

---

## 原 著

---

### 肺癌患者血清中における癌抑制遺伝子産物 pRB に対する抗体の検出

山本唯子<sup>1,3</sup>, 清水英治<sup>2</sup>, 横田雅之<sup>1</sup>, 曾根三郎<sup>3</sup>

<sup>1</sup>徳島大学薬学部臨床薬理学講座

<sup>2</sup>鳥取大学医学部第三内科学教室

<sup>3</sup>徳島大学医学部内科学第三講座

(平成12年1月20日受付)

最近、様々なタイプの癌患者で癌遺伝子や癌抑制遺伝子が産生する物質に対する血清中の抗体が研究されている。多く研究がなされている癌抑制遺伝子産物 p53 に対する抗体は、いくつかの癌種で早期診断などに有用であると報告されている。今回、我々は癌抑制遺伝子のひとつである retinoblastoma gene の産物 RB タンパク質 (pRB) に対する抗体を肺癌患者血清中から検出し、臨床的因子との相関を検討した。

我が国の肺癌罹患率、死亡率は共に急増して1993年には男性での肺癌死亡数は胃癌死亡数を抜いて第1位を占めるに至っている。肺癌に対する治療は進歩しているものの、その治療成績の向上は遅々たるものがある。肺癌対策は一次予防の禁煙教育と二次予防の肺癌検診による早期発見である<sup>1)</sup>。実際は X 線写真などで発見された肺癌はかなり進行している場合が多く、癌種によっては完治することが少ないものもある。

肺癌は組織型の違いで大きく分けて小細胞肺癌と非小細胞肺癌の2種類がある。小細胞肺癌 (SCLC; small cell lung cancer) は肺癌の15~20%を占めているが、進行が速く、早期より転移を有することが多いため、切除あるいは胸部照射のような局所療法のみでは予後の改善は得られないことが認められている。その後、SCLC は薬剤に対して高い感受性を有することが示唆され、現在治療の主体は化学療法と考えられているが、治療成績の改善は遅々として進んでいない<sup>2)</sup>。また、腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌は、まとめて非小細胞肺癌 (NSCLC; non-small cell lung cancer) として取り扱われている。日本人の NSCLC は、全原発性肺癌の約85%を占めている。一般的には臨床病期 I, II 期と一部の III A 期に対しては外科的切除術で切除可能である。しかし、大多数

の非小細胞肺癌は、不幸にも臨床的に切除不能の進行癌として発見される。このような進行癌に対しては、外科切除や放射線治療といった局所療法では不十分であり、効果的な全身化学療法を行う必要がある。しかしながら、NSCLC は化学療法に対してその感受性が低いという大きな問題点がある<sup>3)</sup>。肺癌の外来初診時に検査が可能なものは、胸部単純 X 線写真、胸部 CT スキャン、気管支鏡検査、血液検査などがある。血液検査における肺癌の腫瘍マーカーとしては CEA (全ての組織型)、NSE、proGRP (小細胞癌が疑われる場合)、SLX (腺癌が疑われる場合)、SCC、Cyfra21 1 (扁平上皮癌が疑われる場合) などがあり、疑われる組織型に応じて採血する<sup>4)</sup>。

RB 遺伝子は最初、小児の眼の癌である網膜芽細胞腫 (retinoblastoma) の原因となる遺伝子として発見されたので、この名がある。網膜芽細胞腫では、ヒトの第13染色体上の q14 辺りが短くなっていることが多く、この部分に存在するある遺伝子が失活すると癌になりやすくなるのではないかと推測されていた。1986年に Dryja と Weinberg のグループが共同研究で初めてクローニングに成功し<sup>5)</sup>、その後、急速な展開をみせた。

ゲノム遺伝子は27個のエクソンからなり、約200kbの大きな領域に広がって存在する。ヒト pRB は928個のアミノ酸からなり、分子量は約110kD である<sup>6)</sup>。pRB が DNA 腫瘍ウイルスの癌抑制遺伝子産物、すなわちアデノウイルス E1A、ヒト・パピローマウイルス E7 や SV40 large T と結合して失活させられることはよく知られているが、その際、これらのタンパク質との結合に使われる領域は、ポケット A、B と呼ばれる2つの部分であるといわれてきた<sup>7)</sup>。pRB リン酸化部位は13~14カ所以上存在すると思われるが (図1)、これにはサイクリン D、E、A などをもつ数種類のキナーゼが関与すると考えら

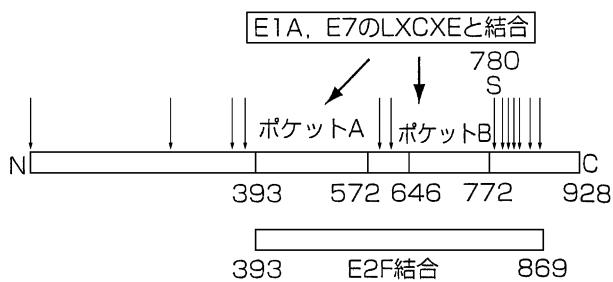


図1 RBタンパク質の構造  
矢印は推定リン酸化部位

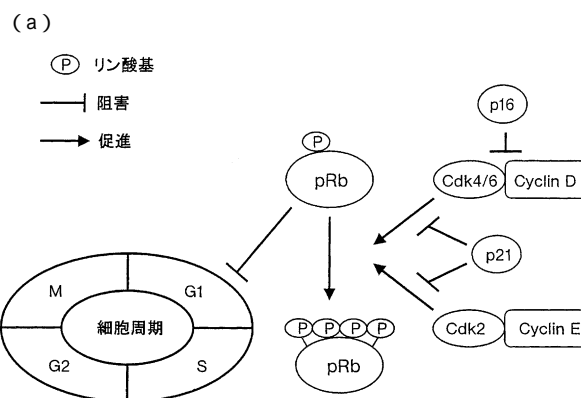
れている<sup>8)</sup>。

pRBは半減期が6時間以上の安定なタンパク質で、細胞内の量も多く、ほとんどの組織で発現している。pRBによる増殖抑制能は、主に転写因子E2Fと結合してその活性を抑えることによって発揮されると考えられる。その結合は、pRBとE2Fのリン酸化で調節されている。

また、一般的にpRBとCdkインヒビターであるp16が密接に関係していることが知られている。p16<sup>INK4a</sup>遺伝子を正常なpRBを発現している細胞に導入するとpRBのリン酸化が抑制され、細胞周期がG1期で停止するが、pRBの機能が失活している細胞に導入しても細胞増殖を抑制することはできない。このことから、p16<sup>INK4a</sup>はpRBを介して細胞周期を制御しているタンパク質であると考えられている<sup>9)</sup>(図2)。

