

論文内容の要旨

原口 渉

主 論 文

Adenine-and-Uridine-rich element RNA-Binding factor 1 (AUF1) as an additional marker in human glioma

ヒト神経膠腫のバイオマーカーとしての AUF1 の研究

原口 渉、松尾 孝之、吉田 光一、永田 泉

Acta Medica Nagasakiensia に掲載予定です。

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻

(主任指導教員：永田 泉 教授)

【緒言】

神経膠腫は原発性脳腫瘍の約 30%を占め、増殖能や浸潤能が高いために、手術摘出・放射線照射・化学療法などを組み合わせた集学的治療を行っても生命予後不良である。神経膠腫のバイオマーカーを検討することで、早期の診断や再発の予測の他にも、テーラーメイド治療を行うことで予後改善につながる可能性がある。

AUF1 は、アデニンとウリジンの豊富な領域(ARE)に結合するたんぱくの一つであり、mRNA の安定性を調整することでたんぱく生成や細胞の増殖、サイトカインの放出、細胞周期の調整などに影響している。AUF1 は細胞内で核と細胞質の間を相互に移動し、目的の mRNA の翻訳の場面でそれに結合して、mRNA 安定化または不安定化に働く。他のがん領域においては、AUF1 が腫瘍の悪性度や増殖性に関係するのではないかとする報告がいくつかある。

現在、神経膠腫での AUF1 の発現に関する報告はなく、神経膠腫における AUF1 の働きも解明されていない。我々は、神経膠腫摘出標本を抗 AUF1 抗体を用いて免疫染色を行うことで、神経膠腫における AUF1 発現と働きについて研究した。

【対象と方法】

対象

長崎大学病院で摘出手術を行い、病理検査で神経膠腫の診断が得られた 71 例を対象とした。患者の平均年齢は 55.05±21.36 歳。神経膠腫は WHO の病理組織診断に基づき、low grade (WHO grade:I/II)、high grade (WHO grade:III/IV)に分けた。low grade は 18 例、high grade は 53 例であった。Karnophsky Performance Status (KPS)によって、minor disability (KPS:80-100)、moderate disability (KPS:60-70)、severe disability (KPS:10-50)に分類した。対象症例に対してはカルテ記載をもとに retrospective に研究を行った。

免疫組織化学

免疫染色で、AUF1、Bcl2、Ki-67 の発現について調べた。腫瘍組織ブロックは、4μm にスライスし固定した。キシレンで脱パラフィンした。一次抗体は AUF1 (07-260; Upstate)、bcl-2 (M0887; DAKO)、Ki-67 (M7240; DAKO)を使用して 60 分間反応させた。PBS で洗浄後に

ビオチン付加の二次抗体(multi-link swine anti-goat/ mouse rabbit immunoglobulin; Dako)にて 30 分間反応、洗浄の後、アビディン/ビオチン複合体(1:1000; Vector Laboratories)は、室温で 30 分から 60 分反応させた。洗浄後に oxidation of 3,3'-diaminobenzidine (DAB)で 20 秒反応させ、その後、ヘマトキシリンで染色した。

免疫染色強度の評価は 2 人の観察者で行った。AUF1 および bcl-2 は核に brown granules が見られたものを陽性とした。プレパラートの中で 2 つの代表的な部位からの 200 個の細胞を観察、染色度は 0;免疫染色されていないもの、1;弱い免疫染色、2;中等度の免疫染色、3;強い免疫染色の 4 ポイントに分類した。陽性細胞数は、1;<25%の陽性細胞、2; 26-50%の陽性細胞、3; 51-75%の陽性細胞、4; >75%の陽性細胞の 4 ポイントに分類した。2 つのポイントの合計をスコアとして評価した。1 から 4 ポイントを low score 群、5 から 7 ポイントを high score 群とした。Ki-67 の発現は全体の細胞における陽性細胞の割合で評価した。

【結果】

神経膠腫に対して AUF1 を 1 次抗体に用いて免疫染色を行ったところ、核と細胞質に発現を認めるものがあつた。中でも核における発現は、症例間で発現強度と発現細胞の割合に差がみられた。

AUF1 のスコアは 2 ポイントのものが 9 例(12.7%)、3 ポイントのものが 18 例(25.4%)、4 ポイントのものが 14 例(19.7%)、5 ポイントのものが 9 例(12.7%)、6 ポイントのものが 9 例(12.7%)、7 ポイントのものが 12 例(16.9%)であつた。

AUF1 の発現と Ki-67 の発現および WHO のグレードとの間に相関性が見られた($P=0.0309$ および 0.001 : X2 検定)。AUF1 と性別、年齢、KPS、腫瘍の大きさ、bcl-2 の発現との間に相関はみられなかつた。

予後の分析で AUF1 のスコアの違いによる生存率には log-rank 検定で有意差が得られなかつたが、AUF1 スコアの高い症例の方がより生存期間が長い傾向にあるようであつた。

【考察】

今回我々は、神経膠腫において AUF1 の発現が免疫染色で確認できることをはじめて示した。さらに、low grade の神経膠腫と、MIB1 発現の低い神経膠腫において、その核に AUF1 が高発現することを示した。神経膠腫手術摘出標本に AUF1 が高発現していれば良好な予後と相関する傾向はみられたが統計的な有意差は得られなかつた。

AUF1 は mRNA 結合蛋白質で、目標 mRNA 安定性または不安定性に影響する。一般に、mRNA 結合蛋白質は、細胞の分化や存続、老化およびストレス反応、および免疫シグナルにかかわる mRNA の制御を行う。この中でも AUF1 は細胞周期進行(p21、c-Myc)、アポトーシス(Bcl-2)およびストレス応答(Gadd45 α 、ATF3)のプロセスに係わる蛋白質をコードする mRNA を目標とする。乳腺、皮膚、甲状腺、肝の癌において AUF1 過剰発現との関連の報告がある。

我々の結果は、AUF1 発現と Ki-67 発現、および AUF1 発現および WHO grading との関連を示したが、神経膠腫患者の AUF1 発現と生存率の間に統計的有意差はなく、AUF1 発現は神経膠腫の患者の予後因子とは言えなかつた。他の論文では、AUF1 過剰発現と腫瘍形成との関連が示されたものや、AUF1 がアポトーシス、腫瘍形成や発育に関係すると示しているものも認めた Trojamowicz らは、AUF1 と ARE 関係 mRNA との複合体が甲状腺癌の増殖および細胞周期には重大であるとした。

今回のわれわれの研究は、神経膠腫の腫瘍形成における AUF1 の役割を明確に説明することはできないが、AUF1 が神経膠腫の WHO grading のための補足マーカーとなる可能性を示唆することができた。

我々の研究の問題点は免疫染色を用いたために、結果の定量化ができなかつた事と、染色度の評価に主観が入る可能性がある事、症例数が少なかつた事である。今後、神経膠腫における AUF1 の発現と働きについてさらに調べていくことで、神経膠腫における AUF1 のバイオマーカーとしての有用性を明らかにできる可能性があると考えた。