

# 肺癌における OCIAD2 発現の意義

2014

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

糸口直江

筑波大学

博士（医学）学位論文

## 目次

1	はじめに	3
1.1	肺癌の臨床学的特徴	
1.2	肺腺癌の分類	
1.3	肺癌の診断	
1.4	OCIAD2	
1.5	研究全体の目的	
2	第1章 肺癌における OCIAD2 の発現解析	10
2.1.	目的	
2.2.	材料と方法	
	(A) 蛍光免疫染色	
	(B) 肺癌手術症例の免疫組織化学	
	(i) 材料、患者背景	
	(ii) 方法	
	(iii) 免疫染色評価	
	(iv) 統計学的評価	
	(C) Real-time quantitative reverse transcription PCR	
	(i) 材料、患者背景	
	(ii) 方法	
	(iii) 免疫組織化学との関連性	
2.3.	結果	
	(A) 蛍光免疫染色	

(B)肺癌手術症例の免疫組織化学

(C)Real-time quantitative reverse transcription PCR

2.4. 考察

3 第2章 臨床への応用(細胞診材料への応用) . . . . . 21

3.1. 目的

3.2. 材料と方法

(A)材料、患者背景

(B)方法

(C)液状化検体細胞診(LBC)について

(D)細胞基準判定

(E)免疫染色評価

(F)統計学的評価

3.3. 結果

3.4. 考察

4 総括 . . . . . 28

5 文献 . . . . . 29

6 謝辞 . . . . . 35

7 図・表 . . . . . 36



## 1 はじめに

### 1-1. 肺癌の臨床学的特徴

肺癌は発生率、死亡率ともに上昇傾向で、2008年時点で、全世界の年罹患率は約160万人(男性109万人、女性51万人)、年死亡数は約140万人(男性95万人、女性43万人)である[1]。国内においても、肺癌の罹患率、死亡率は上昇しており、国立がん研究センターがん対策情報センターの発表によれば、2012年時点で、癌死亡数のうち肺癌死亡数は男性1位、女性2位である。肺癌の4大組織型としては腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、大細胞癌が挙げられる。昨今の禁煙や環境因子の改善により扁平上皮癌や小細胞癌の発生率は若干減少してきてはいるが、肺腺癌は増加の一途を辿り、今や肺癌の半数以上を占める[2]。肺癌は進行期で診断されることが多いため、肺癌の予後は総じて悪く、早期発見がきわめて重要である。特に肺腺癌は肺末梢に発生する事が多く、その診断には気管支鏡を用いた生検、擦過細胞診、洗浄細胞診などが行われるが必ずしも満足のいく診断効率が得られているわけではない。

### 1-2. 肺腺癌の分類

現在の日本の肺癌取扱い規約(第7版、2010)は、2004年のWHO分類に準拠しており、腺癌は①腺房型、②乳頭型、③細気管支肺胞上皮型(bronchioloalveolar carcinoma: BAC)、④粘液産生性充実型と、これら4組織型が混在する⑤混合型の計5組織型に分類されている。このほか、特殊型として高分化胎児型腺癌、膠様(コロイド)腺癌、粘液嚢胞腺癌、印環細胞癌、淡明細胞癌がある。

2004年のWHO分類における問題点は2つに集約される。まず、肺腺癌は通常、

多様性に富んでいるため、殆どが混合型と診断されることである。もう1つ問題としては BAC の位置づけである。BAC 以外の3型(腺房型、乳頭型、粘液産生性充実型)はいずれも肺胞構造を破壊しながら増殖する浸潤性の組織型であるに対して、BAC とは「既存の肺胞構築に沿った、肺胞上皮置換性増殖のみからなる腺癌で、間質や血管、胸膜浸潤がないもの」と定義されているように本来は非浸潤性の組織型を示すものであり、これらが同列に組み込まれていることは、肺腺癌の発生や進展を考えるうえで、好ましくない。また、これでは、野口らが「限局性細気管支肺胞上皮癌」と定義した予後良好な腫瘍と、「粘液産生性細気管支肺胞上皮置換癌：mucinous BAC」といった予後不良な腫瘍が混在することにもなる。

これらの問題をうけて、2011年にIASLC/ATS/ERSにより肺腺癌の新分類が提案された[3, 4](表1)。混合型肺癌という診断は廃止され、進行肺癌は「Invasive adenocarcinoma」となり、腫瘍の主体となる組織亜型(predominancy)を記載することとなった。組織亜型としては従来の4亜型①置換性増殖、②腺房型増殖、③乳頭状増殖、④充実性増殖に⑤微小乳頭状増殖が新たに追加され5亜型に分類された。なお新分類ではBACという言葉は廃止され、lepidic growth という診断名が採用された。Lepidic growth とは肺胞上皮置換性増殖を意味している。また今まで浸潤癌の組織亜型に入れられていた「BAC」の扱いも変わる事となり、新たに上皮内腺癌(Adenocarcinoma in situ: AIS)と微小浸潤性腺癌(Minimally invasive adenocarcinoma: MIA)の概念が新しく加えられた。AISは3cm以下でlepidic growth patternのみを示す腫瘍で、1995年に発表された野口分類[5]に当てはめるとtype A, Bに相当し、5年生存率は100%のものを指

す。一方、MIA は 5 年生存率がほぼ 100%である微少な浸潤巣を有する腺癌を想定した概念で、AIS と同様に 3cm 以下であること、浸潤巣の最大長径が 5mm を超えないものと定義されている。また Mucinous BAC については、経気道的転移を来しやすく予後が不良である点や、遺伝子学的な違いをふまえて、これらは非浸潤癌とはせず、「invasive mucinous adenocarcinoma」に包括されることとなった。

### 1-3. 肺癌の診断

肺癌の存在診断には、胸部 X 線、CT、MRI をはじめとする放射線診断が欠かせないが、最終診断には、喀痰細胞診、擦過細胞診、洗浄細胞診、経気管支的肺生検、経皮的肺針生検などの細胞・組織学的診断が欠かせない。つまり、何らかの方法で癌細胞、あるいは癌組織を採取して病理組織学的な確定診断を下すことになる。

放射線診断の技術の進歩に伴って GGO(ground-glass opacity)病変を含む胸部腫瘍の発見機会は増えてきているが、実際に、放射線診断で肺癌を疑う腫瘍の存在が確認されていても、同部から採取された材料の中に腫瘍細胞あるいは腫瘍組織が確認されないことは稀ではない。

一方で気管支鏡などの検査法は極めて侵襲的であり、複数回行うことは患者にとって大きな負担である。この場合、外科医は肺癌疑いのもと手術を行い、術中組織診断を行って確定診断せざるを得ない。現在、肺癌の組織診断率は 57-74%程度と報告されているが、細胞診断では 43-61%であり、特に末梢型肺癌や小型肺癌の診断率が低いことが問題である [6, 7]。血清学的診断としては

CEA, CYFRA, CA19-9 などの腫瘍マーカーが知られているが、特異度はともかくとして、感度は実用的とは言えず、最も感度のよい CYFRA で 41-65%程度であると報告されている[8]。

#### 1-4. Ovarian Cancer Immunoreactive Antigen domain containing 2 (OCIAD2)

肺腺癌では、複数の遺伝子変化の段階を経て腫瘍の進展や浸潤が起こるという多段階発癌モデルが広く受け入れられている(図 1)[9]。肺腺癌においては、まず、異型腺腫様過形成(Atypical adenomatous hyperplasia, 以下 AAH)が発生し、AAH のうち半数以上で EGFR(Epidermal growth factor receptor)の変異が加わり、上皮内腺癌(Adenocarcinoma in situ, AIS)へと進行する。その際、p16 が抑制しているアポトーシス機能の不活化などが起こり、さらに p53 の変異や 17p12-p13, 18p11, 11p11-p12 のヘテロ接合性喪失(loss of heterozygosity, LOH)など多様な遺伝子変化が加わることによって、浸潤癌へと発展・移行する。浸潤癌となってしまった時には、既に多くの遺伝子異常が積み重なっている状態であり、浸潤癌における遺伝子異常の発見では、早期発見・早期治療の恩恵を受けることができない。

そこで、より初期の段階で肺腺癌の悪性化に重要な遺伝子異常を探求する目的で、我々の研究室(筑波大学医学医療系 診断病理学)では、肺腺癌のうち非浸潤癌と早期浸潤癌での発現遺伝子の差異に注目し、これを網羅的に比較してきた[10-13]。そしてそのうち、非浸潤癌に比較して早期浸潤癌において有意に高発現している遺伝子の一つとして、Ovarian cancer immuno-reactive antigen

domain containing 2 (OCIAD2) を見い出した[14]。OCIAD2 とは OCIAD1 と高い相同性を示す遺伝子として同定され[15](図 2)、SOSui による蛋白質の 2 次構造予測によると、2 回膜貫通蛋白と考えられている(図 3)。OCIAD1 は卵巣癌患者の腹水中に存在する自己抗体が認識した卵巣癌の腫瘍細胞が発現する cDNA ライブラリ由来の遺伝子である[16](図 4)。OCIAD1 に関しては、Sengupta らの報告によると、転移巣を有する進行卵巣癌の患者において、原発巣に比べて転移先の組織で OCIAD1 がより高発現しており、癌細胞の接着や遊走に影響を及ぼし、転移巣の形成に関与していることが指摘されている[17]。また、Wang らによると OCIAD1 の発現は 18:1 リソフォスファチジル酸(LPA)の存在下で時間および量に依存して増加しており、OCIAD1 の高発現が化学療法への感受性に影響を及ぼしているとされ、OCIAD1 の阻害が再発をきたした卵巣癌での治療戦略となる可能性が示されている[18]。一方で、OCIAD2 に関する研究論文は昨今まで我々の研究室からでた 2 件のみ[14, 19]であったが、この数年の間に悪性腫瘍領域や神経疾患領域において、少なからず研究成果が発表されている[20, 21]。Zhang らは、生命情報学(バイオインフォマティクス)の技術を駆使した研究で、OCIAD2 は癌の上皮間葉移行のプロセスにおいて TGF- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ )やアンドロゲンレセプターによる制御を受けている可能性があるとして結論している。ただし彼らは、CLL(chronic lymphocytic leukemia)[22]や悪性胸膜中皮腫[23]、Glioblastoma[24]などで OCIAD2 発現が減少しているという報告を根拠として挙げながら、OCIAD2 が tumor suppressor gene であり、OCIAD2 の downregulation によって、TGF- $\beta$  を介した癌微小環境の形成に貢献しているという見解を示しており、実際、肝

細胞癌組織を用いた実験では、非腫瘍部に比較すると腫瘍部で OCIAD2 の発現が減少していることが示されている[21]。このほか、データベース上の見地から、OCIAD2 はメチル化によって発現の制御を受けているとも述べられている。また Han らは OCIAD2 の局在がミトコンドリアあるいはミトコンドリア小胞体接着点(Mitochondria-associated ER membrane: MAM)にあり、OCIAD2 はニカストリンと結合し、アミロイド前駆蛋白からアルツハイマー病初期の成因子として重要なアミロイドβ蛋白への分解を促進させるγセクレターゼの分泌を促進させると述べている[20]。

#### 1-5. 研究全体の目的

OCIAD2 はもともと卵巣癌特異抗原として単離された OCIAD1 と相同性を有する遺伝子であり[15]、OCIAD2 の発現は肺腺癌の悪性度の判定に有用なバイオマーカーなのではないかと考えた。

石山らは、OCIAD2 が肺腺癌の進行に伴って発現がまず遺伝子で、肺胞上皮置換性増殖を含む混合性腺癌においては OCIAD2 の発現は予後良好の因子であると結論しているが、彼らは Real-time quantitative reverse transcription PCR(以下 Real-time qRT-PCR)と in situ hybridization(以下 ISH)を用いた mRNA レベルでの検討を行っており、蛋白レベルでの解析は行っていない。また Real-time qRT-PCR については直径 2cm 以下の肺胞上皮置換性増殖する小型肺癌 19 例(Noguchi type A, B, C のみ)、ISH については肺胞上皮置換性増殖を含む混合性腺癌 56 例と、症例数が限られている[14]。

また Zhang ら[21]、Han ら[20]の新しい報告は、OCIAD2 の機能を理解するう

えでは貴重な情報ではあるが、Zhang らは OCIAD2 が癌で特異的に発現が亢進するという我々の研究室とは逆の立場をとっていることもあり、多数の症例を用い、この真偽を確かめる必要がある。

小型肺腺癌や肺胞上皮置換性増殖優位の腺癌のみならず進行癌をあわせた多数肺癌例に対して、OCIAD2 の発現(mRNA のみでなく蛋白レベルも含む)を確認し、その悪性度分類や生物学的な振る舞いとの関連がみられるかについて検討し(第 1 章)、OCIAD2 の肺腺癌に対するバイオマーカーとしての意義および臨床的応用の可否を明らかにすること(主に第 2 章)を目的に研究を行った。