網膜芽細胞腫の他に、肺小細胞癌、乳癌、膀胱癌などの癌でpRBの失活がみられ、これはたいていポケットAかBで起きる(図1)<sup>10)</sup>。pRBの失活だけなら癌全体の約20%であり、p53の失活(50%)よりも低いが、pRB失活のない癌のかなり多くでp16の失活がみられる。また、p16もpRBも失活していないものでは、サイクリンD1かCdk4の過剰発現などの変異がある場合が多い。したがって、p16サイクリンD1Cdk4pRB(図2)に至る経路のどれかが失活している割合は癌全体の約80%にも達する<sup>11)</sup>。

最近、p16とpRBの発現とサイズの小さい初期の非小細胞肺癌の予後をKawabuchiらが臨床的に検討した報告がなされた。RB、p53、サイクリンD1のタンパク質発現とは相関を示さなかったが、不活化状態のp16と初期の非小細胞肺癌の予後不良に相関があり、RB-/p16-



(b)

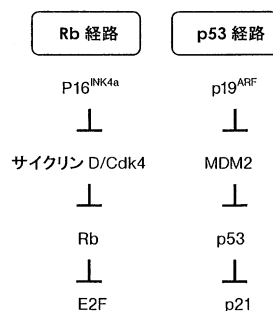


図2 RBタンパク質による細胞周期の制御(a)とRB経路およびp53経路(b)

は最も不良であったと報告している<sup>12)</sup>。また、Homuraらによるコホート調査では、pRBやp16のタンパク質発現と非小細胞肺癌患者の5年生存率には有意な差はないと報告されている<sup>13)</sup>。

最近、新しい癌の診断方法として、肺癌を含む数種の癌患者で癌遺伝子や癌抑制遺伝子の血清中の微量遺伝子断片による loss of heterozygosity (LOH) の検出<sup>14,15)</sup>、p16癌抑制遺伝子プロモーター領域のメチル化<sup>16)</sup>などが検討されている。また、癌遺伝子産物や癌抑制遺伝子産物に対する癌患者血清中の自己抗体が研究されている。主に研究されている癌抑制遺伝子産物p53に対する抗体は早期診断のマーカーとなり、癌診断や経過をモニタリングする際の指標となりうるとの報告もある<sup>17-21)</sup>。しかし、ほとんどの報告はここ数年でなされたものであり、癌の種類や対象となる遺伝子が限られているため、今後さらなる検討が望まれている。血清や血漿などの体液を使用する研究が盛んに行われている理由としては、血液中の腫瘍マーカーによる癌診断の利点と同じように、被験者に対して心身の負担および経済的負担が少ないことがあげられる。

本学医学部第三内科では、以前から、大腸菌内で目的

のタンパク質を glutathione-S-transferase (GST) 遺伝子融合系にて発現させ、この組み換えタンパク質を患者血清と反応させる Immunoblotting により、肺癌患者血清中の癌遺伝子産物および癌抑制遺伝子産物に対する自己抗体を検出してきた<sup>22-24</sup>)。今までの報告では、ほぼ同一の肺癌患者血清を用いて、癌遺伝子産物に対する抗体の抗 L-Myc 抗体 (10%)、抗 c-Myc 抗体 (13%)、また、癌抑制遺伝子産物に対する抗体の抗 p16 抗体 (15%) を検討してきた。これらは健常人からは検出されなかったが、いずれも陽性率が低く、肺癌の診断や臨床的因子との相関性は得られなかった。しかし、患者血清中の複数の自己抗体を調べることで、現在使用されている腫瘍マーカーのように、肺癌の補助的診断、もしくは病状経過のモニタリングの指標として利用できるのではないかと考えられた。

そこで、今回は、肺癌患者血清中の癌抑制遺伝子産物である pRB に対する抗体を検出し、年齢、性別、組織型など臨床的因子との関連性の検討を行った。また pRB は p16 と関連性が深いため、抗 pRB 抗体は検討済みの抗 p16 抗体との関連性があるのではないかと推測された。そこで、抗 pRB 抗体、抗 p16 抗体の陽性率と肺癌患者の臨床的因子の関連性などを中心に検討を行い、臨床的有用性および自己抗体産生に対するメカニズム等を考察した。

## 材料・試薬および実験方法

### 患者と血清

肺癌患者血清は国立療養所刀根山病院、高知赤十字病院、徳島県立中央病院および徳島大学医学部附属病院の入院患者92人から採取した。健常人血清は徳島大学在籍のボランティア30人から採取した。また、SLE 患者血清は徳島大学医学部附属病院の入院患者12人から採取した。小細胞肺癌患者26人、非小細胞肺癌患者66人を評価した。事前に化学療法または放射線療法を施した患者は71人、施していない患者は21人であった。

### GST 融合 RB タンパク質の発現と精製

#### GST 融合タンパク質調製用プラスミドの選択

pGEX 3 X, pGEX X 5 3 (wt.RB fusion plasmid), pGEX F 4 1 (mt.RB fusion plasmid) の3種の各プラスミドが組み込まれている大腸菌 (HB101) を LB BROTH BASE TABLETS (SIGMA, Saint Louis, USA)

に ampicillin (50 $\mu$ g/mL) を添加した培地にて37 $^{\circ}$ C で一晚振蕩培養した。以下、記す LB 培地には同様に ampicillin (50 $\mu$ g/mL) が添加されている。

一晚培養したプラスミド含有大腸菌を 1 : 10 になるように LB 培地にて希釈し、さらに37 $^{\circ}$ C で90分振蕩培養した。その後 isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を最終濃度が0.2mM になるように添加し、さらに4時間振蕩培養した。培養した大腸菌を3,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10分間遠心し、上清をデカンテーションにて除去後、沈殿に4 $^{\circ}$ C に冷却した NETN buffer (20mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% Nonidet P 40) を加え、ピペティングにて懸濁した。大腸菌をエッペンドルフチューブに移した後、30秒間超音波処理し、14,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5分間遠心した後、上清のみ採取し -30 $^{\circ}$ C にて保存した。

### GST 融合タンパク質の精製

-30 $^{\circ}$ C で凍結保存した GST 融合タンパク質を融解し、ブロッキング処理を施した Glutathione Sepharose 4B beads を25-50 $\mu$ L 添加した。その後、4 $^{\circ}$ C にて一晚ローテーションし、ビーズに GST 融合タンパク質を吸着させた。

ローテーション後、14,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10秒間遠心し、上清のみ除去した。沈殿したビーズに4 $^{\circ}$ C に冷やした NETN buffer を加え、ゆるやかに混合した後14,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10秒間遠心し、再び上清のみ除去した。さらに同様の操作を3-5回繰り返す、ビーズを洗浄した。最終的に buffer 部分を除去し、GST 融合タンパク質 + Glutathione Sepharose beads として4 $^{\circ}$ C にて保存した。

### GST 融合タンパク質の精製と発現の確認

GST 融合タンパク質 + ビーズに x2 sample buffer [ Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Canada),  $\beta$ -mercaptoethanol ] を加え、7分間熱した後10% gel (READY GELS J, Bio Rad Laboratories) を用いて SDS-PAGE を行った。染色はクーマシーブルーを用いた。

