

氏名	中野 雅之		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 8672 号		
学位授与年月	平成 30年 3月 23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	肺腺癌における Cyclophilin A と Hypoxia inducible factor-1 alpha の発現の臨床病理学的検討		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	関根 郁夫
副査	筑波大学教授	博士（医学）	大根田 修
副査	筑波大学教授	医学博士	石井 幸雄
副査	筑波大学准教授	医学博士	内田 和彦

## 論文の内容の要旨

中野雅之氏の博士学位論文は、肺腺癌における Cyclophilin A (Cyp A) と Hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) の発現と臨床病理学的因子との関連を通して肺腺癌の成り立ちに迫るものであり、その要旨は以下のとおりである。

### (目的)

肺腺癌は組織学的な多段階進行性を示し、それは WHO 肺腺癌組織分類および小型肺腺癌野口組織分類に反映されている。Cyp A は肺腺癌の前癌病変ですでに発現が亢進していることから、肺腺癌の初期進展に関連する蛋白の1つと考えられている。HIF-1 $\alpha$ は、肺腺癌が組織学的な多段階的進行に伴って低酸素状態を引き起こす組織形態になっていくことから、肺腺癌の進展に関係していると考えられている。そこで著者は、Cyp A と HIF-1 $\alpha$ の蛋白発現と肺腺癌の組織分類および予後との関連を検討した。

### (方法)

著者は、筑波大学附属病院で外科的に切除された、術前治療歴のない単発の原発性肺腺癌症例 198 例 (男性 114 例、女性 84 例)を本研究の対象としている。CypA と HIF-1 $\alpha$ の蛋白発現を確認するために PL-16B (気管支上皮細胞株)、PL-16T (非浸潤性肺腺癌細胞株)、PC-9 (浸潤性肺腺癌細胞株)、A549 (浸潤性肺腺癌細胞株)を用いた。PL16B と PL16T は 2%ウシ胎児血清 (FBS) 添加 MCDB153HAA 培地 (Wako, Osaka, Japan)、PC9 は 10% FBS 添加 RPMI1640 (Life Technologies, CA) 培地、A549 は 10%FBS 添加 DMEM/F12 (Life Technologies) 培地を用い、二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) 濃度 5%、37°C の条件で維持した。

まず著者は、15%中性緩衝ホルマリン固定・パラフィン包埋された標本から厚さ 4 $\mu$ m の連続切片を作り、Hematoxilin-Eosin 染色、Elastica van Gieson 染色を行っている。WHO 分類および野口分類に準拠して各症例を分類し、組織病理学的分類と予後との関連を評価した。病期分類は TNM 分類第 7 版に従った。次に、肺腺癌細胞株を用いて CypA の発現をウサギポリクローナル抗 cyclophilin A 抗体

(ab42408, Abcam, Cambridge, UK) を用いて Western blotting により評価している。さらに外科的切除材料で上記抗 cyclophilin A 抗体を用いて免疫組織化学を行いその染色性を H-score によって評価している。H-score 中央値により CypA 低発現群と CypA 高発現群の 2 群に分類し、臨床病理学的因子との関連を  $\chi^2$  検定で検討した。予後との関連は Kaplan-Meier 法、Log-Rank 検定、Cox 比例ハザードモデルを使って評価した。

次に著者は、塩化コバルト (CoCl<sub>2</sub>) による化学的低酸素状態で培養した A549 細胞株における HIF-1 $\alpha$  の発現をマウスモノクローナル抗 HIF-1 $\alpha$  抗体 (GT-10211, GeneTex, CA) を用いた Western blotting により評価している。さらに外科的切除材料において、上記抗 HIF-1 $\alpha$  抗体を用いた免疫組織化学の染色性を腫瘍辺縁部と腫瘍中心部で評価し、染色パターンから I 型：腫瘍の辺縁部、中心部ともに陰性、II 型：腫瘍の辺縁部が HIF-1 $\alpha$  陽性、中心部は陰性、III 型：腫瘍の辺縁部・中心部ともに HIF-1 $\alpha$  陽性、IV 型：腫瘍の中心部が HIF-1 $\alpha$  陽性、辺縁部は陰性の 4 型に分類している。その上で、CypA と同様に組織分類や予後、および CypA の発現との関連性を検討している。

### (結果)

著者は、まず肺腺癌の組織病理学的分類と予後とに明確な関連があることを確認している。

次に著者は CypA 蛋白発現を調べ、細胞株全てで発現を認めたが PL-16B では弱かったことを明らかにしている。外科手術材料での CypA 免疫組織化学 H-score の中央値 (最大値-最小値) は、上皮内腺癌: 100 (10 - 210) 、微少浸潤性腺癌: 108 (50 - 200) 、置換型腺癌: 135 (30 - 270) 、非置換型腺癌: 165 (0 - 280)、Kruskal-Wallis 検定、df = 3、 $\chi^2 = 28.70$ 、 $P < 0.001$ ) であった。CypA 低発現群と CypA 高発現群の 5 年生存率はそれぞれ 79.5% と 57.2% (Log-Rank 検定、df = 1、 $\chi^2 = 14.54$ 、 $P < 0.001$ ) であった。多変量解析では CypA と予後の有意な関連は認められなかった。

次に著者は、化学的低酸素の条件下で HIF-1 $\alpha$  発現量の上昇を示し、同時に CypA の発現上昇も観察している。HIF-1 $\alpha$  発現パターンは、I 型 119 例 (60.1%)、II 型 12 例 (6.1%)、III 型 34 例 (17.2%)、IV 型 33 例 (16.7%) であった。組織分類に分けて検討すると、上皮内腺癌と微少浸潤性腺癌の多くが I 型 (それぞれ 89% と 86%) で、置換型腺癌では I 型の割合が減る (54%) 分 III 型の割合が増え (26%)、さらに進行した非置換型腺癌では IV 型の割合が増えた (22%)。従って腫瘍内での陽性部位の変化がうかがわれた ( $\chi^2 = 20.45$ 、 $P = 0.015$ )。HIF-1 $\alpha$  の発現自体と予後とは関連がなかった (HIF-1 $\alpha$  陰性 vs. 陽性 : HR 1.09、95% CI 0.70 - 1.69、 $P = 0.70$ )。

### (考察)

著者は、CypA の発現が肺腺癌の組織学的進行に伴って段階的に上昇し予後と関連すること、HIF-1 $\alpha$  の陽性像が浸潤癌で増加することから、今後 CypA ならびに HIF-1 $\alpha$  の肺腺癌での機能解析を行う必要があると結んでいる。

## 審査の結果の要旨

### (批評)

本研究は肺腺癌における CypA の発現と HIF-1 $\alpha$  の発現の大きく 2 つの仕事から成っている。すでに前半の肺腺癌における CypA の発現については英文論文として採択されており、十分な内容を持っている。本研究の特徴は、肺腺癌の組織形態にしっかりと立脚して研究が為されていることである。近年がん組織における不均一性が注目を集めており、がん薬物療法における薬剤耐性の発生にも関係していると推察されているが、病理学的形態学に基づいた研究はほとんど例を見ない。これは高度な還元主義である分子生物学の孕む大きな欠陥であって、それを補完するような研究が強く望まれており、本研究は高く評価し得る。

平成 29 年 12 月 20 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。