## 2. 第1章 肺癌における OCIAD2 の発現解析

### 2-1. 目的

小型肺腺癌や肺胞上皮置換性増殖優位の腺癌のみならず進行癌をあわせた多数肺癌例に対して、OCIAD2 の発現(mRNA のみでなく蛋白レベルも含む)を確認し、その悪性度分類や生物学的な振る舞いとの関連がみられるかについて検討する。

### 2-2. 材料と方法

#### (A) 蛍光免疫染色

OCIAD2 の局在を詳細に評価する目的で、肺腺癌細胞株(LC2/ad)のセルブロックを用いた蛍光免疫染色を行った。1次抗体として120倍希釈した抗ラビット、OCIAD2 ポリクローナル抗体(Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)と800倍希釈した抗マウス、ミトコンドリアモノクローナル抗体(Abcam, USA)の2種類を用いた。1次抗体の反応時間は4°C over night とした。2次抗体として、1000倍希釈したAlexa Fluor® 555 標識抗ウサギ IgG 抗体(Cell Signaling Technology Japan, K.K., Tokyo, Japan)と1000倍希釈したAlexa Fluor® 488 標識抗マウス IgG 抗体(Cell Signaling Technology Japan, K.K., Tokyo, Japan)を室温で30分反応させた。洗浄を行った後に、1000倍希釈したHoechst 33342(Cell Signaling Technology Japan, K.K., Tokyo, Japan)にて核染色を行った。観察はHS オールインワン蛍光顕微鏡BZ-9000(Keyence Japan, Osaka, Japan)にて行った。



## (B) 肺癌手術症例を用いた免疫組織化学

### (i) 材料、患者背景

筑波大学附属病院にて 2000 年 4 月 1 日より 2005 年 3 月 31 日にかけて外科的切除された肺腺癌 126 例を対象とした。患者の臨床情報については匿名化したうえで、年齢、腫瘍の最大径、病期、病理学的 T 因子(Tumor factor)、N 因子(Node factor)、胸膜浸潤、血管侵襲、リンパ管侵襲、modified scar grade[25]、組織亜型、術前 CEA 値(ng/ml)、術前 CYFRA 値(ng/ml)、予後などの情報を収集した。腫瘍の病理学的 T 因子(Tumor factor)、N 因子(Node factor)、病期、及び、胸膜浸潤、血管侵襲、リンパ管侵襲の決定は、staging manual for thoracic oncology(2009)に準拠した[26]。浸潤性腺癌の分類については IASLC/ATS/ERS 2011 の新分類[3, 4]を用い、置換型(lepodic)、腺房型(acinar)、乳頭型(papillary)、微小乳頭型(micropapillary)、充実型(solid)の 5 つの組織亜型の最も優位な成分で各々の優位型に分類した。

また肺腺癌以外の組織型における染色性を評価する目的で、扁平上皮癌症例 12 例、大細胞癌 1 例、大細胞神経内分泌癌 2 例を選出した。いずれの材料についても全て術前に書面における包括同意を得た。

### (ii) 方法

免疫組織化学の方法として、まず、10%ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより、3 $\mu$ m の切片を作成した。切片は脱パラフィン後、10nM クエン酸バッファー(pH6.0)を用いて 121 $^{\circ}$ C、10 分間の加熱処理にて抗原の賦活化を行ったのち、内因性ペルオキシターゼブロックのため Dako REAL<sup>TM</sup>

Peroxidase-Blocking Solution(Dako, Copenhagen, Denmark)を室温で 5 分反応させたのち、120 倍希釈した抗ラビット、OCIAD2 ポリクローナル抗体 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)を加えて室温で 30 分反応させた。2 次抗体としてポリマー法による増感作用を利用した Envision+Dual Link System-HRP(Dako)を室温 30 分で反応させたのち、DAB+Liquid System(Dako)を室温で 5 分反応させることで可視化した。純水にて洗浄後、ヘマトキシリンによる核染色を行い封入した。これらの免疫組織化学は histostainer (Nichirei Biosciences)により行った。

### (iii)免疫染色評価

染色性については、肺腺癌細胞株の蛍光免疫染色の結果に基づき、胞体内に顆粒状の染色性が得られたものを染色陽性と判定した。染色強度については、気管支上皮細胞より強い染色性を示す腫瘍細胞を染色陽性と定義し、陽性面積(0-100%)と陽性強度(0:全く染色性なし～わずかな染色性, 1 気管支上皮細胞よりやや強い, 2 気管支上皮細胞より明らかに強い)(図 5)を掛け合わせたものを免疫染色スコア(0-200)とし、臨床学的特徴との関連性について検討した。免疫染色スコアの算定方法については、村田らの方法[27]に従って行った。なお、免疫染色のスコア化は、筆者 1 人で行ったが、免疫染色の評価を筆者 1 人で行うにあたり、10 例の症例を無作為に抽出し筆者以外の経験ある病理医に判定を依頼し、免疫染色スコアがほぼ一致することを確認した。

### (iv)統計学的評価

OCIAD2 の免疫組織化学による発現解析での統計解析は、SPSS 11.5J software package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)を用いて行った。生存曲線は、無再発生存(disease free survival: DFS)を使用し、Kaplan-Meier 法を用いて解析、Running log-rank test を用いて OCIAD2 の発現における高発現群、低発現群の 2 群における p 値が最小となるような基準を検討した。DFS は再発日、または最終外来受診日と手術日より算出し、他病死の影響を除くため DFS を使用した。臨床病理学的因子との相関を調べるために、 $\chi^2$  乗検定または Fisher's exact 検定を使用し、数量化される指標は t 検定を用いた。無再発生存に寄与する独立予後因子の検討には、logistic 解析による単変量解析を用いた。統計学的優位差は  $p < 0.05$  に設定した。

(C) Real-time quantitative reverse transcription PCR (以下 Real-time q RT-PCR)

(i) 材料、患者背景

筑波大学附属病院あるいは茨城東病院にて外科的切除された肺腺癌 12 例(上皮内腺癌 3 例含む)を対象とした。いずれの材料についても全て術前に書面における包括同意を得た。

(ii) 方法

まず 12 例の腫瘍部と非腫瘍部について、凍結組織標本から mirVanamiRNA isolation kit, Ambion total を用いて total RNA を抽出した。High capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, USA) を用いて逆

転写酵素反応により cDNA を合成し、この cDNA を鋳型として OCIAD2 に特異的な 2 種類のプライマー(図 6)(Takara Bio, Tokyo, Japan)を用い、内因性コントロールとしては 18S rRNA を使用した。Quantitative Real-time PCR は、インターカレーター法(図 7)で SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real time; Quantitative Real-time PCR)を使用し、ABI 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA)を用いて行った。PCR のサイクルは 95°C で 30 秒熱変性、95°C 5 秒、60°C 31 秒のサイクルを 40 サイクル行った。PCR を行った後、18S rRNA で補正し、OCIAD2 相対値として算出した。

### (iii)免疫組織化学との相関性

また mRNA 発現と蛋白発現に関連性があるのかを検索する目的で、12 例のうち 6 例については免疫組織化学を行い、Real time q-RT PCR の OCIAD2/18S rRNA 値と免疫染色スコア(0-200)との相関をピアソンの積率相関検定を用いて検討した。

## 2-3. 結果

### (A) 蛍光免疫染色

肺腺癌細胞株(LC/ad2)の蛍光免疫染色において、OCIAD2 は胞体内顆粒状の陽性像を示し、ミトコンドリアの陽性像とほぼ一致した(図 8)。以上の結果から OCIAD2 の免疫組織染色においては細胞質内に顆粒状に染色される場合を陽性と判断することにした。

## (B) 肺癌手術症例の免疫組織化学

126 例の肺腺癌について弱い陽性像を含めると全例に OCIAD2 が陽性となった。OCIAD2 は、正常肺組織では、気管支上皮細胞に極めて弱い染色性が見られるのみで、正常の肺胞上皮細胞には染色性が見られなかったが(図 9A)、上皮内腺癌(図 9B)、微少浸潤性腺癌(図 9C)、浸潤性腺癌(図 9D)と浸潤がすすむにつれて染色性が増していた。上皮内腺癌(N=13)、微少浸潤性腺癌(N=7)、浸潤性腺癌(N=106)について免疫染色スコアの平均値を算定したところ、それぞれ 46.2, 85.7, 125.9 であり、OCIAD2 の免疫染色スコアは浸潤とともに上昇していた(図 10)。組織亜型(subtype)別で平均値を比較したところ、充実型 (solid)87.6、置換型 (lepidic)122.5、腺房型 (acinar)155.7、乳頭 (papillary)161.3 であり、充実型を優勢とする腺癌はそのほかの組織亜型の腺癌に比べて有意に免疫染色スコアが低かった。(p=0.005)(図 9E)(図 10)

全症例を対象とした Running log-rank 検定では免疫染色スコア 110 以上を OCIAD2 発現高発現群とすると p 値が最小値となった。OCIAD2 高発現群、低発現群の 2 群で Kaplan-Meier 法による生存分析を行ったところ、無病生存率(DFS)は p=0.0053 と有意差を認めた。(図 11A)。さらに高発現群と低発現群で単変量解析を行ったところ、腫瘍の最大径(p=0.001)、病期(p=0.031)、病理学的 T 因子(Tumor factor)(p=0.001)、リンパ管侵襲(p=0.001)、modified scar grade[25](p=0.003)、組織亜型(p=0.001)、術前 CYFRA 値(p=0.015)において有意差を認めた(表 2A)。しかし低発現群のなかには上皮内腺癌 13 例

全例と微小浸潤性腺癌 5 例が含まれていることから、上皮内腺癌、微小浸潤性腺癌を除く浸潤性腺癌のみでの検討を行ったところ、免疫染色スコア 110 以上で  $p=0.081$  と最低値を示すも生存率に有意差が見いだされなかった(図 11B)。そこで、充実型優位とする浸潤性腺癌で免疫染色スコアの平均値が有意に減少することを考慮し、充実型を除く浸潤性腺癌で Running log-rank 検定を行ったところ、免疫染色スコア 80 以上を高発現群とすると  $p=0.0085$  と最低値を示し、免疫染色スコア高発現群は低発現群に比較して有意な生存率低下を示すことがわかった(図 11C)。高発現群と低発現群で単変量解析を行ったところ、腫瘍の最大径( $p=0.003$ )、病期( $p=0.032$ )、病理学的 T 因子 (Tumor factor)( $p=0.001$ )、modified scar grade[25]( $p=0.013$ )、組織型 ( $p=0.003$ )、術前 CYFRA 値( $p=0.038$ )において有意差を認めた(表 2B)。さらに、充実型のみを対象とした Running log-rank 検定では免疫染色スコア 70 以上を高発現群とすると  $p=0.14$  と最低値を示すものの有意差がないという結果であったが、免疫染色スコア 70 以上の高発現群は低発現群に比較して予後が良いという、その他の組織型とは逆転した結果を示した(図 11D)。

扁平上皮癌においては、12 例中 11 例で免疫染色陽性となったが、腺癌と比較すると染色性が弱く、染色スコアの平均値は 46.3 であった。大細胞癌や大細胞神経内分泌癌においても染色性が確認されたが弱い染色性であった。

(図 12)

### (C) Real-time qRT-PCR

12 例中 11 例において、腫瘍部の OCIAD2 相対値は非腫瘍部に比較して高値を示した(図 13A)。浸潤癌腺癌腫瘍部、上皮内腺癌腫瘍部、非腫瘍部の OCIAD2/18S rRNA 値(中央値)はそれぞれ 0.715, 0.328, 0.163 であり、浸潤とともに OCIAD2 の相対値が増加していた(図 13B)。浸潤癌浸潤部は非腫瘍部に比較して中央値で 4.39 倍発現が亢進していることになる。また Real-time qRT-PCR を行った 12 例のうち 6 例で免疫組織化学を行ったところ、OCIAD2/18S rRNA 値と免疫染色スコアには強い相関性が見られた( $r=0.834$ )(図 14)。

#### 2-4. 考察

今回、126 例の手術症例を用いた免疫組織化学による OCIAD2 発現の検討で、正常肺組織では発現がないか、あってもわずかな発現を示すのみであったが、上皮内癌では正常肺組織と同様、あるいはやや強い発現がみられ、浸潤性腺癌においてはその殆どで発現が見られるようになった(図 9, 10)。Real-time qRT-PCR では、浸潤性腺癌腫瘍部では非腫瘍部に比較して、4.39 倍の発現があることが示された(図 13)。さらに、6 例ではあるが、免疫染色と Real-time qRT-PCR に相関関係があることも確認された(図 14)。

肺腺癌 126 例全例を対象にした場合、OCIAD2 の免疫染色スコアが高発現群で、予後が有意に悪くなるという結果が得られた(図 11A)。浸潤性腺癌のみで同様に生存曲線を書くと、OCIAD2 高発現群で、予後が悪くなる傾向に変わりなかったが、有意差は得られなかった(図 11B)。しかしながら、興味深いことに、浸