上記の SDS-PAGE で得られたバンドが pRB であるという確認をするため、Western blotting を行った。電気泳動後のゲル上のタンパク質を nitrocellulose membrane に転写し、5% non-fat milk / 0.1% Tween 20 含有 phosphate buffered saline (PBST) にて室温2時間、または4 $^{\circ}$ C 一晚振蕩しブロッキング処理を行った。

その後、膜を一次抗体 purified mouse anti-human retinoblastoma protein (RB) monoclonal antibody (PharMingen International, Japan) または purified mouse anti-GST monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) を 1 : 1,000 になるように PBS で希釈したものに浸し、4 一晚振蕩した。PBST にて 5 分間 3 回洗浄後、二次抗体 anti-mouse IgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody (from sheep) (Amersham pharmacia biotech., USA) を 1 : 1,000 1 : 2,000 になるように 5 % non-fat milk/PBST にて希釈したものに浸し、室温 1 時間振蕩した。再び、PBST にて 5 分間 3 回洗浄後、暗室で ECL (Amersham International plc., England) 法にてフィルム (FUJI MEDICAL X-RAY FILM, FUJI PHOTO FILM CO., LTD., Japan) に現像した。

#### Western blotting による血清中の抗 pRB 抗体の検出

各 GST 融合タンパク質 + ピーズに x2 sample buffer を加え、7 分間加熱した後 10% gel を用い電気泳動を行った。電気泳動後のゲル上のタンパク質を nitrocellulose membrane に転写し、5 % non-fat milk/PBST にて室温 2 時間、または 4 一晚振蕩しブロッキング処理を行った。

その後、患者および健常人の血清を 1 : 100 になるように 5 % non-fat milk/PBST で希釈したものに膜を浸し、4 3 時間振蕩した。PBST にて 10 分間 3 回洗浄後、二次抗体 anti-human IgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody (from sheep) を 1 : 2,500 になるように 5 % non-fat milk/PBST にて希釈したものに浸し、室温 45 分間振蕩した。再び、PBST にて 10 分間 6 回洗浄後、暗室で ECL 法にてフィルムに現像した。

## 結 果

#### GST - pRB 融合タンパク質の発現の確認

本研究における GST 融合タンパク質の構造を図 3 に示した。X5-3 は野生型 pRB の 379 番目アミノ酸残基から C 末端側の 928 番目までを有し、F4-1 は X5-3 の 706 番目システインがフェニルアラニンに点突然変異を起こした変異型 pRB の構造を有する<sup>25)</sup> (図 3)。

GST 融合タンパク質を含有する大腸菌の whole lysates と比べ、グルタチオン樹脂にて精製後の GST-pRB は細胞タンパク質が除去されていることが確認された (図 4)。pRB に対するモノクローナル抗体を

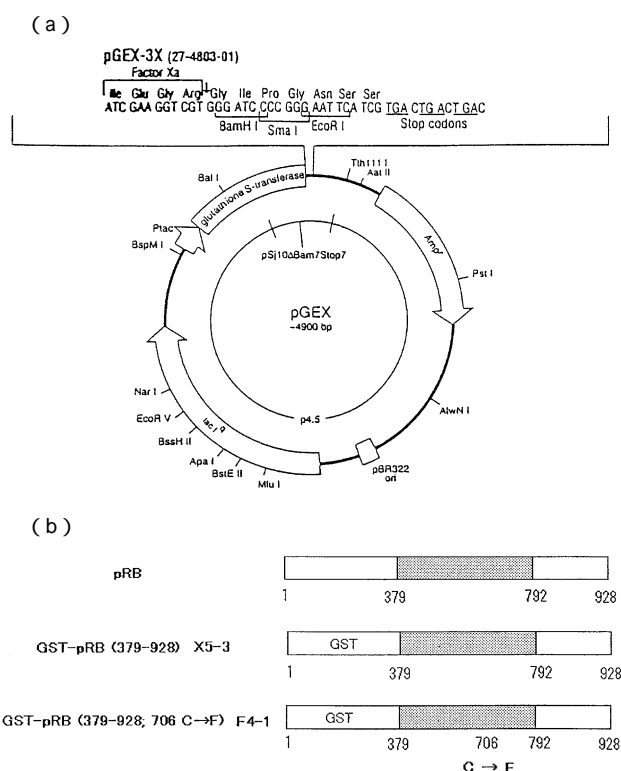


図 3 GST Gene Fusion System の大腸菌ベクター pGEX 3X (a) と GST-RB 融合タンパク質の模式図 (b)  
a.a. 379-792 は T/E1A-binding region

用いた Western blotting にて確認した結果 (図 5 A), 目的の分子量に GST-RB 融合タンパク質が存在した。

#### GST 融合タンパク質を用いた血清中の抗 pRB 抗体の検出

肺癌患者 92 人のうち 11 人 (12%) の血清中から GST-pRB に対する抗体が検出された (表 1, 2)。組織型別では小細胞肺癌患者 24 人中 4 人、非小細胞肺癌患者 68 人中 7 人が GST-pRB に対する抗体が陽性であった。対照の健常人 30 人の血清中から GST-pRB に対する抗体は検出されなかった。また GST-pRB に対する抗体陽性の肺癌患者血清中から抗 GST 抗体は検出されなかった。これらの結果から、肺癌患者血清中の GST-pRB に対する抗体は癌抑制遺伝子産物 pRB (アミノ酸残基 379 番目から 928 番目) に特異的な抗体であるといえる。抗原抗体反応の陽性例および陰性例を図 6 B に示した。陽性例の小細胞肺癌患者血清中には 91kD の位置に GST-pRB のバンドがみられるが、26kD の位置に GST のバンドはみられなかった。また、野生型の GST-pRB のバンドのみが検出された例が一例存在した。陰性例の

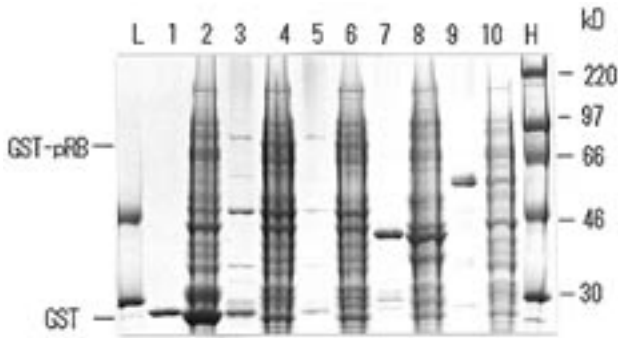


図4 GST Gene Fusion System による GST 融合タンパク質の精製と発現  
 GST Gene Fusion System によってタンパク質発現させた精製 GST-RB タンパク質, GST-p16タンパク質および GST-c-Myc タンパク質と各大腸菌細胞液を SDS-PAGE 後, クマシーブルーにより染色した像。  
 L: low molecular weight marker, H: high molecular weight marker  
 Lane 1 2 .GST (pGEX 3X) : Lane 3 4 .GST-wt.pRB ( X5 3) :  
 Lane 5 6 .GST-mt.pRB ( F4 1) : Lane 7 8 .GST-p16 :  
 Lane 9 ,10 .GST-c-Myc  
 Lane 1 3 5 7 9 .purified with Guluthatione Sepharose beads  
 Lane 2 4 6 8 ,10 .whole bacterial lysates

