

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09173

研究課題名(和文) 胸腺癌特異マーカーPRAMEの生物学的意義の解明と新規治療戦略への展開

研究課題名(英文) Preferentially Expressed Antigen in Melanoma in thymic carcinoma: investigation of biological significance and application for novel therapy

研究代表者

谷口 洋平 (TANIGUCHI, Yohei)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：50609592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、胸腺癌特異的マーカーPRAMEの細胞内局在・挙動の同定、発現制御メカニズムの解明、生物学的意義の解明である。

PRAMEの細胞内局在を同定すべくJCRB細胞バンクから入手したTy-82を用いた免疫蛍光染色ではPRAMEは細胞質内または核内に局在すると推測された。

PRAME関連遺伝子の同定を目的にnCounter analysis systemを用いた遺伝子発現プロファイルの網羅的解析では、PRAMEと関連のある候補遺伝子としてCXCL13, CCND3, NEFL等が抽出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちの研究で、PRAMEを細胞膜に証明することはできなかったが、細胞質または核内に存在する可能性が示唆された。このことから、PRAMEを標的とする治療法の構築は困難かもしれないが、がん細胞が破壊された際にPRAMEが放出される可能性はあり、血中マーカーなどの実用化が、PRAME陽性がん(胸腺癌、肺癌、メラノーマなど)の治療効果や存在診断に役立つ可能性はあると思われた。

RNAの網羅的解析により、いくつかの発現調整に関わる候補遺伝子が挙げられた。これらの結果は、未だ明らかになっていない、PRAMEの発現調整機序を解明するうえで重要な所見と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Our aim was to identify intracellular localization of PRAME, mechanisms regulating PRAME expression, and biological significance of PRAME.

Our study using immunofluorescence staining on Ty-82 cells indicated that PRAME might be in the cytoplasm or in the nucleus, as we could not detect PRAME in the cell membrane.

Further, our study using nCounter analysis system showed distinct expression patterns of 222 and 85 genes between thymic cancer and thymoma without myasthenia and between thymic cancer and thymoma with myasthenia, respectively. These results also indicated that several genes such as CXCL13, CCND3 and NEFL might be associated with PRAME expression.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：PRAME 胸腺癌

1. 研究開始当初の背景

胸腺癌 thymic carcinoma は、稀だが悪性度の高い胸腺上皮由来の悪性腫瘍である。長期生存には外科的完全切除が必要だが、心臓・大血管浸潤やリンパ節・遠隔臓器転移のため切除不能となりやすい。切除不能症例に対する標準治療は確立されておらず、現在推奨されている薬物を用いても奏効率は低く(約 20-36%)、5 年生存率は約 20%と予後不良である。胸腺癌の治療成績向上のため、新たな治療標的の特定と治療戦略の構築が望まれる[1]。

報告者らは、mRNA の網羅的解析および免疫組織化学染色により、胸腺癌特異マーカーとして PRAME (Preferentially expressed Antigen in Melanoma)を特定し報告した[2]。PRAME は約 58kDa のタンパクで、精巢を除き正常組織では発現していない。一方、メラノーマや肺癌などの固形癌、慢性骨髄性白血病などの血液腫瘍では発現が亢進し癌精巢抗原として知られる。また PRAME はレチノイン酸受容体を介したシグナル伝達を阻害し、分化抑制、アポトーシス抑制、細胞増殖亢進を導くとされるが[3]、発現制御メカニズムや細胞内局在・挙動については不明な点が多い。興味深い事に、報告者らの先行研究では胸腺上皮由来低悪性度腫瘍である胸腺腫では PRAME 陰性であり、胸腺癌における PRAME 発現は組織学的悪性度と関連する可能性が示唆された。報告者は、胸腺癌における PRAME の発現制御メカニズム、細胞内局在・挙動、生物学的意義を解明する事を目的に、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、胸腺癌における PRAME の細胞内局在・挙動の同定、発現制御メカニズムの解明、生物学的意義の解明である。本研究の成果により胸腺癌の分子病態が明らかとなれば、新しい診断技術の確立・治療標的の特定・治療戦略の構築につながると期待される。