潤性腺癌より充実型を除いた場合には、**OCIAD2** 高発現群で有意に予後が悪くなるという結果が得られ(図 11C)、さらに充実型のみで解析すると有意差はなかったものの **OCIAD2** 高発現群で予後が良くなる傾向が見られた(図 11D)。つまり、①分化型腺癌では **OCIAD2** 高発現が予後不良マーカーとなる可能性があり、②低分化型腺癌つまり充実型浸潤性腺癌においては **OCIAD2** 発現が予後に影響しないことが示唆された。

もともと、**OCIAD2** は非浸潤癌と早期浸潤癌の間での発現の差異がある遺伝子として見つけ出されてきた遺伝子であり、①の結果は妥当とも言える。

②を説明する理由として、充実型浸潤性肺腺癌は、概してその他の肺腺癌の組織亜型に比較すると予後が悪く [28-30]、既に多くの遺伝子異常が積み重なっていることが推定され、致死的な遺伝子異常が背景にあるがゆえ **OCIAD2** のような初期浸潤化に関わる遺伝子の多寡は予後に影響しない可能性が考えられる。このほかにも、腔を形成する腫瘍とそうでない腫瘍では、もとより遺伝子発現パターンが違う可能性も考えられる。

図 14 に示すように蛋白レベルでの発現と mRNA レベルでの発現が相関する結果が得られたが、一方で石山らは **OCIAD2** が肺腺癌の進行に伴って発現がまず遺伝子で、肺胞上皮置換性増殖を含む混合性腺癌においては **OCIAD2** の発現は予後良好の因子であると主張しているが [14]、これは今回の結果とは、相反している。しかし、彼らが対象とした腺癌に低分化な腺癌が多く含まれている可能性が高く、実は、今回の結果とも矛盾がない可能性もあり、組織亜型と **OCIAD2** 発現の関係に関しては今後さらに詳細に解析していく必要がある。



OCIAD2 は当初、肺腺癌のマーカーとして見いだされた遺伝子ではあるが、今回の検討で腺癌のみならず、扁平上皮癌や、大細胞癌、大細胞神経内分泌癌においても、弱～中等度の OCIAD2 発現が確認された(図 12)。充実型浸潤性腺癌や扁平上皮癌、大細胞癌、大細胞神経内分泌癌では低発現症例が多く認められた。特に肺腺癌では初期浸潤癌からほぼ 100%の症例で陽性になり、OCIAD2 が肺癌全体をカバーする優れたバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。石山らの論文[14]の Figure1 を参照すると、浸潤癌として用いたサンプルが微小浸潤性腺癌(MIA)であった可能性があるため、OCIAD2 は、より初期の悪性化に関わっていることが予測される。

Zhang らは、OCIAD2 は肝細胞癌組織では正常組織に比較して発現が下がると主張しており[21]、他にも CLL(chronic lymphoblastic lymphoma)[22]や悪性胸膜中皮腫[23]や glioblastoma[24]等で発現が下がるとの報告があるが、我々が発表してきた研究結果[14, 19]と今回の結果を合わせれば、少なくとも、卵巣と肺においては、腫瘍部で発現が高くなる遺伝子と考えられる。遺伝子によっては腫瘍の原発部位や組織型によって発現の増減が変化するという現象はしばしば見受けられるので、OCIAD2 もその1つである可能性は十分に考えられる。

OCIAD2 は 154 アミノ酸で構成される分子量 16954Da の蛋白質で、蛍光免疫細胞化学、免疫組織化学とも胞体内、顆粒状の染色性を示し、蛍光免疫細胞化学では OCIAD2 とミトコンドリアがほぼ一致した(図 8)。Han らは、OCIAD2

の局在は、ミトコンドリアと Mitochondria-associated ER Membrane(MAM)であると主張しているが[20]、MAM とはミトコンドリアと小胞体の接着点のことを指す。ミトコンドリアと小胞体は可逆的に会合と解離を繰り返しており、MAM は、脂質の生合成や小胞体ミトコンドリア間のカルシウム伝達などに重要な役割を果たしていることが知られている [31-33](図 13)。Han によれば、OCIAD2 はアミロイドβ 蛋白への分解を促進させるγセクレターゼの分泌を促進させると報告しているが[20]、OCIAD2 の正確な機能の全貌について十分に言及されたとは言えない。OCIAD2 がミトコンドリアあるいは MAM に局在することからは、OCIAD2 はエネルギー代謝あるいは、アポトーシス、ファゴサイトーシスなどの機能に関わっている可能性がある。また OCIAD2 発現亢進の結果、何らかの機能異常が起こり、腫瘍化が導かれている可能性もあるが、腫瘍化による結果として OCIAD2 発現が亢進している可能性もある。以上より OCIAD2 が機能遺伝子でないという可能性があるが、いずれにしても、OCIAD2 の働きや機能について、現状のところ、未知の部分が多く、今後詳細な検討が必要である。具体的には、肺癌細胞株への Si RNA 導入前後の遺伝子プロファイルを詳細に検討することを予定している。

### 3. 第2章 臨床への応用(細胞診材料への応用)

#### 3-1.目的

第1章の結果、つまり殆どの肺腺癌において OCIAD2 の発現が見られるという結果から、OCIAD2 が肺癌診断において感度の高いバイオマーカーとして利用できるのではないかと考えた。肺癌の確定診断に気管支鏡検査は欠かせないが、経気道的肺生検や経気道的気管支生検あるいは擦過細胞診を行ったのち、通常、気管支洗浄液が採取される。生検に比較すると細胞診の診断率は一般的に低いとされているが、時として細胞診検体のみしか得られない場合があるため、細胞診の低診断率が問題となる。そこで、比較的残検体が多く得られる気管支洗浄液について液状化検体細胞診(Liquid-based cytology: LBC)[34-36]を作成し OCIAD2 の免疫細胞化学を行うことで、診断率の上昇を見込める可能性について検討した。

#### 3-2.材料と方法

##### (A)材料、患者背景

最終的に病理組織学的に原発性肺癌であると確定している 106 例の気管支洗浄液検体について後ろ向き実験を行った。106 例の気管支洗浄液検体は 2012年7月から2013年7月の期間に筑波大学附属病院にて得られた材料である。うち 57 例が腺癌、23 例が扁平上皮癌、6 例が小細胞癌、残り 20 例が他のタイプの癌であった。患者背景は 37 歳～89 歳で、平均年齢は 69 歳であった。男性は 65 人で女性は 41 人であった。また陰性コントロールとして同時期に採取された良性疾患における気管支洗浄液検体 30 例を選出した。

すべての患者に対して、サンプルを得る前に書面での許可を得た。

## (B) 方法

106 例の気管支洗浄液の余剰分について、液状化検体細胞診(Thin-layer Advanced Cytology Assay System : TACAS™)(Medical and Biological Laboratories Co. Ltd, Nagoya, Japan)[37]を 2 枚作成した。1 枚はパパニコロウ染色を行い、もう 1 枚は免疫染色用とした。免疫染色用のスライドについて、10nM クエン酸バッファー (pH6.0) を用いて 121°C、10 分間の加熱処理にて抗原の賦活化を行ったのち、内因性ペルオキシターゼブロックのため Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution (Dako, Copenhagen, Denmark)を室温で5分反応させたのち、120倍希釈した抗ラビット OCIAD2 ポリクローナル抗体(Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)を加えて室温で 30 分反応させた。2 次抗体として Envision+Dual Link System-HRP (Dako)を室温 30 分で反応させたのち、DAB+Liquid System(Dako)を室温で 3 分反応させることで可視化した。純水にて洗浄後、ヘマトキシリンによる核染色を行い封入した。これらの免疫細胞化学は histostainer (Nichirei Biosciences)により行った。方法は第 1 章の手術材料における免疫組織化学とほぼ同様で、DAB 発色時間のみ 5 分から 3 分に変更を行った。

## (C) 液状化検体細胞診(Liquid-based cytology: LBC)について

従来の直接塗抹法(従来法)では、細胞採取後スライドガラスへ細胞を塗抹し固定し、その後検査室において、染色から検鏡、診断が行われていたが、液

状化細胞診(Liquid-based cytology: 以下 LBC 法)では、細胞を採取後、専用の保存液バイアルへ細胞を入れ、専用の機器を用いて細胞塗抹を行う。

従来法では、臨床医は細胞採取から固定まで行うのに対し、LBC 法では、臨床医は細胞採取と細胞浮遊液の作製のみを行うことになる。よって、LBC 法では標本の作製が均一化・標準化されることになり、その結果として不適正標本が減少することが期待される。LBC 法は一度細胞浮遊液を作製すると、細胞判定基準用標本の作製に加えて同一検体から、遺伝子検査や免疫細胞化学等の検索を行うことが可能である。一方、標本作製には専用の機器や保存液等の消耗品が必要であり、従来法に比較して標本作製の手間や費用がかかるというデメリットはある。

また従来法ではスライドガラス全面に細胞が塗抹されるため、ガラス全体を検鏡する必要があり、細胞が重なり、分布が不均一になる傾向があったが、LBC 法では細胞は限局した円形範囲に塗抹されることとなり、細胞は重なりが少なく、より均一なため評価が簡便であると言われている。ただし、LBC 法による細胞像は従来法と若干異なり、検鏡に際しては熟練を必要とする [38]。

LBC 法は、1980 年代後半に細胞診精度向上を図る目的で、婦人科領域において推進された方法であるが、近年、呼吸器領域を含め他領域にも運用が行われつつあり、特に、粘液や血液の含有が多い呼吸器領域の検体において、LBC 法を用いるメリットは大きい。最近、気管支洗浄液あるいは気管支擦過検体などの細胞診検体においても、LBC 法によって EGFR や KRAS mutation の検索が可能となってきた [39]。

#### (D)細胞判定基準

肺癌取扱い規約第 7 版に準じて、陰性(negative), 偽陽性(suspicious), 陽性(positive)に区分した。疑陽性(suspicious)とは、悪性腫瘍の疑われる異型細胞あるいは良性悪性境界病変に由来する異型細胞を認めると定義されており、これに準拠した。判定不能材料については 106 例より除外した。

#### (E)免疫染色評価

気管支上皮細胞の染色性を基準とし、それより強い染色性について染色陽性と判断した。1 個でも強い染色性を示す細胞が存在すれば染色陽性と判断した。

#### (F)統計学的評価

細胞判定と免疫細胞化学の関連性について、Fischer's exact test を用いて有意差検定を行った。有意水準は  $p<0.05$  とした。

### 3-3.結果

106 例の細胞判定基準は陰性 41 例、疑陽性 13 例、陽性 52 例であった。細胞判定基準別の OCIAD2 陽性例について代表例を図 16 に示すとともに、細胞判定基準別 OCIAD2 の免疫染色結果について表 3 に示す。細胞判定基準陽性 52 例においては 37 例で OCIAD2 が陽性であったが、細胞基準疑陽性例 13 例中 8 例、細胞基準陰性例 41 例中 6 例においても OCIAD2 陽性細胞が認められた。

細胞診基準陽性 52 例のうち、腺癌では 25 例中 19 例で陽性、扁平上皮癌では 11 例中 6 例陽性、小細胞癌では 5 例中 5 例陽性、その他の組織型では 11 例中 7 例陽性という結果であった。細胞診に OCIAD2 の免疫細胞化学を追加した際、感度が 49.1%から 62.3%と有意に上昇した( $p=0.036$ )(図 17)。陰性コントロールとして用いた 30 例においては(30 例の内訳について表 4 に示す)、2 例において OCIAD2 が陽性となった。OCIAD2 陽性細胞は肺胞上皮細胞あるいはマクロファージと考えられ、形態学的に区別は可能であった。

#### 3-4. 考察

LBC 法を用いることで、免疫組織化学とほぼ同様の方法で、OCIAD2 の免疫細胞化学的解析を行うことができた。従来法で免疫細胞化学を行う際には、カバーガラスおよびマリノールを除去する必要がある細胞転写法を用いる必要があったが、LBC 法であれば、同一検体の余剰分を用いることで、簡便に免疫細胞化学を行うことが可能であった。OCIAD2 に限らず、組織検体の得られない症例において、細胞診検体で簡便に免疫細胞化学が行えることは大きなメリットである。

腺癌以外の組織型でも OCIAD2 の免疫組織化学的な発現が見られることについては第 1 章で確認されているが(図 12)、肺腺癌のみならず、扁平上皮癌や小細胞癌、その他組織型においても OCIAD2 の免疫細胞化学的な発現が確認された(表 3)。本研究の目的で述べたように腫瘍に依っては OCIAD2 の発現低下がみられるとの報告もあるが[21]、我々の研究室の今までの研究結果[14, 19]と今回の研究結果からは、少なくとも肺癌と卵巣腫瘍では OCIAD2 の発現上昇がある

ことが示されており、気管支洗浄液のほかにも、腹水や胸水などの細胞診検体を用いた腫瘍のスクリーニングや同定に OClAD2 遺伝子の発現変化が利用できる可能性がある。