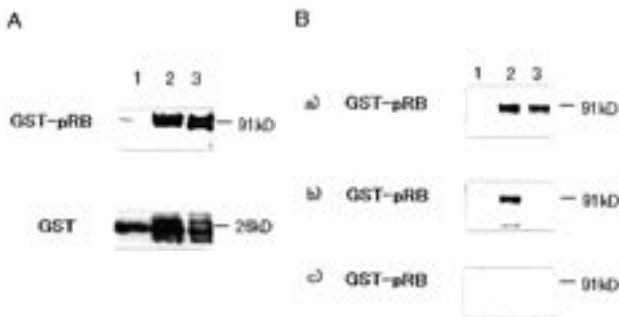


図5 GST-RB 融合タンパク質のモノクローナル抗ヒト pRB 抗体による Western blotting 像 ( A ) とヒト血清による Western blotting 像 ( B )  
 Lane 1 .GST( pGEX 3X ) Lane 2 .GST-wt.pRB( X5 3 )  
 Lane 3 .GST-mt.pRB( F4 1 )  
 ( A ) 一次抗体にpurified mouse anti-human retinoblastoma protein monoclonal antibody およびpurified mouse anti-GST monoclonal antibody を使用し, 二次抗体は anti-mouse IgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody を使用し, Western blotting 後, ECL 法にて現像した。  
 91kD の位置に GST-RB 融合タンパク質, 26kD の位置に GST の存在が確認された。  
 ( B ) a ) anti-GST-pRB Ab positive, b ) only anti-GST-wt.pRB Ab positive, c ) anti-GST-pRB Ab negative  
 肺癌患者および健康人血清を一次抗体の代わりに使用し, 二次抗体にanti-human IgG,peroxidase-linked species-specific whole antibody を使用し, Western blotting 後, ECL 法にて現像した。

肺癌患者血清, SLE 患者血清および健康人血清中には GST や GST-pRB のバンドはみられなかった。

抗 pRB 抗体と臨床的因子等との相関を調べたところ, Performance Status ( PS ) において有意に相関がみられた ( 表 2 )。抗 pRB 抗体と抗 p16抗体の両方を測定済

表 1 抗 pRB 抗体と臨床的因子との関係

		Anti-pRB antibody		P-value <sup>a</sup>
		With	Without	
Age	20 70	9	49	0 .169
	> 70	2	32	
Gender	Man	10	61	0 .247
	Woman	1	20	
Performance status	0 1	10	44	0 .020
	2 4	1	37	
Histology	Ad <sup>b</sup>	4	34	( Sm vs other ) 0 .408
	Sq <sup>c</sup>	3	22	
	Lg <sup>d</sup>	0	5	
	Sm <sup>e</sup>	4	20	
Stage	I	1	9	( I-III A vs III B-IV ) 0 .713
	II	0	2	
	III A	3	14	
	III B	2	15	
	IV	5	41	
Smoking ( B.I. )	0 599	3	32	0 .433
	> 600	8	49	
Prior chemo or radiotherapy	with	8	63	0 .708
	without	3	18	

<sup>a</sup>Fisher's exact probability test; <sup>b</sup>Ad, adenocarcinoma; <sup>c</sup>Sq, squamous cell carcinoma; <sup>d</sup>Lg, large cell carcinoma; <sup>e</sup>Sm, small cell carcinoma; 'B.I., Brinkmann index.

表 2 肺癌患者, SLE 患者および健康人血清中の抗 pRB 抗体陽性率

	Anti-pRB antibody		
	With	Without	Positive rate ( % )
Normal Volunteer	0	30	0
Lung cancer patients	11	81	12
SLE patients	0	12	0

みの82人中11人が抗 p16抗体陽性であったが, 抗 pRB 抗体と抗 p16抗体共に陽性であった患者は2人であった。また, 抗 pRB 抗体, 抗 p16抗体いずれかが陽性であった肺癌患者は82人中20人 ( 24 .4% ) であった ( 表 3 )。抗 pRB 抗体と第三内科で確認済みの他の自己抗体につ

表3 抗 pRB 抗体および抗 p16抗体と臨床的因子の関係

		Anti-pRB Abs and/or Anti-p16 Abs		P-value <sup>a</sup>
		With	Without	
Age	20-70	14	37	0.408
	>70	6	25	
Gender	Man	14	50	0.317
	Woman	6	12	
Performance status	0-1	14	33	0.187
	2-4	6	29	
Histology	Ad <sup>b</sup>	8	25	(Sm vs other) 0.605
	Sq <sup>c</sup>	4	19	
	Lg <sup>d</sup>	2	3	
	Sm <sup>e</sup>	6	15	
Stage	I	1	8	(I-III vs III-IV) 0.957
	II	0	1	
	IIIA	5	10	
	IIIB	2	14	
	IV	12	29	
Smoking (B.I. <sup>f</sup> )	0-599	9	19	0.239
	>600	11	43	
Prior chemo <sup>g</sup> or radiotherapy	with	16	48	0.808
	without	4	14	

<sup>a</sup>Fisher's exact probability test; <sup>b</sup>Ad, adenocarcinoma; <sup>c</sup>Sq, squamous cell carcinoma; <sup>d</sup>Lg, large cell carcinoma; <sup>e</sup>Sm, small cell carcinoma; <sup>f</sup>B.I., Brinkmann index.

表4 肺癌患者血清中の抗 pRB 抗体と他の自己抗体

	Anti-pRB antibody		P-value <sup>*</sup>
	With	Without	
Anti-p16 Ab	With	9	0.531
	Without	2	
Anti-L-Myc Ab	With	6	0.367
	Without	7	
Anti-c-Myc Ab	With	8	0.331
	Without	6	
ANA	With	23	0.467
	Without	5	

Ab : antibody ; ANA : antinuclear antibody ; <sup>\*</sup>Fisher's exact probability test.

