

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
稲元 輝生	主査 教授 勝 岡 洋 治 副査 教授 林 秀 行 副査 教授 大 道 正 英 副査 教授 森 浩 志 副査 教授 芝 山 雄 老
<b>主論文題名</b> Anti-CD26 monoclonal antibody-mediated G1/S arrest of human renal clear cell carcinoma Caki-2 is associated with Rb dephosphorylation, CDK2 reduction, p27 <sup>kip1</sup> enhancement, and disruption of binding to the extracellular matrix (細胞表面抗原 CD26 分子に対する特異抗体は、p27 <sup>kip1</sup> の発現上昇と CDK2 及びリン酸化 Rb の発現低下を介して G1/S チェックポイントで癌細胞の細胞周期を停止させると同時に細胞外マトリックスへの結合を阻害する)	
<b>学位論文内容の要旨</b>	
<p>《目的》</p> <p>CD26 分子は分子量 110KDa の細胞表面上に存在する糖蛋白質である。CD26 分子は T 細胞活性化シグナルを伝達することが知られていると同時に、免疫担当細胞以外にも発現し、現在では、この癌細胞表面抗原と細胞の癌化との関わりが示唆されている。腎癌に於いては癌化に伴って CD26 分子が発現上昇する報告が過去になされているものの、その役割はいまだに明らかにされていない。そこで、申請者は、腎癌における CD26 分子の役割、特に CD26 分子に対する特異抗体が有する役割を明らかにし、腎癌に対する CD26 抗体を使用したターゲット療法の可能性を探ることを研究目的とした。</p> <p>《対象および方法》</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>細胞培養・遺伝子導入・使用薬剤; Fugene 6 reagent (Roche) を使用して、ヒト腎癌細胞 Caki-2 に持続活性 Akt ベクター、活性部位欠失 Akt ベクター、或いはコントロールベクターを導入し、また、PI3K/Akt 経路と ras/raf/MEK/ERK 経路に対するインヒビターで前処理した Caki-2 を CD26 特異抗体で処理した。CD26 特異抗体はハイブリドーマテクニックで独自に作製した。</li> <li>フローサイトメーターと細胞周期解析; FACSCalibur (Becton Dickinson) と CellQuest software (Becton Dickinson) を使用して、各種癌化細胞株の細胞表面 CD26 分子の発現を確認した。細胞周期解析は同じくフローサイトメーターでデータを取得後、ModFit program (Becton Dickinson) で解析した。</li> <li>細胞増殖アッセイ; -(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium (Seikagaku) を使用して 96 穴プレート内に置いた、抗体処理後の腎癌細胞の生細胞数を吸光度測定した。</li> <li>SDS-PAGE と immuno-blotting; 処理後の細胞を溶解させ、サンプルバッファーと混和後に電気泳導し、polyvinylidene difluoride 膜に転写し、これを各種シグナル物質に対する抗体で probe し、その後 HRP 標識 2 次抗体でラベル後に感知した。</li> <li>ヒト腎癌マウスモデル; 8 週令 BALB マウスの側腹皮下に Caki-2 細胞を移植したモデルを作製し、</li> </ol>	

抗体を投与後に腫瘍径とマウスの生存期間を解析した。

## 《 結 果 》

### 1. ヒト腎癌における CD26 分子；

申請者は 11 例の腎癌の原発巣標本で免疫組織染色を利用し CD26 分子の発現パターンを解析した。その結果、正常腎組織に比較して、腫瘍組織に於いて CD26 分子は高発現していることが明らかになった。また、一連のヒト腎癌細胞株でも CD26 分子の高発現がみられた。

以前、CD26 分子に対する特異抗体が T 細胞腫瘍に対し増殖抑制効果を有することが報告された。この結果を踏まえて、CD26 抗体の腎癌細胞株に対する効果を調べたところ、フローサイトメーターを使用した細胞周期解析で CD26 抗体は腎癌細胞の細胞周期を G1/S 期で停止させることが認められた。さらに、6 種類の CD26 陽性の腎癌、及び前立腺癌細胞株を使用した細胞増殖試験では CD26 抗体は濃度依存性に癌細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。特筆すべきは、各細胞の CD26 分子の発現量と増殖抑制効果が比例することである。従って、CD26 抗体は CD26 分子特異的に抗腫瘍効果を有することが確認された。

