

# The loss of retinoic acid receptor $\beta$ expression in nonsmall cell lung cancer : possible involvement of cigarette smoke

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 乾, 直輝 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1190">http://hdl.handle.net/10271/1190</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 337号	学位授与年月日	平成13年 3月27日
氏 名	乾 直 輝		
論文題目	<p>The loss of retinoic acid receptor <math>\beta</math> expression in non-small cell lung cancer: possible involvement of cigarette smoke (非小細胞肺癌におけるレチノイン酸レセプター<math>\beta</math>の発現低下: 喫煙の関与について)</p>		

博士(医学) 乾 直輝

### 論文題目

The loss of retinoic acid receptor  $\beta$  expression in non-small cell lung cancer: possible involvement of cigarette smoke

(非小細胞肺癌におけるレチノイン酸レセプター  $\beta$  の発現低下：喫煙の関与について)

### 論文の内容の要旨

#### [はじめに]

レチノイドは上皮細胞の分化増殖を制御し、その欠乏は気道上皮の過形成や扁平上皮化生を生じることが知られている。統計学的な検討でレチノイドの摂取不足が発癌頻度を高め、レチノイド投与が扁平上皮化生や発癌を抑制することが示され、レチノイドと癌との関係が注目されている。レチノイドは主として核内受容体のレチノイン酸レセプター(RAR)を介して転写を制御する。そのサブタイプの一つRAR  $\beta$  の発現が肺癌細胞株や頭頸部癌、乳癌など多様な癌において低下していること、あるいは肺癌で欠損が多い染色体3番短腕の近傍にRAR  $\beta$  遺伝子が存在することが報告されている。肺癌と核内受容体ならびにレチノイドシグナル伝達の異常との関連を解明することを目的とし、ヒトの正常肺および癌組織におけるRAR、レチノイドXレセプター(RXR)、甲状腺ホルモンレセプター(TR)及びレチノイド合成の律速酵素でありRARの標的遺伝子でもあるアルコール脱水素酵素3(ADH3)の発現量と局在を検討した。また、RARの発現に及ぼす発癌因子の影響を肺癌細胞株(A549)で検討した。

#### [材料ならびに方法]

化学療法や放射線療法などの前治療のない肺癌患者(扁平上皮癌5名、腺癌4名)を対象とした。摘出凍結組織からRNAを抽出し、RT-PCR法でRAR( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )、RXR( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )、TR( $\alpha$ 、 $\beta$ )及びADH3の発現を検討した。RT-PCRのシグナルはデンシティグラフを用いて測定した。in situハイブリダイゼーション(ISH)は4%パラホルムアルデヒドで固定した凍結組織を用い、ジゴキシゲニンで標識したRAR  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ に対するRNAプローブで検討した。免疫染色は抗RAR  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ポリクローナル抗体を一次抗体とし、アビシン-ビオチン法にて施行した。また、A549細胞にタバコ抽出液、ベンゾ(a)ピレン、N-ニトロソメチル尿素を添加し48時間培養後、細胞を回収しRARの発現の変化をRT-PCR法で検討した。

#### [結果]

RT-PCR法にて正常肺組織にRAR  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、RXR  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、TR  $\alpha$ 、 $\beta$ 、ADH3が発現していることを確認した。肺組織におけるRAR  $\alpha$ 、 $\beta$ -mRNAの発現量は、非癌患者に比べ肺癌患者では約60%低下していた。ついで肺癌患者から得た同一個体の癌組織と非癌部正常組織を比較した。RAR  $\alpha$ 、RAR  $\beta$ 、ADH3-mRNAはそれぞれ癌部で55%、62%、55%低下していた( $p<0.01$ )。一方、他の核内受容体の発現には差を認めなかった。癌組織におけるRAR  $\alpha$ 、 $\beta$ の発現の低下はISHでも確認された。免疫組織染色ではRARの発現が肺胞上皮に限局していること、癌組織でRAR  $\alpha$ 、 $\beta$ の発現が著しく低下していることを認めた。またタバコ抽出液の添加によりA549細胞のRAR  $\beta$ -mRNAの発現は有意に低下した( $p<0.05$ )。