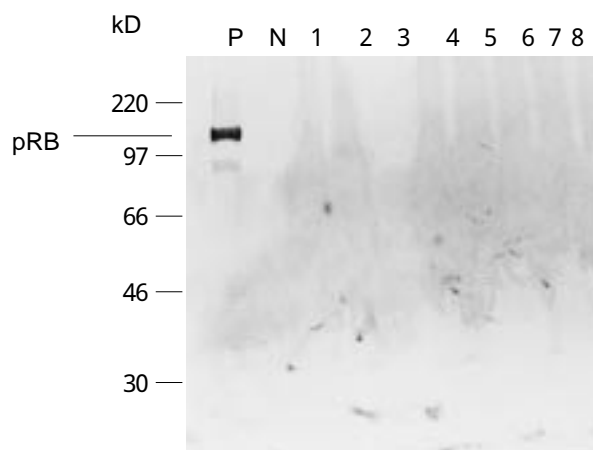


図6 ヒト血清中のRBタンパク質のWestern blottingによる検出結果

P : pRB positive control ( non-small cell lung cancer , 50μg of Ma 31 cell lysate )

N : pRB negative control ( small cell lung cancer , 50μg of N417 cell lysate )

Lane 1-8 : 10μL of sera from lung cancer patients

各レーンに肺癌患者血清を10μL アプライし、一次抗体に purified mouse anti-human retinoblastoma protein monoclonal antibody を使用し、二次抗体は anti-mouse IgG peroxidase-linked species-specific whole antibody を使用し、Western blotting 後、ECL 法にて現像した。しかし、患者血清中の RB タンパク質は検出できなかった。

いて検討したところ、有意な相関はみられなかった (表4)。

#### 肺癌患者血清中における pRB 抗原の検出

肺癌患者末梢血中に循環している pRB 発現は purified mouse anti-human RB protein monoclonal antibody を用いた Western blotting にて検討した。ヒト pRB に対するモノクローナル抗体を用いて Western blotting を行った場合 positive control である非小細胞肺癌株 Ma 31 (タンパク濃度50μL) 中に存在する pRB は検出されたが、患者および健康人血清中からは血液循環している pRB を検出することはできなかった (図6)。また、条件を変え通常使用している濃度以上に抗体濃度を高くしたり、ECL 液の露光時間を長くしても血清中の pRB は検出されなかった。

#### 考 察

これまで、本学医学部第三内科では、肺癌患者血清中における癌遺伝子産物 c-Myc, L-Myc に対する自己抗

体, および癌抑制遺伝子産物 p16 に対する自己抗体の検討を行ってきた<sup>21-23)</sup>。今回は癌抑制遺伝子産物 pRB に対する自己抗体を肺癌患者血清中から検出し, 年齢, 性別, 組織型などの臨床的因子との相関や今までに同一患者血清で確認された自己抗体との相関などについても検討を行った。

#### GST-pRB 融合タンパク質を用いた血清中の自己抗体検出における検討

組み換えタンパク質の発現方法として用いた GST-Gene fusion system (GST 遺伝子融合系) は, 目的遺伝子 (今回は RB) をベクター上の GST 遺伝子配列の後ろにフレームを合わせて組み込み, IPTG 添加によってタンパク質の発現を誘導し, 大腸菌内で GST 融合タンパク質として大量に発現させる方法である。本研究におけるベクターは第三内科が所持する, 既に RB を組み込んである 2 種類のベクターを使用した (図 3)。実験方法は, 第三内科で以前検討された癌遺伝子産物 c-Myc, L-Myc, 癌抑制遺伝子産物 p16 に対する自己抗体の検出方法<sup>22-24)</sup>を参考にした。

本研究は pRB 自身を詳しく検討する目的ではなかったため, 大腸菌抽出液を調製し, Glutathione Sepharose 4B とサンプル溶液を混合する簡便なバッチ法にて GST 融合タンパク質の精製を行った。抗 pRB 抗体を用いて Western blotting を行ったところ GST-pRB 融合タンパク質発現を確認することができた (図 5 A)。

抗 pRB 抗体の有無を確認するために用いた ECL 法の現像条件は, 以前の自己抗体の検出を参考にして GST-pRB のバンドのみが強く検出されたサンプルを抗 pRB 抗体陽性と判定した。今回の抗 pRB 抗体の検出方法は, 今まで当研究室で検討された肺癌患者の自己抗体の検出方法と統一性を持たせた。また, 同一患者血清を用いた分においては他の自己抗体との関連性なども検討した。

このような血清中の自己抗体を測定するには今回の方法と同様 Immunoblotting を用いたり, ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) を用いた報告がなされている<sup>26)</sup>。ELISA 法は p53 タンパク質に対する自己抗体の報告に多い。最近の報告ではカットオフ値をどう設定するか論点を置いた報告もみられるが<sup>27)</sup>, 判断基準は各研究者によってまちまちであるのが現状である。もし臨床的に有用な診断指標となりえるならば,

よりの確な判断基準作りも必要になると考えられる。今回は残念ながら, 肺癌患者血清中に抗 pRB 抗体が検出されるという報告にとどまっており, 判断に関する数値的な検討を行わなかった。

#### 血清中の pRB 抗原の検出方法における検討

今回, Western blotting を用いて検討した結果, 患者および健常人の血清中から pRB 抗原は一例も検出されなかった。たとえ pRB が血清中に存在したとしても, pRB 抗原量がごく微量であったために検出限界外であったといえる。pRB はほとんどの組織の正常細胞中にも存在する安定なタンパク質であり, 最近では筋肉や血球系の細胞では細胞が分化すると pRB の発現量が増加するとの報告がある<sup>28)</sup>。哺乳類や脊椎動物では筋肉の細胞分化が終了する際に, 細胞周期に入るために必要な遺伝子の発現を阻害する pRB が出現し筋細胞が細胞周期に再び入ることを制御する。このことから血清中に pRB が存在し検出できたとしても, 血球系や筋肉の細胞由来の pRB である可能性が推測される。健常人の対照と比較する場合も癌由来特異的な pRB が極微量であれば, それ自身を識別することは困難であると予想される。

#### 疾患と自己抗体について

今回, 我々は肺癌患者血清中の癌抑制遺伝子産物 pRB に対する抗体を検出し, 年齢, 性別, 組織型など臨床的因子との関連性の検討を行った。

肺癌患者 92 人のうち 11 人 (12%) の血清中から抗 pRB 抗体が検出され, PS に有意な相関を示した。しかし, 健常人 30 人の血清中から抗 pRB 抗体は検出されなかった。また, 自己免疫疾患の代表として SLE 患者 12 人の血清を調べたが抗 pRB 抗体は検出されなかった。これらのことから, 抗 pRB 抗体は肺癌患者特異的であると推測される。また, 野生型 pRB にのみ反応した抗体が一例存在した。今回用いた変異型 pRB は点突然変異 (706, C F) を有することから, タンパク質の構造が変化しているために抗原と結合できなかったと考えられる。

肺癌患者血清 92 例のうち, 癌遺伝子産物 c-Myc または L-Myc に対する自己抗体を検討した血清が 64 例 (うち陽性 8 例), また p16 に対する自己抗体を検討した血清が 82 例 (うち陽性 11 例) であった。抗核抗体に関しては検査済みの 65 例中 29 例が陽性であった。しかし, これらの自己抗体と抗 pRB 抗体の間に有意な相関はみられ