細胞判定基準陽性の肺腺癌については、25 例中 19 例で免疫染色陽性であり(表 3)、第 1 章の肺腺癌手術材料の免疫組織化学の結果と比較すると陽性率がやや低くなっていた。免疫組織化学、免疫細胞化学とも、気管支上皮細胞の染色性を基準としたが、免疫組織化学では気管支上皮細胞より染色性のやや強いものを染色強度 1, 明らかに強いものを染色強度 2 と定義したのに対して、免疫細胞化学では気管支上皮細胞より染色性の明らかに強いものを免疫染色陽性と定義した。実際、免疫染色陰性であった細胞判定基準陽性の肺腺癌 6 例についても、5 例においては癌細胞に気管支上皮細胞とほぼ同等かやや強い染色性が確認された。ただ、気管支上皮細胞とほぼ同等かやや強い染色性について免疫染色陽性と定義すると、感度はもとより特異度が極めて低下するため、気管支上皮と比較して明らかに強い染色性を示すものに限定することとした。よって今回の細胞を用いた解析では第 1 章の組織を用いた解析結果より低い陽性率が得られたものと考えられる。またこの結果は、免疫染色陰性であった細胞判定基準陽性の肺腺癌 6 例のうち 3 例が低分化な腺癌であり、充実型の浸潤性腺癌では免疫染色スコアが有意に減少したという第 1 章の結果とも合致した。気管支上皮細胞より明らかに染色性の強い細胞を免疫染色陽性とする厳格な免疫染色判定基準においても、細胞判定基準陰性症例の 41 例中 6 例、細胞判定基準疑陽性症例 13 例中 8 例で免疫染色陽性細胞が得られた(図 16)(表 3)。石山らの研究結果



[14]や第1章の結果を踏まえると、免疫染色陽性細胞は癌細胞である可能性が非常に高いと考える。特に細胞判定基準疑陽性症例における免疫染色陽性という結果は、癌を強く疑う根拠となりうる。陰性コントロールとして用いた30例において、2例で免疫染色陽性と判定されたが、マクロファージあるいは腫大した肺胞上皮と考えられ、形態学的に癌細胞との区別が可能であった。

細胞診断に OClAD2 の免疫細胞化学を追加することで感度が有意に上昇する ( $p=0.036$ ) ことから、スクリーニング時に OClAD2 の免疫染色を行うことで、スクリーニングの簡便化や短時間化、見落としの防止に繋がることが期待される。

以上、2章の内容については *Cytopathology* に掲載予定。[40]

#### 4.総括

第1章では、肺においては、mRNA レベル、蛋白レベルともに、腺癌腫瘍部では高頻度にかつ有意な OCIAD2 の発現上昇が見られ、蛋白レベルの検討で分化型腺癌において OCIAD2 が予後不良マーカーとなることが明らかとなった。肺腺癌では強弱があるものの全例に OCIAD2 の発現がみられ、このほか肺扁平上皮癌や大細胞癌、大細胞神経内分泌癌でも弱いながら免疫組織化学的な発現がみられたことから、OCIAD2 は肺癌を検出する感度の良いバイオマーカーとなる可能性が示された。

第2章では、肺癌を対象に細胞診材料で OCIAD2 のバイオマーカーとしての有用性があるのかどうかを検討した。気管支洗浄液の液状化細胞診検体を用いた OCIAD2 の免疫細胞化学により、特異度がわずかに減少するものの癌の特定という意味で、有意な感度上昇がみられた。OCIAD2 は細胞診材料において感度の高いマーカーとして利用できることが示唆された。

現在のところ、OCIAD2 の機能については推測の域を出ず、今後検討の余地があるが、OCIAD2 の局在からは代謝異常あるいはアポトーシス、ファゴサイトーシス等の細胞死に関与することが予測される。今後、細胞株などを用いた OCIAD2 過剰発現実験あるいは Si RNA 導入によるノックダウン実験で OCIAD2 の機能を明らかにしていきたいと考えている。

## 5.文献

1. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
2. Sawabata, N., et al., *Japanese lung cancer registry study of 11,663 surgical cases in 2004: demographic and prognosis changes over decade*. J Thorac Oncol, 2011. **6**(7): p. 1229-35.
3. Travis, W.D., et al., *International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society: international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma: executive summary*. Proc Am Thorac Soc, 2011. **8**(5): p. 381-5.
4. 佐藤泰樹、南優子、野口雅之, *肺癌の新しい病理組織分類*. 医学のあゆみ, 2012. **240** 卷 **13** 号: p. 1041-1044.
5. Noguchi, M., et al., *Small adenocarcinoma of the lung. Histologic characteristics and prognosis*. Cancer, 1995. **75**(12): p. 2844-52.
6. Rivera, M.P., A.C. Mehta, and M.M. Wahidi, *Establishing the diagnosis of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines*. Chest, 2013. **143**(5 Suppl): p. e142S-65S.
7. Rivera, M.P. and A.C. Mehta, *Initial diagnosis of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition)*. Chest, 2007. **132**(3 Suppl): p. 131S-148S.
8. Pujol, J.L., et al., *Cyfra 21-1, neuron specific enolase and prognosis of*

- non-small cell lung cancer: prospective study in 621 patients. Lung Cancer, 2001. 31(2-3): p. 221-31.*
9. Noguchi, M., *Stepwise progression of pulmonary adenocarcinoma--clinical and molecular implications. Cancer Metastasis Rev, 2010. 29(1): p. 15-21.*
  10. Shiba-Ishii, A., et al., *High expression of stratifin is a universal abnormality during the course of malignant progression of early-stage lung adenocarcinoma. Int J Cancer, 2011. 129(10): p. 2445-53.*
  11. Sakashita, S., et al., *Overexpression of immunoglobulin (CD79a) binding protein1 (IGBP-1) in small lung adenocarcinomas and its clinicopathological significance. Pathol Int, 2011. 61(3): p. 130-7.*
  12. Ishii, A., et al., *Increased cytoplasmic S100A6 expression is associated with pulmonary adenocarcinoma progression. Pathol Int, 2009. 59(9): p. 623-30.*
  13. Kobayashi, H., et al., *Expression of the GA733 gene family and its relationship to prognosis in pulmonary adenocarcinoma. Virchows Arch, 2010. 457(1): p. 69-76.*
  14. Ishiyama, T., et al., *OCIA domain containing 2 is highly expressed in adenocarcinoma mixed subtype with bronchioloalveolar carcinoma component and is associated with better prognosis. Cancer Sci, 2007. 98(1): p. 50-7.*
  15. Strausberg, R.L., et al., *Generation and initial analysis of more than*

- 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(26): p. 16899-903.
16. Luo, L.Y., A. Soosaipillai, and E.P. Diamandis, *Molecular cloning of a novel human gene on chromosome 4p11 by immunoscreening of an ovarian carcinoma cDNA library.* Biochem Biophys Res Commun, 2001. **280**(1): p. 401-6.
  17. Sengupta, S., et al., *Ovarian cancer immuno-reactive antigen domain containing 1 (OCIAD1), a key player in ovarian cancer cell adhesion.* Gynecol Oncol, 2008. **109**(2): p. 226-33.
  18. Wang, C., et al., *Role of the 18:1 lysophosphatidic acid-ovarian cancer immunoreactive antigen domain containing 1 (OCIAD1)-integrin axis in generating late-stage ovarian cancer.* Mol Cancer Ther, 2010. **9**(6): p. 1709-18.
  19. Nagata, C., et al., *Increased expression of OCIA domain containing 2 during stepwise progression of ovarian mucinous tumor.* Pathol Int, 2012. **62**(7): p. 471-6.
  20. Han, J., et al., *OCIAD2 activates gamma-secretase to enhance amyloid beta production by interacting with nicastrin.* Cell Mol Life Sci, 2013.
  21. Zhang, R., et al., *Pathway bridge based multiobjective optimization approach for lurking pathway prediction.* Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 351095.

22. Kulis, M., et al., *Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia*. Nat Genet, 2012. **44**(11): p. 1236-42.
23. Gueugnon, F., et al., *Identification of novel markers for the diagnosis of malignant pleural mesothelioma*. Am J Pathol, 2011. **178**(3): p. 1033-42.
24. Noushmehr, H., et al., *Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma*. Cancer Cell, 2010. **17**(5): p. 510-22.
25. Maeshima, A.M., et al., *Modified scar grade: a prognostic indicator in small peripheral lung adenocarcinoma*. Cancer, 2002. **95**(12): p. 2546-54.
26. Goldstraw, P., *The 7th Edition of TNM in Lung Cancer: what now?* J Thorac Oncol, 2009. **4**(6): p. 671-3.
27. Murata, Y., et al., *ECT2 amplification and overexpression as a new prognostic biomarker for early-stage lung adenocarcinoma*. Cancer Sci, 2014. **105**(4): p. 490-7.
28. Warth, A., et al., *The novel histologic International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification system of lung adenocarcinoma is a stage-independent predictor of survival*. J Clin Oncol, 2012. **30**(13): p. 1438-46.

29. Russell, P.A., et al., *Does lung adenocarcinoma subtype predict patient survival?: A clinicopathologic study based on the new International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary lung adenocarcinoma classification.* J Thorac Oncol, 2011. **6**(9): p. 1496-504.
30. Yoshizawa, A., et al., *Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases.* Mod Pathol, 2011. **24**(5): p. 653-64.
31. Hayashi, T., et al., *MAM: more than just a housekeeper.* Trends Cell Biol, 2009. **19**(2): p. 81-8.
32. Pinton, P., et al., *Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca<sup>2+</sup> transfer in the control of apoptosis.* Oncogene, 2008. **27**(50): p. 6407-18.
33. Fujimoto, M. and T. Hayashi, *New Insights into the Role of Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane.* International Review of Cell and Molecular Biology, Vol 292, 2011. **292**: p. 73-117.
34. Weynand, B., et al., *A new, liquid-based cytology technique.* Acta Cytol, 2003. **47**(2): p. 149-53.
35. Bergeron, C. and F. Fagnani, *Performance of a new, liquid-based*

- cervical screening technique in the clinical setting of a large French laboratory. Acta Cytol, 2003. 47(5): p. 753-61.*
36. Hoda, R.S., *Non-gynecologic cytology on liquid-based preparations: A morphologic review of facts and artifacts. Diagn Cytopathol, 2007. 35(10): p. 621-34.*
37. Kubushiro, K., et al., *Newly developed liquid-based cytology. TACAS: cytological appearance and HPV testing using liquid-based sample. Hum Cell, 2011. 24(3): p. 115-20.*
38. 久布白兼行, *液状化検体細胞診. 日産婦誌, 2010. 62 卷 9 号: p. N194-N199.*
39. Malapelle, U., et al., *EGFR mutations detection on liquid-based cytology: is microscopy still necessary? J Clin Pathol, 2012. 65(6): p. 561-4.*
40. Itoguchi, N., et al., *Immunocytochemical staining for stratifin and OCIAD2 in bronchial washing specimens increases sensitivity for diagnosis of lung cancer. Cytopathology, 2014.*



## 6.謝辞

研究を進めるにあたり、常に熱心かつ丁寧なご指導を賜りました、筑波大学医学医療系 野口雅之教授に厚く御礼申し上げます。また研究に関して多大なご指導、ご助言を頂きました筑波大学診断病理学研究室の皆様、心より感謝いたします。本研究に際して、特に技術的な面において、多くのご理解、ご協力を頂きました筑波大学病院病理部 古屋周一郎氏をはじめ、病院病理部職員の皆様方に深く御礼申し上げます。

7.図・表

図1 肺腺癌における多段階発癌 文献[9]より

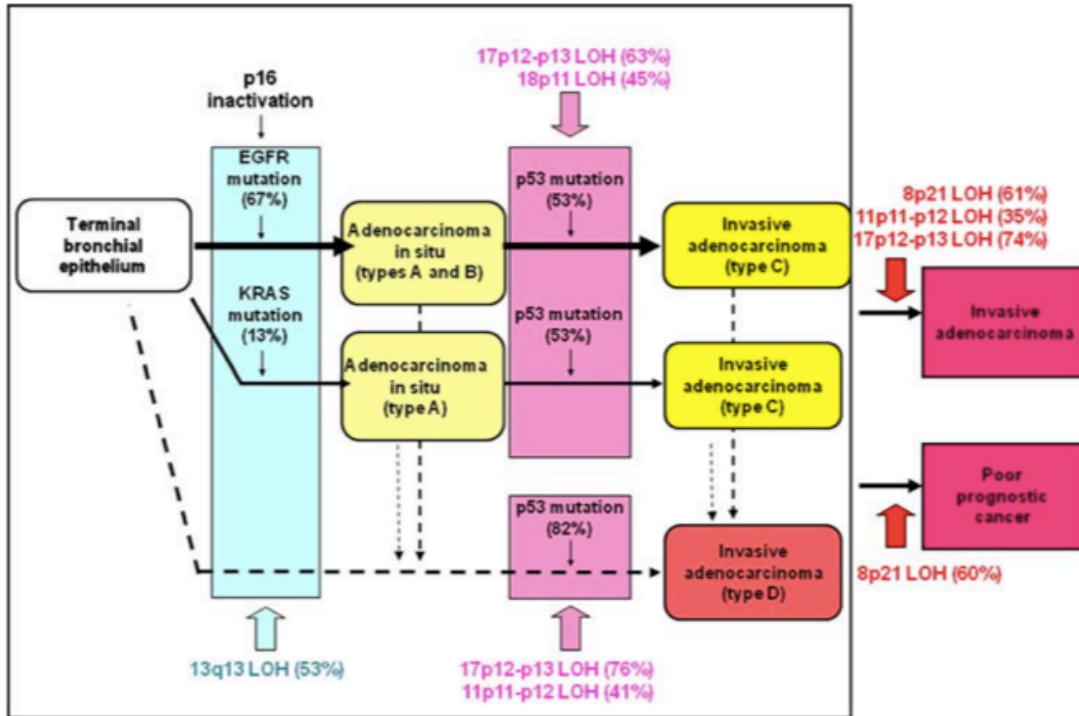


図2 OCIAD1、OCIAD2 の遺伝子配列(Blast の検索による。)