本研究は「PRAME は胸腺癌特異マーカーである」という報告者らが独自で得た知見を、更に追究するものである。既存の胸腺癌特異マーカーとしては KIT が確認されており、治療標的として注目されたが、その抗体医薬 imatinib は臨床的効果を示さなかった 4。PRAME は新たな治療標的としての可能性だけでなく、従来治療への抵抗性に関与する因子である可能性もある。加えて、従来の研究では、PRAME は細胞質・核内・細胞膜に発現するとされているが、癌腫ごとの PRAME の細胞内局在や挙動については完全には明らかにされていない。本研究の成果は、胸腺癌の分子病態の解明につながり、新規診断・治療戦略構築の基盤となると考える。また、本研究の成果は他の PRAME 陽性悪性腫瘍に関する細胞生物学的知見の発展、診断・治療の改善に貢献できると考える。

3. 研究の方法

1) 胸腺癌細胞株における PRAME の細胞内局在の同定

患者由来胸腺癌細胞株、および JCRB 細胞バンクから入手可能な胸腺癌細胞株(Ty-82, JCRB1330)に対し、蛍光免疫染色を行う。抗体には Human Protein Atlas で染色性が確認されている抗 PRAME ウサギポリクローナル抗体 (HPA045153)を用いる。免疫蛍光染色は膜透過処理なし・ありの 2 通りで行い、細胞膜・細胞内・核内のいずれに局在するかを同定した。

2) 胸腺癌切除検体を用いた PRAME 関連 mRNA 候補の特定

関西医科大学附属病院の胸腺癌切除検体(パラフィン包埋切片)から total RNA を抽出し、mRNA の網羅的解析を、Nanostring 社の nCounter Analysis System を用いて行った。なお当初は microRNA を対象としていたが、PRAME の促進・阻害因子の特定とともに、生物学的意義を特定するため、より幅広い target genes を解析できるよう、mRNA を対象とすることに変更した。実験には、nCounter Cancer Immune Profiling Panel に加え、nCounter Cancer Progression Panel を用いた。対照として胸腺腫、および胸腺嚢胞を用いた。胸腺癌で発現が亢進または抑制されている mircoRNA を ” PRAME 関連 mRNA 候補 ” として特定した。

3) 血中 PRAME 測定系の確立のための、PRAME 陽性腫瘍細胞株の樹立

関西医科大学附属病院において切除した患者由来胸腺癌細胞または PRAME 陽性肺がん細胞の培養を試みた。

4. 研究成果

1) 胸腺癌細胞株における PRAME の細胞内局在

Ty-82 を用いた実験では、細胞膜における PRAME 発現は確認できず、胸腺癌における PRAME は細胞質内または核内に局在する可能性が示唆された。また、3) にも関与するが、患者由来の胸腺癌 (PRAME 陽性) は細胞株の樹立に至らず、これ以降の研究に使用することはできなかった。

2) PRAME 関連 mRNA 候補

胸腺癌と重症筋無力症非合併胸腺腫との比較では 222 遺伝子が、胸腺癌と重症筋無力症合併胸腺腫との比較では 85 遺伝子が有意差を示した。このうち PRAME と関連のある候補遺伝子として CXCL13, CCND3, NEFL 等が抽出された。

3) PRAME 陽性腫瘍細胞株の樹立

上記 1) にも記載の通り、胸腺癌や PRAME 陽性肺がんの細胞株樹立はできなかった。

< 引用文献 >

1. National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology. Thymomas and Thymic Carcinomas. Version 2.2019.
2. Taniguchi Y, Ishida M, Saito T, et al., Cancer/Testis Antigen PRAME is a Useful Diagnostic Marker and Potential Target for Antigen-Specific Immunotherapy for Thymic Squamous Cell Carcinoma. The 10th International Thymic Malignancy Interest Group Annual Meeting (ITMIG2019).
3. Hermes N et al., Preferentially Expressed Antigen in Melanoma (PRAME) and the PRAME Family of Leucine-Rich Repeat Proteins. Curr Cancer Drug Targets.2016; 16(3):400-414.
4. Ikeda H et al, Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. Immunity. 1997 Feb;6(2):199-208.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	蔦 幸治 (TSUTA Koji) (00392332)	関西医科大学・医学部・教授 (34417)	
研究分担者	石田 光明 (ISHIDA Mitsuaki) (00464173)	大阪医科薬科大学・医学部・講師 (34401)	
研究分担者	林 美樹夫 (HAYASHI Mikio) (10368251)	関西医科大学・医学部・講師 (34417)	
研究分担者	齊藤 朋人 (SAITO Tomohito) (10548605)	関西医科大学・医学部・講師 (34417)	
研究分担者	赤間 智也 (AKAMA Tomoya) (10548788)	関西医科大学・医学部・准教授 (34417)	
研究分担者	村川 知弘 (MURAKAWA Tomohiro) (50359626)	関西医科大学・医学部・教授 (34417)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------