## 〔考察および結論〕

正常肺および癌組織でRT-PCR、ISH、免疫染色法を用いてRAR、RXR、TR、ADH3の発現を遺伝子及び蛋白レベルで検討した。癌組織においてRAR $\alpha$ 、 $\beta$ 、ADH3の発現が非癌部に比べ有意に低下していた。RARの低下はADH3の抑制に働く。一方、ADH3の発現自体はリガンドであるレチノイドの代謝を通じてRARの発現に働くことから、肺癌組織におけるレチノイドのシグナル伝達の障害が示唆された。肺胞上皮由来のA549細胞を用いて発癌因子の添加を行ったところ、タバコ抽出液を添加した場合にRAR $\beta$ の発現低下が観察された。タバコ刺激によってRAR $\beta$ の発現が低下し、これによりレチノイドの上皮細胞の分化増殖を制御する作用が障害され、結果として癌化につながる可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

レチノイドは細胞の分化と深く関与する事が知られている。その作用は主として核内のレチノイン酸受容体(RAR)を介して伝達される。RARには $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ のサブタイプがあり、レチノイドX受容体(RXR)とヘテロダイマーを形成して標的遺伝子上のレチノイン酸応答配列(RARE)に結合する。RARはレチノイン酸(RA)の結合に依存した転写因子として標的遺伝子の発現を制御する。主な標的遺伝子はRAR自身やアルコール脱水素酵素(ADH3)などが知られている。レチノイドの欠乏は気道上皮の過形成や扁平上皮化生を生じる。またRAR $\beta$ の発現が肺癌細胞や頭頸部癌、乳癌等で低下していることが報告されている。これまでの報告は免疫組織学的手法によるため感度が低く、定性的であった。またRXR、甲状腺ホルモン核レセプター(TR)等他の核内受容体の発現との関連も未知であった。申請者はまず、定量的RT-PCRの条件を確立し、肺癌患者(扁平上皮癌5、腺癌4)を対象としてその癌部と正常部におけるRARサブタイプ、RXRサブタイプ、TRおよびRARの標的遺伝子ADH3の発現量を調べた。さらにin situハイブリダイゼーション(ISH)や免疫組織学的染色による検討も加え評価した。一方で、肺における発癌のリスクファクターである喫煙との関係にアプローチするため、培養細胞を用いてRARの発現に対するたばこの影響を検討した。本研究により得られた結果は以下の通りである。

- 1) RT-PCR法を用いたRAR $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、RXR $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、TR $\alpha$ 、 $\beta$ およびADH3の発現の半定量の条件を確立した。(対照 $\beta$ -actin)
- 2) このRT-PCR法を用いた評価により、正常肺組織においてRAR $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、RXR $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、TR $\alpha$ 、 $\beta$ 、およびADH3が発現していることが確認された。
- 3) 癌部においては正常部に比べてRAR $\alpha$ 、 $\beta$ およびADH3の発現がそれぞれ55%、62%、55%低下していた。
- 4) 非癌患者対癌患者での比較においてはRAR $\alpha$ 、 $\beta$ が肺癌患者で約60%低下していた。
- 5) RAR $\gamma$ 、RXR $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、TR $\alpha$ 、 $\beta$ の発現は正常部と癌部で差が見られなかった。
- 6) ISHおよび免疫組織染色でもRAR $\alpha$ 、 $\beta$ の発現が癌組織で著明に低下していた。
- 7) A549細胞に対してベンゾピレン、N-ニトロソメチル尿素(NMU)、たばこ抽出液を生細胞数に影響の無い濃度で処理すると、たばこ抽出液でのみRAR $\beta$ の発現が有意に低下する事を見い出した。

以上の様に申請者は肺癌における核内受容体の発現を定量的に解析し、RAR $\alpha$ 、 $\beta$ およびその標的遺伝子ADH3の発現が癌部において低下していることを実証した。また作用機序は未知で今後の展開が待た

れるが、たばこ成分によりRAR $\beta$ の発現が低下することを見出し、喫煙と肺発癌の関係に一石を投じた。審査委員会ではこれらの知見を評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑応答を行った。

- 1) RT-PCR、ISH、免疫組織染色の定量性および結果の相関性について
- 2) たばこ抽出液の成分および濃度について
- 3) たばこ抽出液の増殖、分化等への影響、薬理作用について
- 4) 喫煙習慣とRARの関連について
- 5) RARの低下は癌化の原因か結果か
- 6) 癌の分化度あるいは予後等とRARの低下度の相関について
- 7) RT-PCR、ISH、免疫組織染色のコントロールの妥当性について
- 8) レポーター・アッセイ等でたばこ抽出液の効果を検討したか
- 9) A549細胞を用いた理由について
- 10) 肺小細胞癌でのRARの発現について
- 11) RAR、RXRサブタイプの発現組織について

これらの質問に対し申請者の解答はほぼ適切であり、問題点も十分理解している。よって博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者　主査　北川雅敏  
　　　　　　　副査　数井暉久　副査　馬場聰