上段が OCIAD2、下段が OCIAD1 で、41%の相同性を有する。

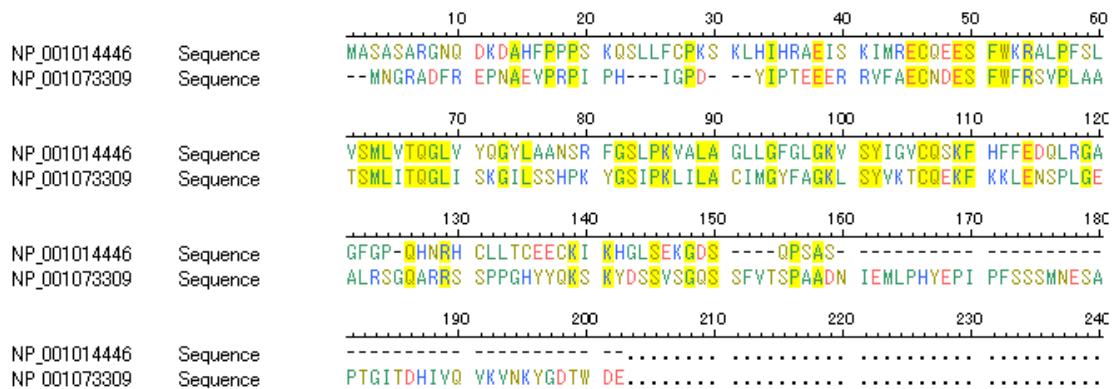


図3 SOSuiにより予測される OCIAD2 の立体構造図

OCIAD2 は2回膜貫通蛋白と考えられている。

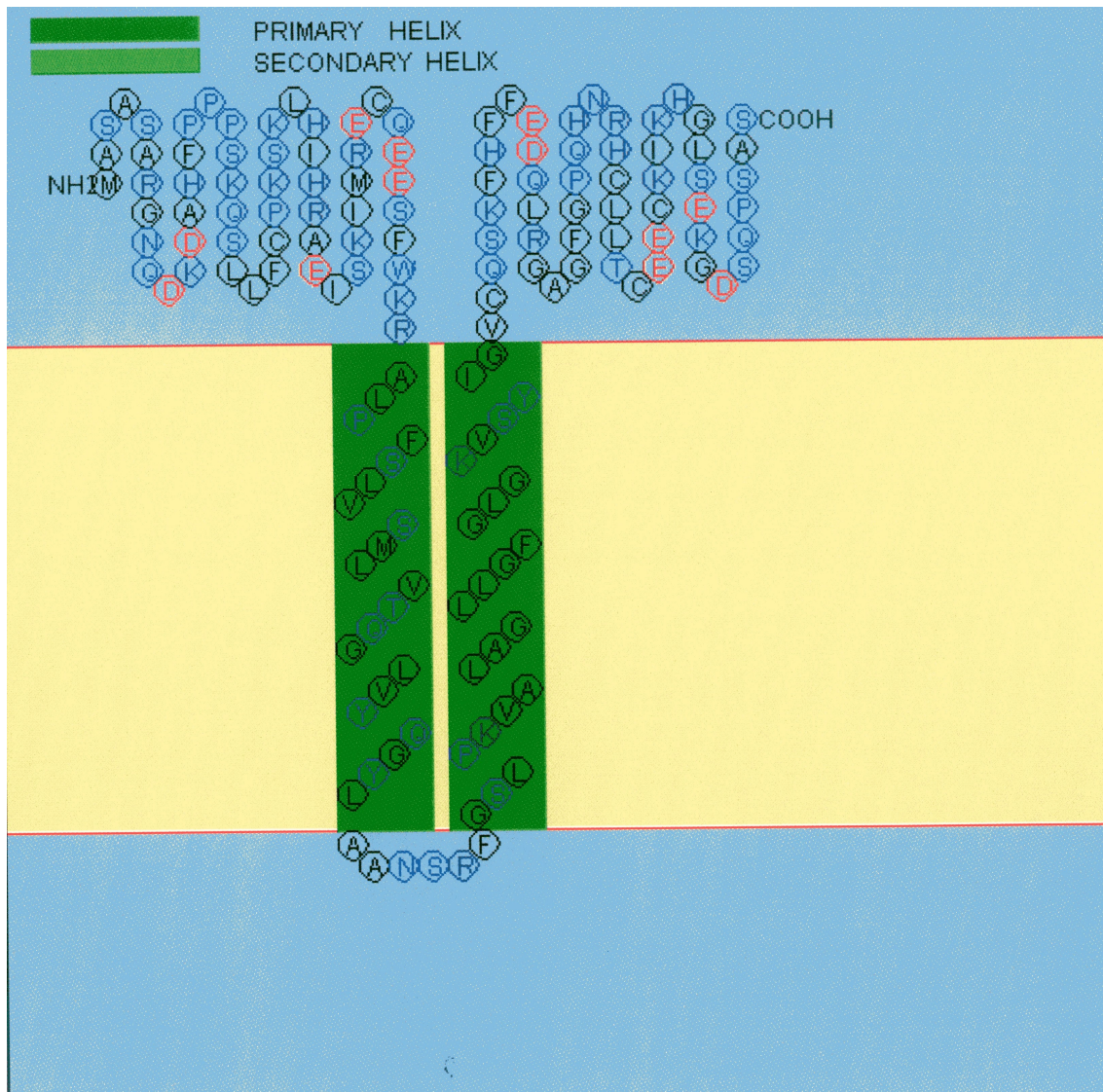


図4 SEREX法による OCIAD1 同定までの過程

OCIAD1 は卵巣癌患者の腹水中にある癌細胞が認識した cDNA ライブラリ由来の遺伝子である。

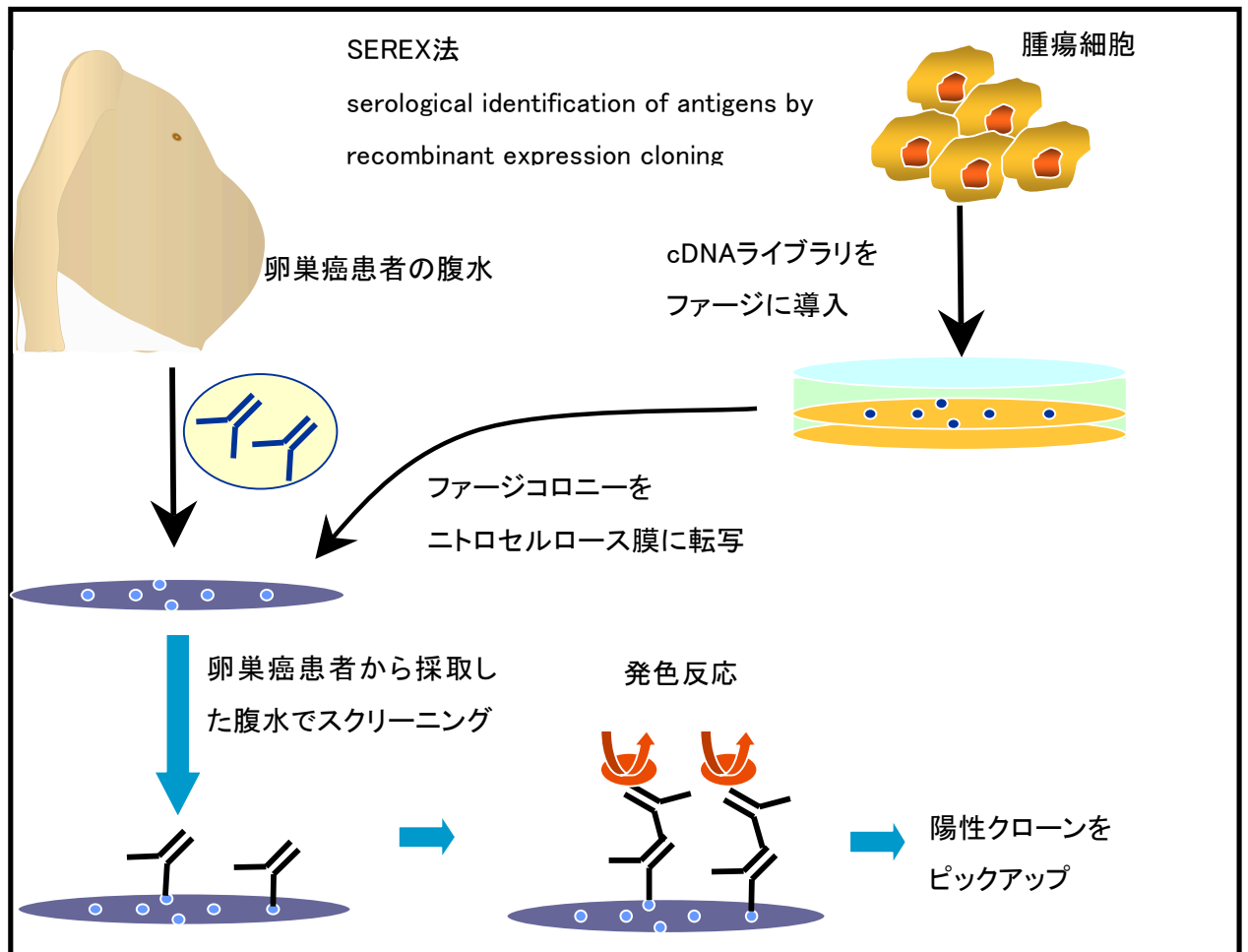
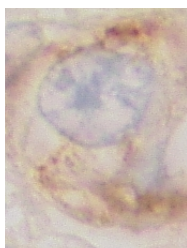


