

氏 名（本籍）	ほし 星	ふみ 史	ひこ 彦
学位の種類	博 士（医 学）		
学位記番号	医 博 第 2 6 9 6 号		
学位授与年月日	平 成 2 1 年 3 月 2 5 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻		
学位論文題目	非小細胞肺癌におけるアポトーシス関連遺伝子 Survivin の発現と予後への影響についての研究		

（主 査）

論文審査委員	教授 近 藤	丘	教授 貫 和 敏 博
	教授 佐 藤 靖 史		

## 論文内容要旨

肺癌は世界中で患者数が増加しており、肺癌による死亡は、がん死の中で男性は最多、女性も乳癌に次いで第二位である。肺癌の約8割を占めている非小細胞肺癌の予後因子の探索は、患者の予後を推測するのみならず、適切な治療を行う上で非常に重要なことである。

Survivin はアポトーシスを抑制する作用をもつ Inhibitor of Apoptosis (IAP) family に属しているタンパク質の中で、唯一細胞分裂制御機能も有している。また一部をのぞきほとんどの成人正常細胞で Survivin は発現が認められない一方で、非小細胞肺癌を含む各種癌細胞では高率に発現が認められている。これらの点から Survivin は単なる予後因子だけではなく、がん治療のターゲット遺伝子としても近年注目されている。

これまで Survivin は細胞内では核および細胞質に局在している事が確認されており、核局在が予後に影響を与えていると考えられているが、非小細胞肺癌における survivin の局在と予後との関係は未だ不明である。また、Survivin には5つの variants の存在が確認されており、異なる機能を有していると考えられているが、非小細胞肺癌における variants の機能の詳細は不明な点が多い。

本研究では、まず非小細胞肺癌症例 100 例を対象に Survivin の局在と予後との関係を免疫組織化学的に検討した。その結果、非小細胞肺癌では核における Survivin の局在が独立した予後不良因子である事が明らかとなった。細胞質に局在している Survivin は抗アポトーシス作用を担い、核の Survivin は細胞分裂の制御を行っていると考えられていることから、非小細胞肺癌において予後に影響を与えているのは細胞分裂を制御する Survivin の機能であり、他の IAP より抗アポトーシス作用が弱い Survivin が、予後に多大な影響を与え得るのは、Survivin のみが細胞分裂制御機能を有した IAP だからであると考えられた。

次いで、非小細胞肺癌の凍結標本 73 例、細胞株 10 株における Survivin の variants の発現量を real-time RT-PCR にて求め、予後への影響を検討した。その結果、Survivin- $\Delta$ Ex3 及び Survivin-3B が予後不良因子であり、Survivin-2B が予後良好因子である事が明らかとなった。遺伝子配列上、Survivin- $\Delta$ Ex3 には Nuclear Localization Sequence が存在しており、核に局在していると考えられている。これは免疫染色の結果と矛盾しない。Survivin-3B の局在は不明であるのだが、今回の結果から Survivin-3B も核に局在していると考えられた。更に細胞株において予後不良因子である Survivin-3B および予後良好因子である survivin-2B の mRNA を siRNA にて抑制し、その細胞の増殖能を MTT assay で測定した。siRNA によって、Survivin-3B や Survivin-2B の発現は、それぞれ単独に抑制可能であることは確認できたが、variant を単独に抑制するのみでは増殖能に差は認められなかった。

一方正常肺組織における Survivin variants の mRNA 発現量を求めたところ、Survivin-2 $\alpha$  が全体の約 85% と最も多く発現していることが明らかになった。非小細胞肺癌では Survivin-2 $\alpha$  の発現量は非常に少なく、凍結標本で全体の 7%、細胞株で 12% を占めるに過ぎず、正常肺組織の variants の発現様式とは異なっていた。

## 審査結果の要旨

肺癌は世界中で患者数が増加しており、肺癌による死亡は、がん死の中で男性は最多、女性も乳癌に次いで第二位である。肺癌の約8割を占めている非小細胞肺癌の予後因子の探索は、患者の予後を推測するのみならず、適切な治療を行う上で非常に重要なことである。

本論文は非小細胞肺癌においてアポトーシス関連遺伝子である Survivin およびその variants の発現頻度や予後に与える影響について検討したものである。

実験は非小細胞肺癌の手術標本100例に対し免疫染色を行い Survivin の発現頻度を検討した。また凍結標本73例、非小細胞肺癌細胞株10株、正常肺凍結標本20例に対し real-time RT-PCR を行い、Survivin の variants の発現および予後に与える影響を検討した。更に siRNA を用いて、variants の発現を特異的に抑制し、細胞株の増殖能に与える影響を検討し以下に示す結果を明らかにした。

- 1) 免疫染色の結果、非小細胞肺癌では核における Survivin の局在は独立した予後不良因子である。
- 2) 細胞質における Survivin の局在は予後に影響を与えない。
- 3) NFkappaB の発現と細胞質における Survivin の局在との間には相関関係が認められる。
- 4) 非小細胞肺癌において、Survivin-2B 高発現群は独立した予後良好因子である。
- 5) 一方 Survivin-3B 高発現群は独立した予後不良因子であり、Survivin- $\Delta$ Ex3 高発現群は予後不良な傾向を示した。
- 6) 非小細胞肺癌では各 variant の中で wild type Survivin の発現量が最も多かったが、正常肺では Survivin-2 $\alpha$  の発現が最も多かった。
- 7) siRNA を用いて、予後に影響を与える Survivin-2B や Survivin-3B の発現を単独で抑制しても細胞の増殖能に影響を与える事はできなかった、しかし variants 非特異的に発現を抑制すると細胞の増殖能が低下する事が認められた。

アポトーシス関連遺伝子である Survivin はアポトーシス抑制作用だけではなく、細胞周期を制御する作用も有している。本研究では非小細胞肺癌の予後に影響を与えるのは、核に局在し細胞周期制御に関与する Survivin である事を明らかとした。また5つの variants すべての発現量を RT-PCR で解析したのは本研究が初めてであり、予後に影響を与える variants を明らかにした。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。