心筋ミオシン結合蛋白C遺伝子変異を有するHCM患者において長期縦断的な視点から genotype-phenotype correlation を検討した。

【方法】1982～2004年までに高知大学医学部附属病院を受診されたHCM94例について遺伝子解析を施行した。HCMの診断は、高血圧症や大動脈弁狭窄症など明らかな原因を認めない心肥大 (心エコーにて最大壁厚 15mm以上) とした。臨床病型の評価には心電図、心エコー検査、ホルター心電図を用いた。また、家系内スクリーニング (原因不明の心肥大の有無ならびに遺伝子解析) を施行し、同一遺伝子変異 (V592fs/8) を有する家系がお互いに祖先のレベルで関連があるか否かに関してハプロタイプ解析を行った。

【結果】得られた結果は以下のように要約される。

- 1) HCM94家系のうち15家系に同一の心筋ミオシン結合蛋白C変異(V592fs/8)を認め、合計39例に同一遺伝子変異を認めた(genotype陽性)。また、15家系に共通のハプロタイプを認め、この遺伝子変異は共通の先祖から生じた可能性が高いことが示唆された。
- 2) Genotype陽性39例のうち30例がphenotype陽性であった。この遺伝子変異における浸透率は50歳以上で100%、50歳未満で65%であった。
- 3) Phenotype陽性30例の診断時平均年齢は47歳で、19例(63%)に心症状を認め10例に心房細動がみられ、うち2例が脳梗塞によって死亡した。
- 4) 心エコーによる左室拡張期径は年齢とともに拡大し、左室収縮能は中年期以降に駆出率の低下がみられた。左室駆出率50%未満を呈する'end-stage' HCMへの移行はgenotype陽性39例中7例(18%)に認められた。
- 5) フォローアップ(平均 9.2 ± 5.5 年)期間中、Phenotype陽性の7例(23%)に心不全による入院歴、4例(13%)に死亡あるいは植込み型除細動器の作動を認めた。
- 6) 突然死は15家系中の4家系6例に認め、6例中5例が50歳以上であった。

【考察】申請者らはHCM家系について遺伝子型と臨床病型および生命予後との関連を長期縦断的な視点から検討し、心筋ミオシン結合蛋白C変異(V592fs/8)を有するHCM患者は発症年齢は比較的遅いが、年齢とともに左室リモデリング(左室拡大と収縮能低下)が進行してくる例が多く、臨床経過は必ずしも良好ではないことを明らかにした。今後は臨床経過を修飾する他の因子(遺伝的・環境因子)を明らかにすることも重要であるが、本研究は遺伝的な側面をふまえたHCM患者の病態変化を長期縦断的な視点から明らかにした初めての報告である。その成果はHCMのgenotype-phenotype研究のあり方に貢献するところが大きく、また、将来HCMの臨床像の予測や効果的な治療法に対し示唆を与えるものであり、本論文は高知大学医学部博士(医学)に値すると評価された。