図 5 OCIAD2 免疫組織化学の染色性

染色性 1



染色性 2

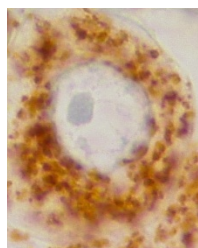


図 6 OCIAD2 プライマーの配列

**OCIAD2-F 5'-ACTGCACATCCACAGAGCAGAGA-3'**

**OCIAD2-R 5'-TGGTAGACTAGTCCCTGGGTGACA-3'**

図7 インターカレーター法

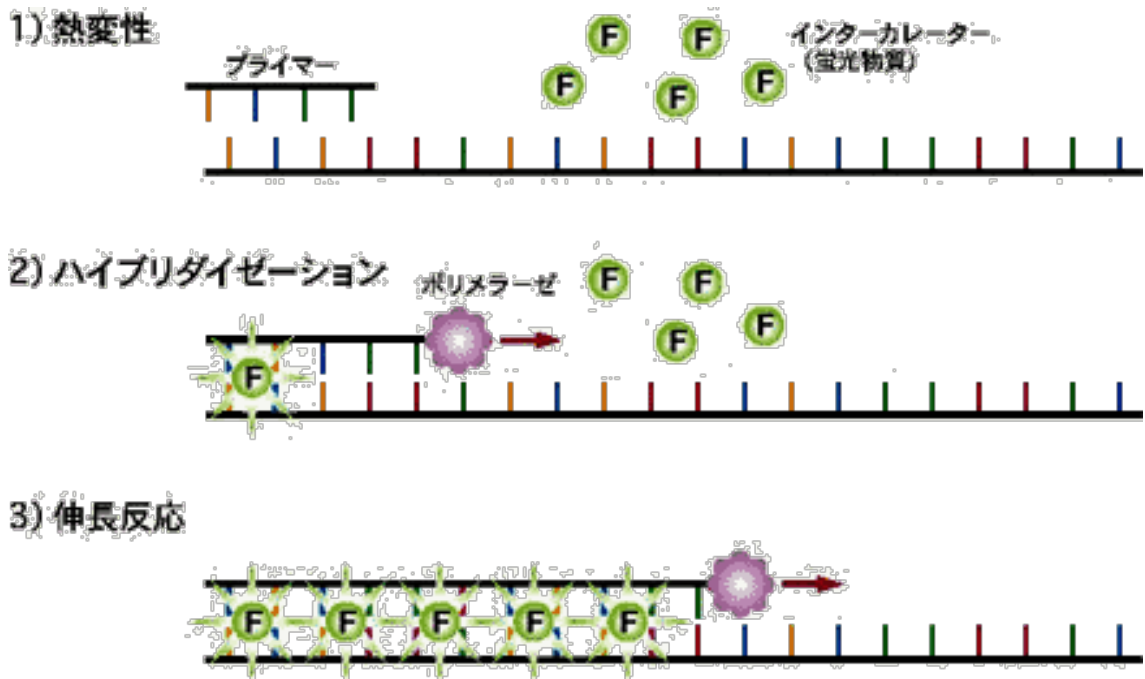


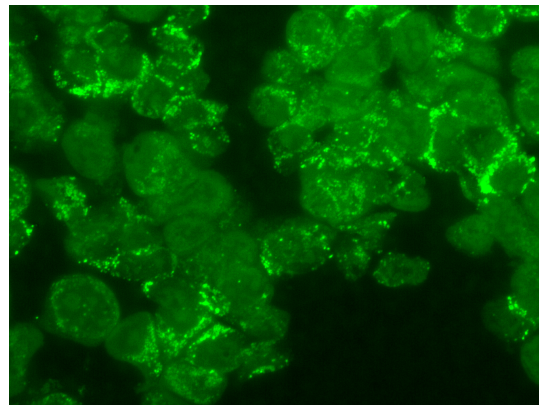
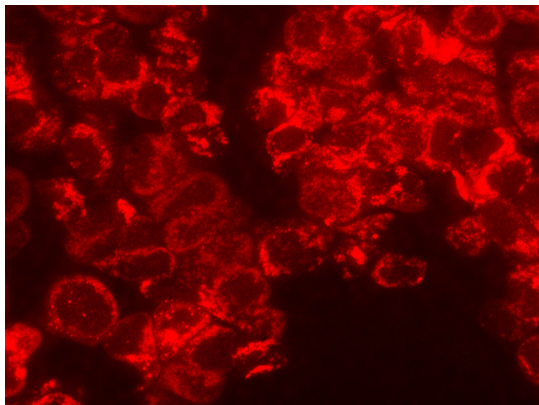


図 8 肺腺癌細胞株(LC/ad2)のセルブロックを用いた蛍光免疫染色

OCIAD2 は胞体顆粒状染色を示し、ミトコンドリアにほぼ一致している。

OCIAD2

ミトコンドリア



核染色

merge

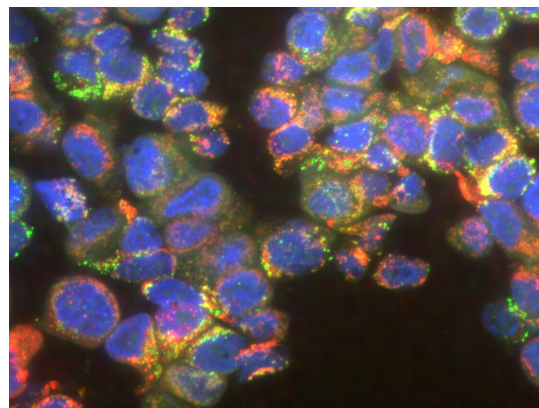
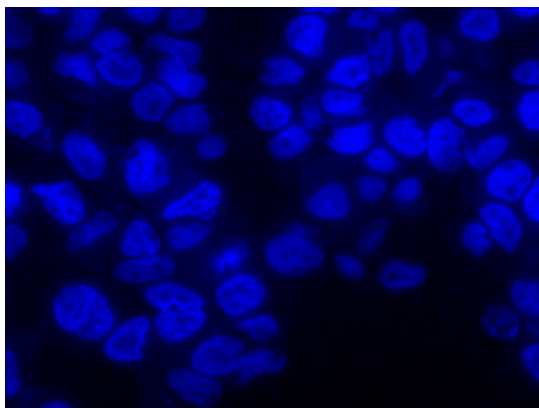
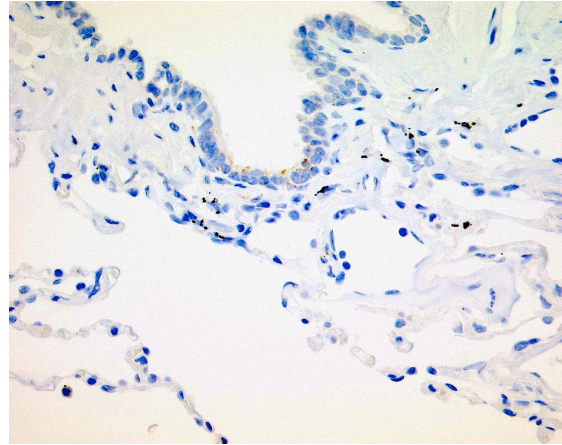
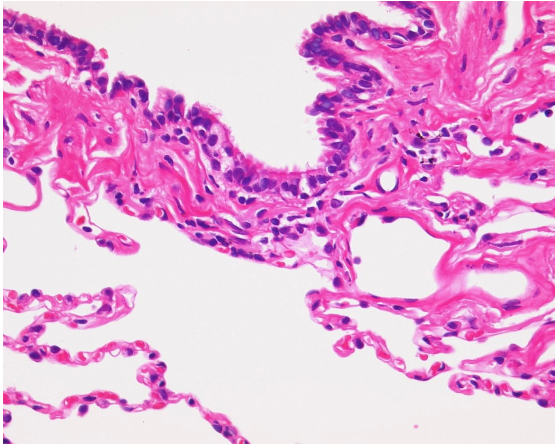
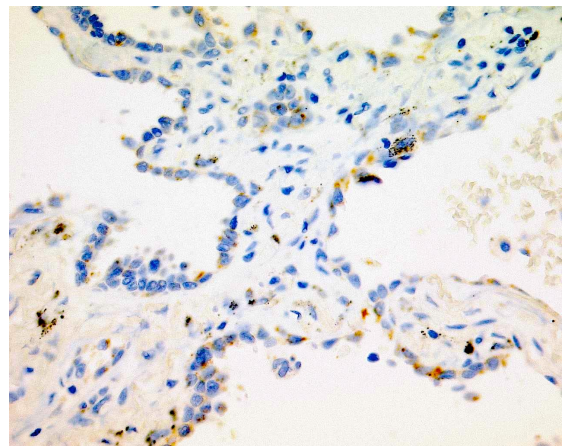
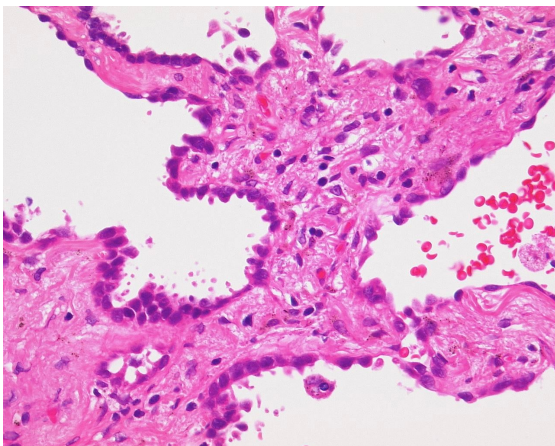


図9 肺腺癌における免疫組織化学の染色性(対物 400倍)

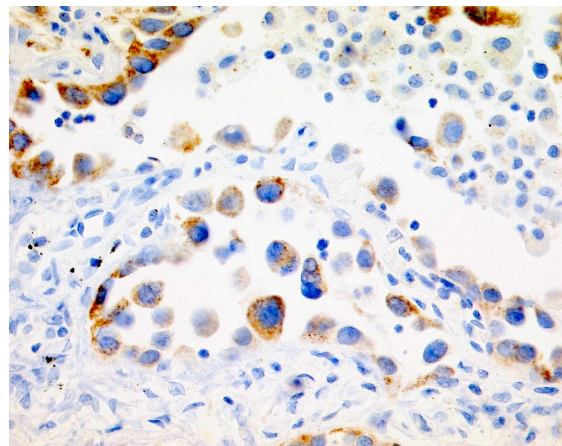
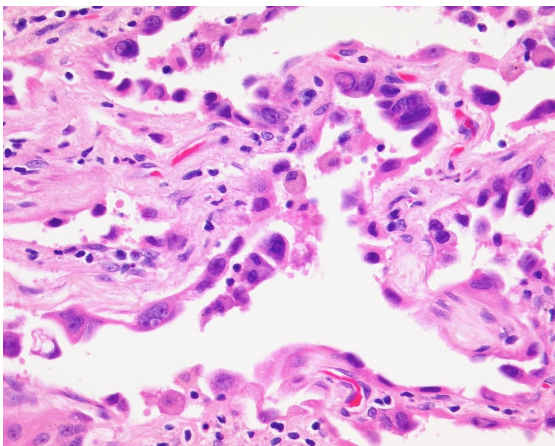
A.正常



B.上皮内腺癌(AIS)

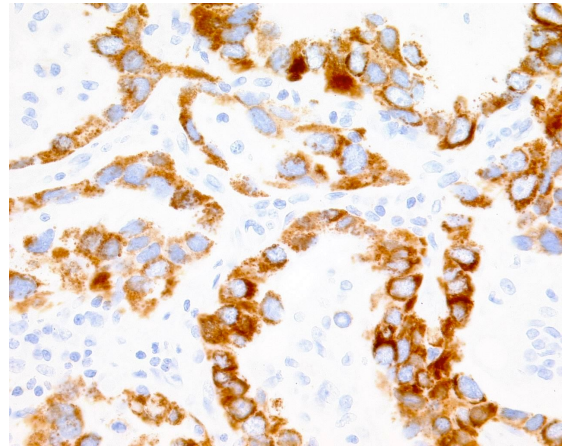
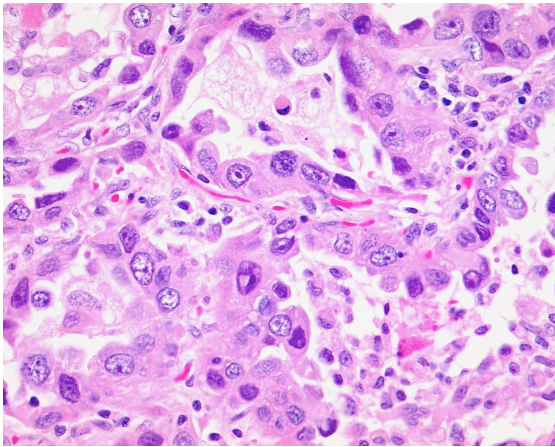


C.微少浸潤性腺癌(MIA)





D. 浸潤性腺癌(腺房性增殖優位型)



E. 浸潤性腺癌(充實性增殖優位型)

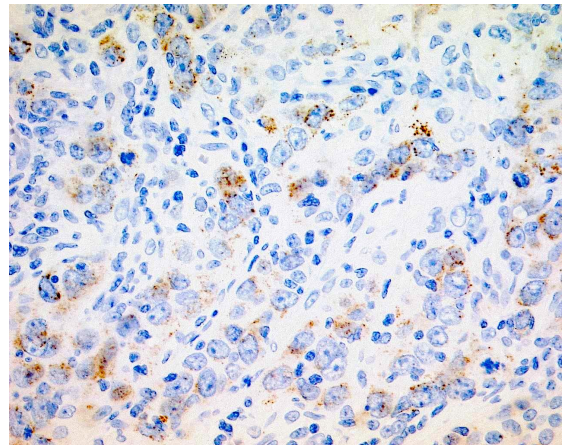
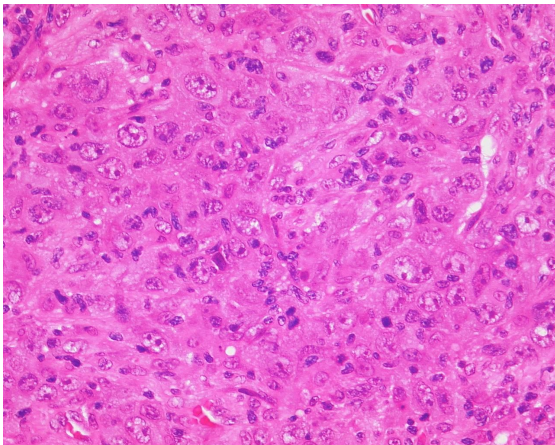