なかった。

抗 pRB 抗体と抗 p16 抗体の両方を測定済みの 82 人中 11 人が抗 p16 抗体陽性であったが、抗 pRB 抗体と抗 p16 抗体共に陽性であった患者は 2 人であった。RB 経路 (pRB, p16, cyclin D1) について原発癌を免疫組織学的に調べると、小細胞肺癌は p16 を発現しているが pRB を欠損している例が多く、一方、非小細胞肺癌では RB タンパク質や cyclin D1 を発現しているが、p16 を欠損している、又はその発現が弱い例が多いことが知られている<sup>29)</sup>。癌は RB 経路 (図 2) のどこかに異常がある場合がほとんどであり、p16 または pRB のいずれか一方に抗体が産生されていることは十分考えられる。今回の 82 例の肺癌患者血清においては、p16 および pRB に対する抗体間に有意な相関はなく、これらの抗体を持つ患者と持たない患者間においても臨床的因子との相関はみられなかった。しかしながら、抗 p16 抗体陽性患者と抗 pRB 抗体陽性患者はほとんど重複しておらず、82 人中 20 人 (24.4%) においてどちらかの抗体が陽性であり、単独の抗体を調べたときに比べ陽性率がほぼ 2 倍になった。このように複数の抗体について調べることで、診断等に利用できる可能性が示唆された。

現在、様々な癌患者において癌遺伝子、および癌抑制遺伝子などの自己抗体が検出されている。特に癌抑制遺伝子産物である p53 に対する自己抗体は大腸癌、乳癌、肺癌などで検討されている<sup>18, 22, 30)</sup>。ELISA を用いて 186 人の肺疾患患者血清中の抗 p53 抗体を調べた報告では、癌以外の疾患では抗 p53 抗体が検出されなかったが、136 人の肺癌患者において 16 人 (11.8%) が陽性であり、また少数ではあるが検出され得た p53 遺伝子の変異と抗体陽性例では特異的な相関がみられた<sup>31)</sup>。また、Chun-Liang Lai らの報告によれば、抗 p53 抗体は肺癌患者の 8% (125 人中 10 人) に検出されたが、やはりコントロール血清中からは検出されなかった。抗 p53 抗体陽性例の方が陰性例に比べて生存率が低く、また癌性胸水を持つ 51 人中 9 人が抗体陽性であり、抗体の存在は癌性胸水や癌のステージの診断因子となりうるとしている<sup>32)</sup>。また、抗 p53 抗体陽性肺癌患者 16 人と抗体陰性肺癌患者 16 人、計 32 人を 30 ヶ月モニターし治療効果との関係を調べた場合、治療中にこれらの抗体力価は急速に且つ特異的に減少しており、癌細胞の核内中のある一定の p53 タンパクレベルが体液性の抗 p53 反応に必要なことを示唆し、抗 p53 抗体が治療に対する反応を調べる有用なツールであると報告している<sup>33)</sup>。

野生型の p53 をもつ細胞においては存在する p53 タンパク質の量はごく微量であるが、 $\gamma$ 線や紫外線、あるいはアドリマイシン等の抗癌剤のように細胞の DNA にダメージを与えるものを作用させると、安定化されて量が増加してくる。そして、転写活性化能を持つようになり、G1 期停止かアポトーシスを誘導する。こういったことが引き金となり p53 に対する自己抗体が産生されたとの報告もある<sup>34)</sup>。Zalcman らの報告<sup>35)</sup>にもあるように、一定レベルの p53 量が癌細胞中に存在することが抗体産生と関係していることが考えられる。

さらに、癌患者の血清中の癌遺伝子産物に対する自己抗体発現についていくつかの報告がある。多くの癌では変異した癌遺伝子由来のタンパク質に対して自己抗体が産生されたとの報告がある。例えば、癌遺伝子 ras は特異的な点変異 (コドン 12) によって活性化される癌に関係した遺伝子であるが<sup>35)</sup>、大腸癌患者で ras タンパク質に対する抗体が存在するとの報告がある<sup>36)</sup>。

また、乳癌、大腸癌、肺癌などで複数の変異スポットを含む異常な p53 タンパク質に対する抗体が患者血清中から検出されている<sup>18, 21)</sup>。点変異の他にも、遺伝子の転位が免疫系の攻撃対象となるキメラタンパク質を産生している融解遺伝子の発現を引き起こすこともある。しかし、異常なタンパク質に対する免疫反応の引き金となるのは、根底にある遺伝子異常が原因であるのかということは一般的に分かっていない。Nicole らは肺癌の扁平上皮癌を用い、自己抗体の産生において遺伝子増幅がどのような役割を持っているのかを検討した。肺癌における染色体異常は主に chromosome 3 に位置していることが示され、肺扁平上皮癌の免疫反応性抗原の発現における機能の一つとして、遺伝子増幅があるという可能性が示唆された<sup>37)</sup>。

自己抗体を産生するという点においては自己免疫疾患があげられる。臓器特異的自己免疫疾患は、本来トレランス (免疫学的寛容) になっているはずの、ある臓器にだけ発現している自己の抗原に対してそのトレランスが破綻し、それに対して免疫系が積極的に反応した結果であると考えられる。多くの臓器特異的自己免疫疾患で、臓器抗原特異的な自己抗体が検出されたり、障害臓器または末梢血に臓器抗原特異的な T 細胞が存在することが確認されている。一方、膠原病すなわち全身性自己免疫疾患がこのような免疫反応の延長線上にあるか否かはよく分かっていない。膠原病で検出される自己抗体の標的はほとんどが核内物質 (pRB も含む) や細胞質分子



なので、この場合自己抗体が直接臓器障害を起こしているとは考えにくい。膠原病では自己抗体産生が antigen driven による免疫応答で起こっていると考えられている<sup>38, 39)</sup>。

今回の肺癌患者血清中の抗核抗体は65人中30人陽性(46.2%)と比較的高値であった。肺癌患者中に自己免疫疾患患者はいなかったため、この結果は高齢者が多いために高値になったと考えられる。自己免疫疾患は p53 や c-Myc と関係したアポトーシスと関連していることが知られている<sup>11)</sup>。また、癌関連の分子に対する抗体で、かつ SLE に特異的な自己抗体としては抗 PCNA 抗体がある。ただし、出現頻度は < 3% であり、疾患との関係はまだ不明である。PCNA は細胞周期の late G1 期から S 期に特異的に核内に増加する分子量 34kDa のポリペプチドよりなる非ヒストン酸性核タンパクであり、このタンパク質が増殖細胞で高い発現を示すことから癌診断のマーカーとして広く用いられている<sup>40)</sup>。今回、自己免疫疾患の代表として12人の SLE 患者血清中の抗 pRB 抗体を調べた。PCNA も pRB も細胞周期に深く関わるタンパク質という点では共通であったが、SLE 患者血清からは抗 pRB 抗体が検出されなかった。しかし、母集団を増やせば RB に対する抗体をもつ SLE 患者が存在することが考えられる。この場合、抗 pRB 抗体は癌特異的なマーカーとはなり得ないので、さらなる検討を要するであろう。