### 2. CD26 分子を介した細胞内でのシグナル伝達；

真核細胞の細胞周期は様々な制御蛋白質によって厳密に制御を受けている。そこで申請者は CD26 抗体の細胞周期停止に対するメカニズムを探る目的で抗体処理を施した細胞のウェスタン・ブロッティングを行った。その結果、細胞周期を負に制御するとされる p27<sup>kip1</sup> の発現上昇と細胞周期を正に制御するとされる CDK2、及びリン酸化 Rb の発現低下が認められた。

p27<sup>kip1</sup> を含めたサイクリン依存性キナーゼ阻害蛋白は蛋白質リン酸化酵素により発現制御を受ける事が知られている。事実、CD26 抗体処理により、ras/raf/MEK/ERK 経路、及び PI3K/Akt 経路の活性化が抑制される現象を認めた。そこで、CD26 抗体が有する細胞周期停止に最も寄与する蛋白リン酸化酵素の同定を行う目的で、腎癌細胞株 Caki-2 を CD26 抗体処理前に、それぞれの経路特異的な阻害剤で前処置するモデル、及び持続活性 Akt 過発現・活性部位欠失 Akt モデルを作製し CD26 抗体の効果を判定した。その結果、PI3K/Akt 経路が ras/raf/MEK/ERK 経路よりも CD26 抗体の作用を伝達する上で重要であることが判明した。

以上の結果から、CD26 分子- PI3K/Akt- p27kip1 経路を介した G1/S 期での細胞周期制御を明らかにすることが出来た。

### 3. CD26 分子を介した細胞外マトリックスへの関係；

CD26 分子は以前の報告で、I 型コラーゲン及びファイブロネクチンの結合分子であるとされている。そこで腎癌細胞株とこれらの細胞外マトリックス蛋白との関係に CD26 抗体が影響を与えるのか否かを検討したところ、CD26 抗体処置された癌細胞は I 型コラーゲン、及びファイブロネクチンへの結合を阻害されることが判明した。

### 4. ヒト腎癌マウス移植モデルでの CD26 抗体の効果；

上記の実験結果から CD26 抗体が抗腫瘍効果を持つと確認できた。そこで、申請者はマウスモデルで CD26 抗体の抗腫瘍効果を確認することとした。その結果、BALB マウスに皮下移植した Caki-2 細胞のモデルで、CD26 抗体投与群が腫瘍塊のサイズ減少とマウスの生存期間延長に寄与することが判明した。

## 《 考察および結論 》

申請者の実験結果から、CD26 分子は腎癌組織に於いて高発現し、CD26 抗体は腎癌細胞に対して特異的に抗腫瘍効果を有する事が明らかとなった。申請者は、CD26 分子を今後の腎癌細胞治療における新たなターゲット分子として、その臨床的有用性を提唱する。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	稲元 輝生
論文審査担当者		主 査 教授 勝 岡 洋 治 副 査 教授 林 秀 行 副 査 教授 大 道 正 英 副 査 教授 森 浩 志 副 査 教授 芝 山 雄 老	
主論文題名			
<p>Anti-CD26 monoclonal antibody-mediated G1/S arrest of human renal clear cell carcinoma Caki-2 is associated with Rb dephosphorylation, CDK2 reduction, p27<sup>kip1</sup> enhancement, and disruption of binding to the extracellular matrix  (細胞表面抗原 CD26 分子に対する特異抗体は、p27<sup>kip1</sup> の発現上昇と CDK2 及びリン酸化 Rb の発現低下を介して G1/S チェックポイントで癌細胞の細胞周期を停止させると同時に細胞外マトリックスへの結合を阻害する)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>近年、CD26 分子の過剰発現は様々な悪性腫瘍の発生・増殖に影響を及ぼすことが知られてきているが、その発現のメカニズムに関しては未だ完全には解明されていない。申請者は、ヒト腎癌組織における CD26 分子の蛋白レベルでの発現状況を調べ、また、CD26 分子に対する特異抗体を独自に作製して、以下の結果および結論を得ている。</p> <p>申請者は免疫組織学的染色によって腎癌組織に於いて CD26 分子は正常組織に比較し発現レベルが上昇していることを観察した。また、一連のヒト腎癌細胞株は全て、CD26 分子を高発現する事をフローサイトメーターにて確認しており、これらの CD26 分子陽性腎癌細胞株は、特異抗体処理により、主として、PI3K/Akt pathway の活性化を損なうことにより、p27<sup>kip1</sup> の発現上昇に繋がり、やがては G1/S チェックポイントでの細胞周期停止を来すことを示した。</p> <p>本研究は、ヒト腎癌における CD26 発現状況を明らかにし、また CD26 に対する特異抗体が惹起する作用の機作を明らかにした上で、その抗腫瘍効果に対する検討を行った最初のものであり、また申請者によって得られたこれらの研究結果は腎癌治療戦略に於いて新たな局面を提供するものと考えられる。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第 9 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌)  Clinical Cancer Research 12 (11): 3470-3477, 2006</p>			