図 10 免疫染色スコア組織型別平均値

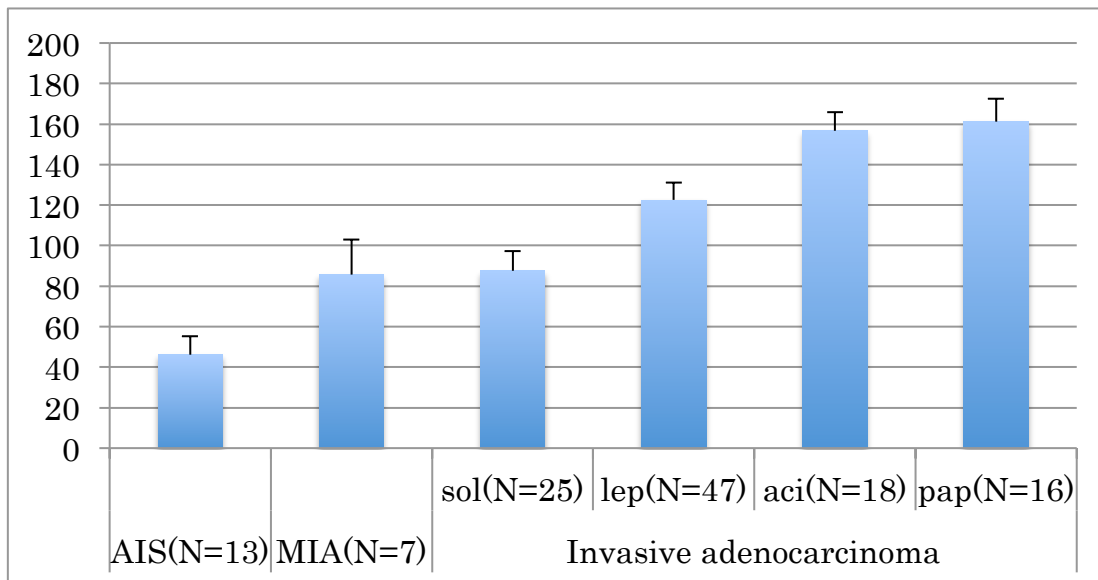
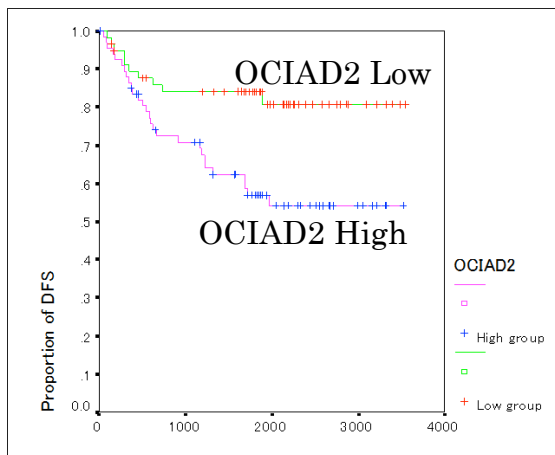


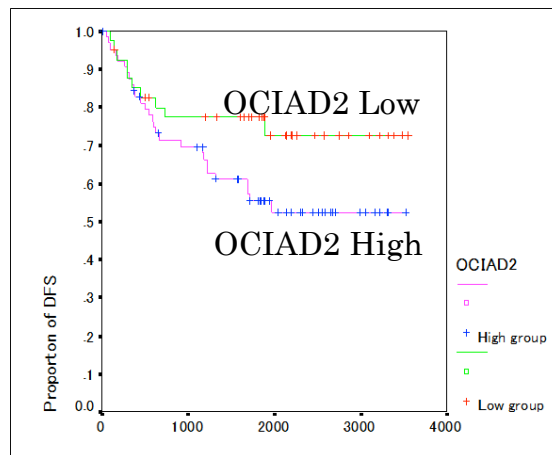
図 11 OCIAD2 免疫染色スコアと無再発生存(disease free survival: DFS)率

A. 全症例



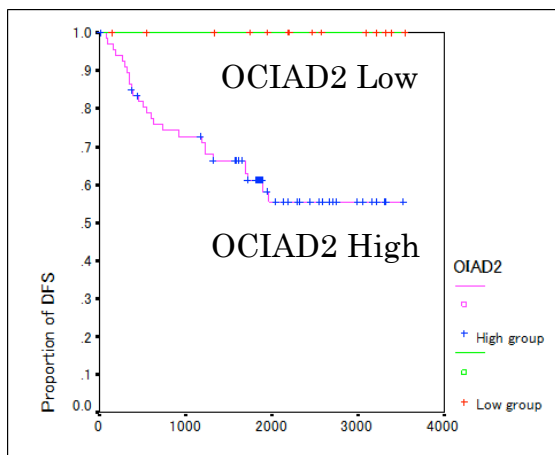
p=0.0053\*

B. 浸潤性腺癌のみ



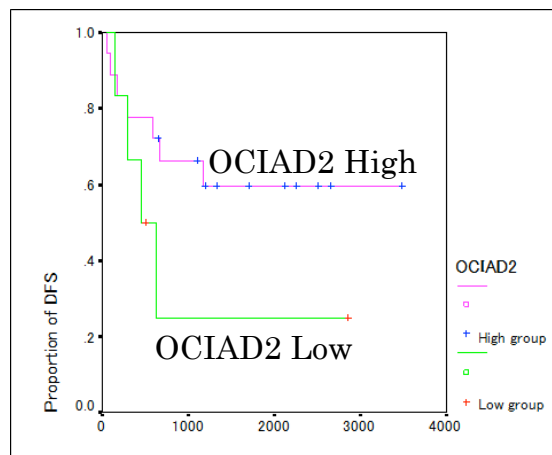
p=0.081

C. low grade adenocarcinoma のみ



p=0.0085\*

D. 充実型のみ



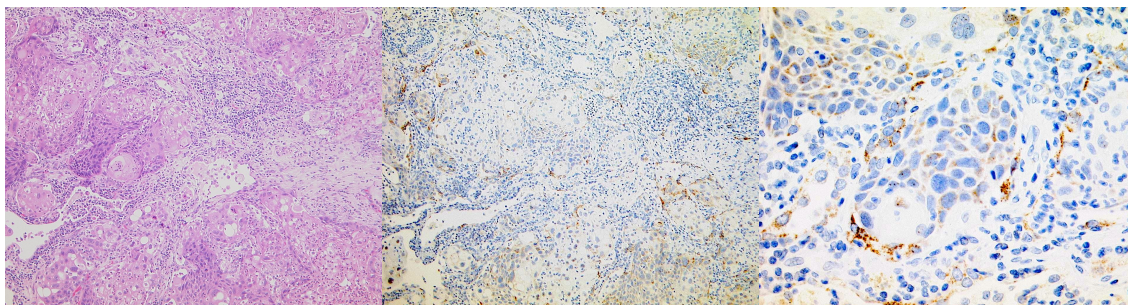
p=0.14



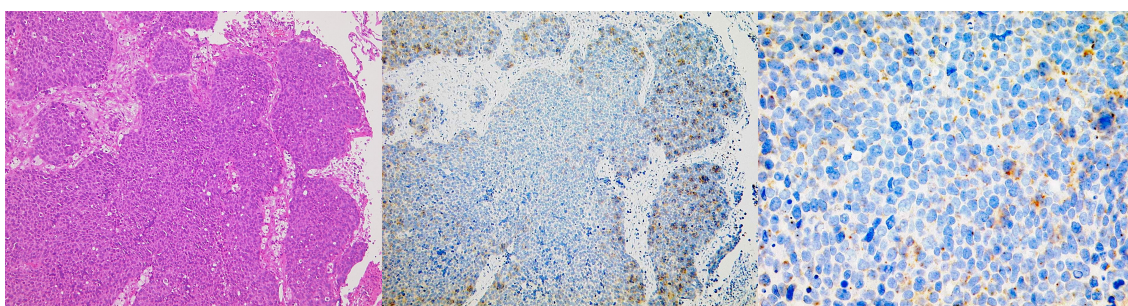
図 12 その他組織型における OCIAD2 の染色性

(左・中央 対物 100 倍、右 対物 400 倍)

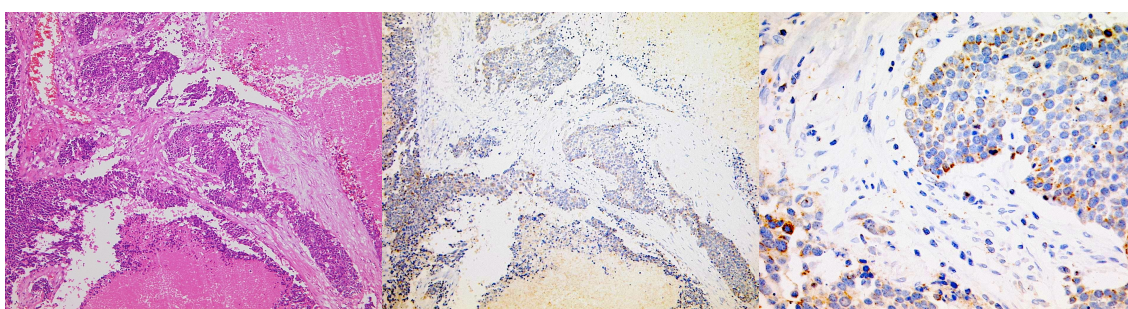
(A) 扁平上皮癌



(B) 大細胞癌

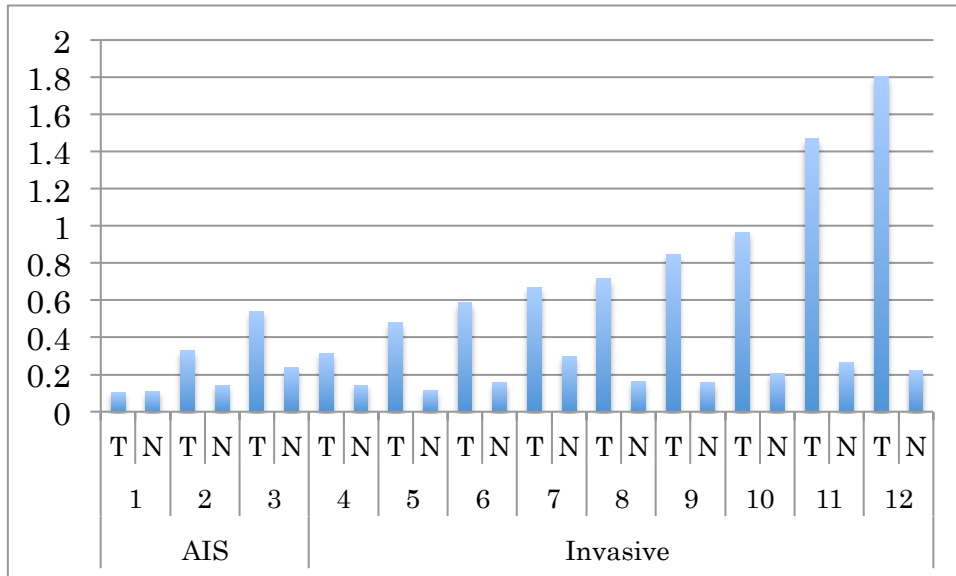


(C) 大細胞神経内分泌癌

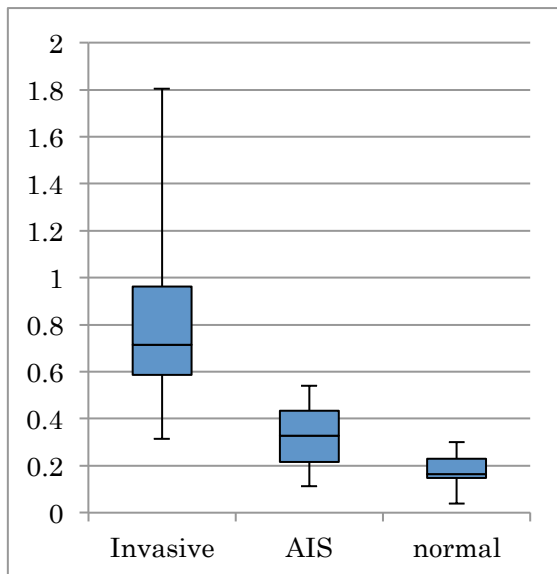


☒ 13 Real-Time qRT-PCR

(A) OCIAD2 relative expression (OCIAD2/18S rRNA)



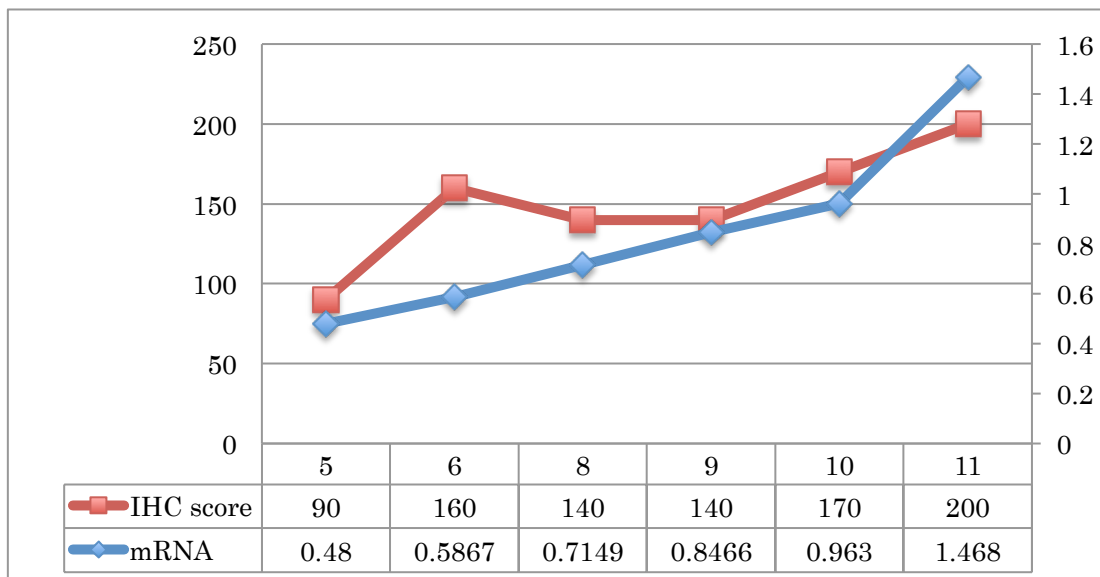
(B) OCIAD2 relative expression (OCIAD2/18S rRNA)