今回調査した92人の肺癌患者において臨床的因子と抗 pRB 抗体との関係を調べたところ、Performance Status (PS) と有意に相関を示した。PS が末期癌患者の生存率の主立った診断因子である<sup>41, 42)</sup>ことから抗 pRB 抗体が生存率に関係することが考えられる。自己免疫疾患においては、年齢と共に発症率が上昇することから、成人の胸腺で少しずつ作られる T 細胞が、その分化の過程でネガティブセレクションが正常に機能しなくなる可能性も考えられる。また、多くの自己免疫疾患において性差がみられることが知られ、性ホルモンの影響が考えられているが、どのようにして発症に関わるのかは明らかにされていない<sup>43)</sup>。しかし、今回の肺癌患者を対象にした抗 pRB 自己抗体の調査では性差において有意な相関がみられず、また年齢が低い患者で抗体陽性率が高い傾向がみられた。肺癌患者と自己免疫疾患患者での自己抗体産生メカニズムは異なると推測される。肺癌において PS および年齢が低い、つまり比較的元気な体を持って

いる患者は、年齢および PS が高い患者に比べて免疫機能が正常に働いていると考えられる。残念ながら今回、研究用に肺癌患者から癌組織を採取しておらず、血清中の抗 pRB 抗体陽性とした癌患者の組織中の pRB 量や RB 遺伝子の変異との関係などについては検討できなかった。しかしながら、抗 p53 抗体に関する報告を基に推測すると、過剰になった RB タンパク質が癌細胞破壊時に放出され正常な免疫系の T 細胞を刺激し、肺癌患者において抗体が産生された一つの仮説を立てることができる。主に小細胞肺癌では pRB が欠損しているといわれるが、全ての小細胞肺癌において pRB が欠損しているわけではないため、抗 pRB 抗体陽性であった小細胞肺癌では pRB が発現していた、もしくは小細胞肺癌以外の組織型を複数もつ癌であったと推測される。今後、原発癌のタンパク質および遺伝子異常等と抗体産生のメカニズムについてさらなる研究の発展が望まれるであろう。

また、最近の報告にある SEREX (serological analysis of recombinant tumor cDNA expression libraries) は血清中の IgG 抗体が認識する抗原について癌細胞 cDNA ライブラリーを患者血清でスクリーニングすることにより単利する方法で、細胞の中のタンパクを含めた DNA 発現クローニングである。癌細胞が破壊された場合、そこから遊離した分子に対する抗体もできるだろう、という意見を持つ免疫研究者もいる<sup>44, 45)</sup>中で、こういった新しい方法により癌特異的な免疫反応を起こす新しい分子が検索され、免疫反応系における機構の解析などが今後さらに進展することが望まれる。

## 謝 辞

本研究にあたって、終始、御指導、御助言いただきました臨床薬理学研究室の皆様、並びに本学医学部第三内科の皆様から感謝いたします。

## 文 献

- (1) 西脇裕, 北條史彦, 大松広伸, 永井完: 特集 検診発見癌の特徴と治療の進歩「肺癌」. 癌と化学療法 25: 1486-1492, 1998
- (2) 上岡博, 平木俊吉: 特集 主要臓器進行癌治療「小細胞肺癌」. 癌と化学療法 25: 1655-1670, 1998

- (3) 根来俊一：特集 主要臓器進行癌治療「進行非小細胞肺癌の治療」. 癌と化学療法 25 : 1671-1679, 1998
- (4) 菊池功次, 小林紘一：診断のための検査計画「肺癌」. 臨床医 20 : 186-190, 1994
- (5) Friend, S.H., Bernards, R., Rogelji, S., Weinberg, R.A., et al. : A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323 : 16-22, 1986
- (6) Weinberg, R.A. : Tumor suppressor genes. *Science* 254 : 1138-1146, 1991
- (7) Yamashita, T., Segawa, K., Fujinaga, Y., Nishikawa, T., et al. : Biological and biochemical activity of E7 genes. *Oncogene* 8 : 2433-2441, 1993
- (8) Taya, Y. : RB kinases and RB-binding proteins : new points of view. *Trends Biochem. Sci.* 22 : 14-17, 1997
- (9) Lukas, J., Parry, D., Aagaard, L., Mann, D.J., et al. : Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* 375 : 503-506, 1995
- (10) Chow, K.N., and Dean, D.C. : Domains A and B in the Rb pocket interact to form a transcriptional repressor motif. *Mol. Cell Biol.* 16 : 4862-4868, 1996
- (11) 田矢洋一, 野島博, 花岡文雄：実験医学別冊 新用語ライブラリー「細胞周期」, 122-123, 1999
- (12) Kawabuchi, B., Moriyama, S., Hironaka, M., Fujii, T., et al. : p16 inactivation in small-sized lung adenocarcinoma : its association with poor prognosis. *Int. J. Cancer* 84 : 49-53, 1999
- (13) Hommura, F., Dosaka-Akita, H., Kinoshita, I., Mishina, T., et al. : Predictive value of expression of p16INK4A, retinoblastoma and p53 proteins for the prognosis of non-small-cell lung cancers. *Br. J. Cancer* 81 : 696-701, 1999
- (14) Sanchez-Cespedes, M., Monzo, M., Rosell, R., Pifarre, A., et al. : Detection of chromosome 3p alterations in serum DNA of non-small-cell lung cancer patients. *Ann. Oncol.* 9 : 113-116, 1998
- (15) Sozzi, G., Musso, K., Ratcliffe, C., Goldstraw, P., et al. : Detection of microsatellite alterations in plasma DNA of non-small cell lung cancer patients : a prospect for early diagnosis. *Clin. Cancer Res.* 5 : 2689-2692, 1999
- (16) Esteller, M., Sanchez-Cespedes, M., Rosell, R., Sidransky, D., et al. : Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res.* 59 : 67-70, 1999
- (17) Crawford, L.V., Pim, D.C., and Bulbrook, R.D. : Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *Int. J. Cancer* 30 : 403-408, 1982
- (18) Rainov, N.G., Dobberstein, K.U., Fittkau, M., Bahn, H., et al. : Absence of p53 autoantibodies in sera from glioma patients. *Clin. Cancer Res.* 1 : 775-781, 1995
- (19) Lubin, R., Zalzman, G., Bouchet, L., Tredanel, J., et al. : Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer. *Nat. Med.* 1 : 701-702, 1995
- (20) Peyrat, J.P., Bonneterre, J., Lubin, R., Vanlemmens, L., et al. : Prognostic significance of circulating P53 antibodies in patients undergoing surgery for locoregional breast cancer. *Lancet* 345 : 621-622, 1995
- (21) Hammel, P., Leroy-Viard, K., Chaumette, M.T., Villaudy, J et al. : Correlations between p53 protein accumulation, serum antibodies and gene mutation in colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 81 : 712-718, 1999
- (22) Yamamoto, A., Shimizu, E., Ogura, T. and Sone, S. : Detection of auto-antibodies against L-myc oncogene products in sera from lung cancer patients. *Int. J. Cancer* 69 : 283-289, 1996
- (23) Yamamoto, A., Shimizu, E., Takeuchi, E., Houchi, H., et al. : Infrequent presence of anti-c-Myc antibodies and absence of c-Myc oncoprotein in sera from lung cancer patients. *Oncology* 56 : 129-133, 1999
- (24) Namikawa, O., Shimizu, E., Sumitomo, K. and Sone S : Analysis of antibodies to p16INK4A tumor suppressor gene products in lung cancer patients. *Int. J. Oncol.* 14 : 681-685, 1999
- (25) Kaelin, W.G. Jr., Pallas, D.C., DeCaprio, J.A., Kaye, F. J., et al. : Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E 1 A-binding region of the retinoblastoma gene product. *Cell* 64 : 521-532, 1991
- (26) Regele, S., Kohlberger, P., Vogl, F.D., Bohm, W., et al. : Serum p53 autoantibodies in patients with minimal lesions of ductal carcinoma in situ of the breast. *Br. J. Cancer* 81 : 702-704, 1999

- (27) Hallak, R., Mueller, J., Lotter, O., Gansauge, S., et al.: p53 genetic alterations, protein expression and autoantibodies in human colorectal carcinoma: A comparative study. *Int. J. Oncol.*, 12 : 785-791, 1998
- (28) Schneider, J.W., Gu, W., Zhu, L., Mahdavi, V. et al.: Reversal of terminal differentiation mediated by p107 in Rb-/-muscle cells. *Science* 264 : 1467-1471, 1994
- (29) Yuan, J., Knorr, J., Altmannsberger, M., Goeckenjan, G., et al.: Expression of p16 and lack of pRB in primary small cell lung cancer. *J. Pathol.*, 189 : 358-362, 1999
- (30) Wollenberg, B., Jan, N.V., Pitzke, P., Reiter, W., et al.: Anti-p53 antibodies in serum of smokers and head and neck cancer patients. *Anticancer Res.*, 17 : 413-418, 1997
- (31) Wild, C.P., Ridanpaa, M., Anttila, S., Lubin, R., et al.: p53 antibodies in the sera of lung cancer patients: comparison with p53 mutation in the tumour tissue. *Int. J. Cancer* 64 : 176-181, 1995
- (32) Lai, C.L., Tsai, C.M., Tsai, T.T., Kuo, B.I., et al.: Presence of serum anti-p53 antibodies is associated with pleural effusion and poor prognosis in lung cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 4 : 3025-3030, 1998
- (33) Zalcman, G., Schlichtholz, B., Tredaniel, J., Urban, T., et al.: Monitoring of p53 autoantibodies in lung cancer during therapy: relationship to response to treatment. *Clin. Cancer Res.*, 4 : 1359-1366, 1998
- (34) Angelopoulou, K., Rosen, B., Stratis, M., Yu, H., et al.: Circulating antibodies against p53 protein in patients with ovarian carcinoma. Correlation with clinicopathologic features and survival. *Cancer* 78(10) : 2146-2152, 1996
- (35) Bos, J.: Ras oncogenes in human cancer: A review. *Cancer Res.*, 49 : 4682-4689, 1989
- (36) Takahashi, M., Chen, W., Byrd, D.R., Disis, M.L., et al.: Antibody to ras proteins in patients with colon cancer. *Clin. Cancer Res.*, 1 : 1071-1077, 1995
- (37) Brass, N., Racz, A., Bauer, C., Heckel, D., et al.: Role of amplified genes in the production of autoantibodies. *Blood* 93 : 2158-2166, 1999
- (38) 藪田清次: 特集 自己免疫疾患診療の最新情報「自己免疫疾患の病因と治療」. *内科* 83 : 127-140, 1999
- (39) 高崎芳成: 特集 膠原病診療の新しい展開「抗核抗体の対応抗原の分子生物学」. *内科* 80 : 15-33, 1997
- (40) Alvarado-de la Barrera, C., Alcocer-Varela, J., Richaud-Patin, Y., Alarcon-Segovia, D., et al.: Differential oncogene and TNF-alpha mRNA expression in bone marrow cells from systemic lupus erythematosus patients. *Scand. J. Immunol.*, 48 : 551-556, 1998
- (41) Allard, P., Dionne, A., and Potvin, D.: Factors associated with length of survival among 1081 terminally ill cancer patients. *J. Palliat. Care* 11 : 20-24, 1995
- (42) Ando, M., Ando, Y., Sugiura, S., Minami, H., et al.: Prognostic factors for short-term survival in patients with stage IV non-small cell lung cancer. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90 : 249-253, 1999
- (43) 小安重夫: 「自己免疫疾患とアレルギー」. 実験医学バイオサイエンス新T細胞のイムノバイオロジー. 羊土社, 東京, 1999 pp. 184-188
- (44) 河上裕: 特集 癌ワクチン療法「新しい癌抗原特異的免疫療法」. *Molecular Medicine* 35 : 1100-1119, 1998
- (45) Chen, Y.T., Scanlan, M.J., Sahin, U., Tureci, O., et al.: A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 : 1914-1918, 1997

## *Detection of anti-pRB antibodies in sera of lung cancer patients*

*Yuiko Yamamoto<sup>1,3</sup>, Eiji Shimizu<sup>2</sup>, Masayuki Yokota<sup>1</sup>, and Saburo Sone<sup>3</sup>*

*<sup>1</sup> Department of Clinical Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Science, The University of Tokushima, Tokushima, Japan; <sup>2</sup> Third Department of Internal Medicine, The University of Tottori School of Medicine, Tottori, Japan ; and <sup>3</sup> Third Department of Internal Medicine, The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima, Japan*

### SUMMARY

Recently, serum antibodies against the oncogene and tumor suppressor gene products have been studied in patients with various types of cancer. Antibody against p53 tumor suppressor gene product among these antibodies was suggested to be useful for early diagnosis and evaluation of prognosis of patients with some types of cancer. In this article, we review clinical significance of antibodies against product of retinoblastoma gene (pRB), one of representative tumor suppressor genes. We also describe methods of detection of antibodies in sera from patients with lung cancer by immunoblotting assays using glutathione-S-transferase (GST)-RB fusion proteins.

Key words : tumor suppressor gene, pRB, serum, autoantibody, lung cancer