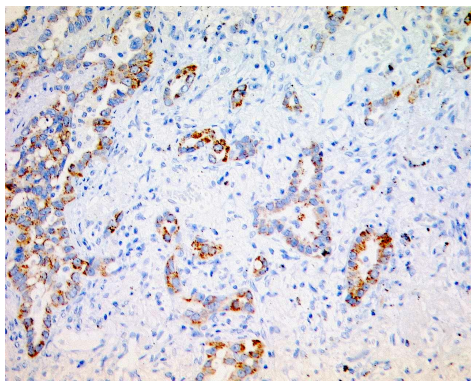
中央値 Invasive 0.715, AIS 0.32785, Normal 0.1632

図 14 Real time qRT-PCR と免疫染色スコアの相関

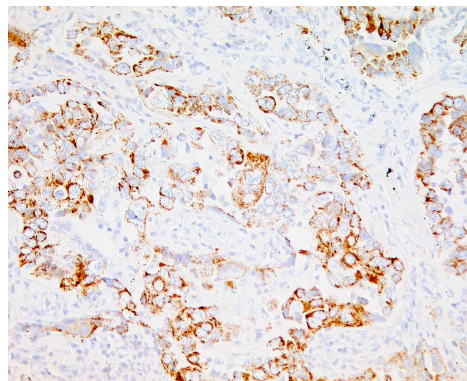
OCIAD2 relative expression(OCIAD2/18S rRNA)と免疫染色スコア(IHC score)は強い相関を示した。(r=0.8341)



症例 5



症例 10



症例 11

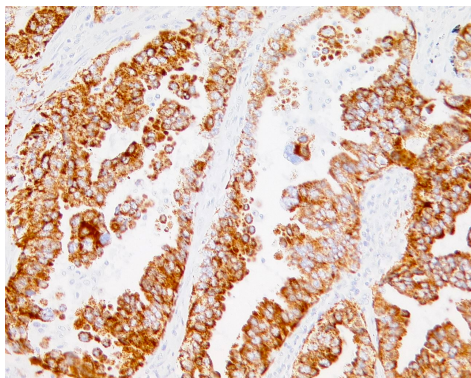




図 15 Mitochondria-associated ER Membrane(MAM) [32] より

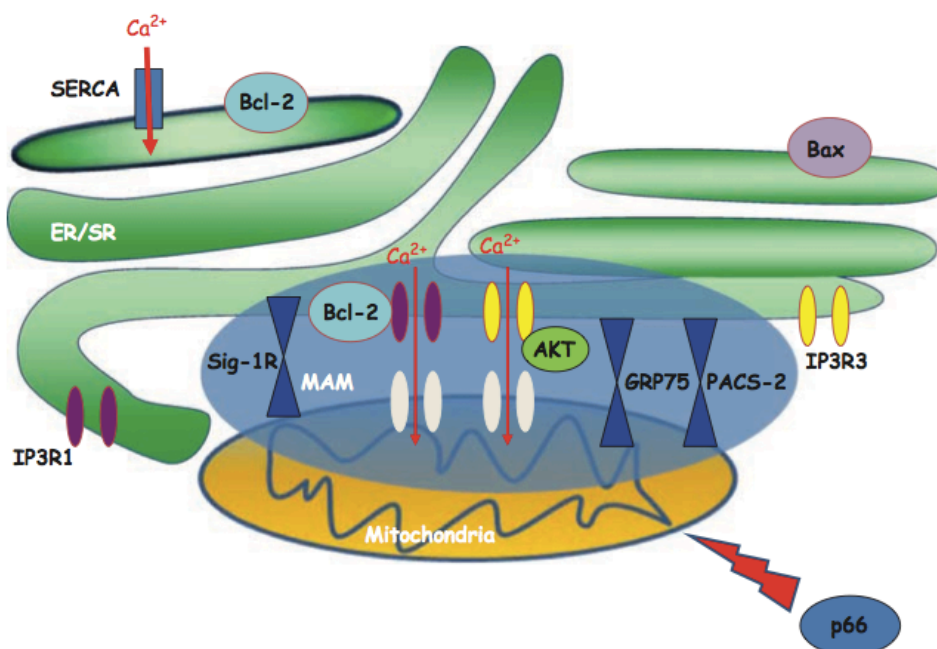


図 16 免疫細胞化学陽性例

Positive:細胞判定基準陽性, Suspicious:細胞判定疑陽性, Negative:細胞基準陰性

(A)(B)(C):LBC 法を用いた気管支洗浄液検体の免疫細胞化学

(D)(E)(F):同症例の手術材料、免疫組織化学((A)=(D), (B)=(E), (C)=(F))

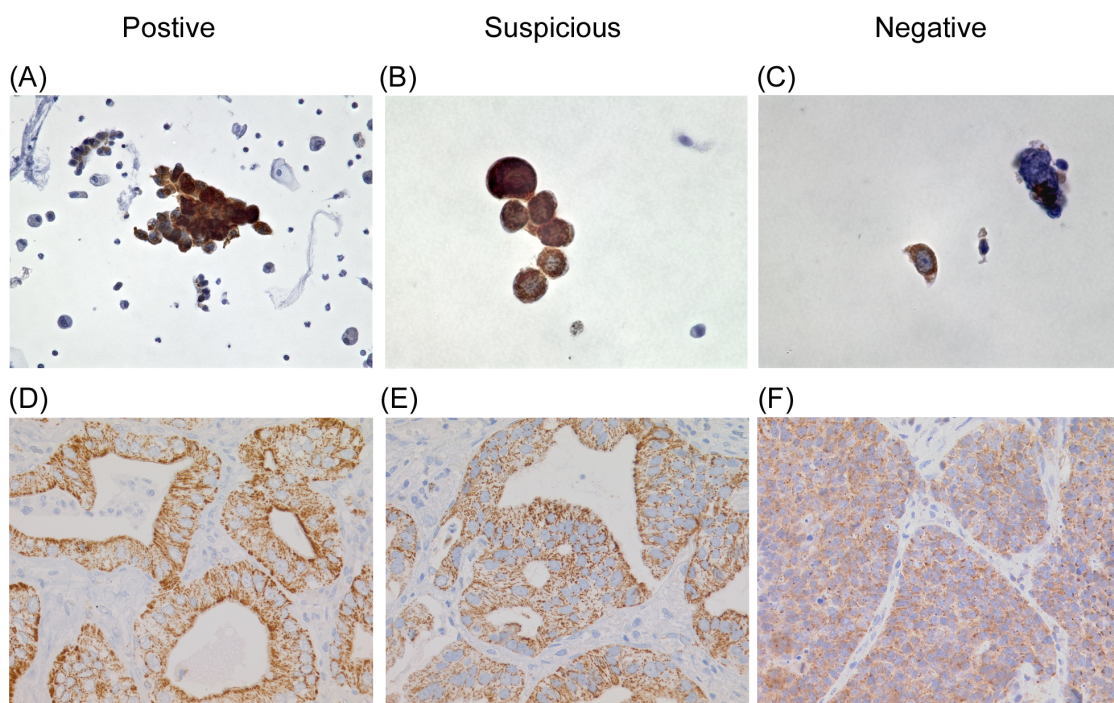


図 17 OCIAD2 免疫細胞化学の感度・特異度

□細胞診のみ ■細胞診+OCIAD2 免疫細胞化学

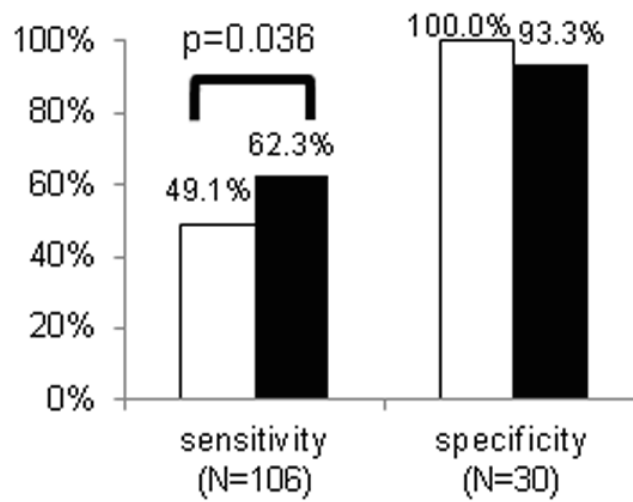


表 1 肺腺癌の新分類(IASLC/ATS/ERS, 2011)

<p>Preinvasive lesions</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Atypical adenomatous hyperplasia</li> <li>Adenocarcinoma in situ (<math>\leq 3</math> cm formerly BAC)               <ul style="list-style-type: none"> <li>Nonmucinous</li> <li>Mucinous</li> <li>Mixed mucinous/nonmucinous</li> </ul> </li> </ul>
<p>Minimally-invasive adenocarcinoma (<math>\leq 3</math> cm lepidic predominant tumor with <math>\leq 5</math> mm invasion)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Nonmucinous</li> <li>Mucinous</li> <li>Mixed mucinous/nonmucinous</li> </ul>
<p>Invasive adenocarcinoma</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Lepidic predominant (formerly nonmucinous BAC pattern, with <math>&gt; 5</math> mm invasion)</li> <li>Acinar predominant</li> <li>Papillary predominant</li> <li>Micropapillary predominant</li> <li>Solid predominant with mucin production</li> </ul>
<p>Variants of invasive adenocarcinoma</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Invasive mucinous adenocarcinoma (formerly mucinous BAC)               <ul style="list-style-type: none"> <li>Colloid</li> <li>Fetal (low and high grade)</li> <li>Enteric</li> </ul> </li> </ul>

[略語] BAC: bronchioloalveolar carcinoma, IASLC: International Association for the Study of Lung Cancer, ATS: American Thoracic Society, ERS: European Respiratory Society.

表 2 臨床病理学的因子と OCIAD2 免疫染色スコアとの関連性

**A. 全例対象とした単変量解析**

	Low group n=65	High group n=61	p
Age (Av.±S.D.)	69.9±9.7	72.3±9.8	0.18
Tumor Size (Av.±S.D.)	22.1±16.5	32.7±18.8	0.001*
Pathological stage (IA / IB / IIA / IIB / IIIA)	40 / 13 / 3 / 1 / 8	21 / 18 / 4 / 5 / 13	0.031*
Pathological T (1a / 1b / 2a / 2b / 3)	36 / 6 / 17 / 0 / 6	12 / 12 / 24 / 2 / 11	0.001*
Pathological N (0 / 1 / 2 / 3)	54 / 6 / 5	43 / 6 / 12	0.18
Pleural invasion (0 / 1 / 2 / 3)	49 / 8 / 4 / 4	41 / 13 / 5 / 2	0.47
Presence of vascular invasion (%)	18 (27.7%)	27 (44.3%)	0.052
Presence of lymphatic permeation (%)	17 (26.2%)	33 (54.1%)	0.001*
Modified scar grade (1 / 2 / 3 / 4)	11 / 33 / 21 / 0	0 / 29 / 31 / 1	0.003*
Predominant (AIS / MIA / lepi / aci / pap / sol)	13 / 6 / 23 / 3 / 3 / 17	0 / 1 / 25 / 15 / 13 / 7	0.001*
CEA (Av.±S.D.) ng/ml	8.2±22.4	10.4±20.0	0.17
CYFRA (Av.±S.D.) ng/ml	1.3±0.99	1.8±1.5	0.015*

**B. low grade invasive adenocarcinoma(置換型、腺房型、乳頭型)対象とした単変量解析**

	Low group n=14	High group n=68	p
Age (Av.±S.D.)	68.6±12.1	72.5±10.3	0.55
Tumor Size (Av.±S.D.)	18.6±12.7	32.0±18.2	0.003*
Pathological stage (IA / IB / IIA / IIB / IIIA)	11 / 3 / 0 / 0 / 0	23 / 25 / 4 / 5 / 11	0.032*
Pathological T (1a / 1b / 2a / 2b / 3)	10 / 1 / 3 / 0 / 0	11 / 14 / 31 / 2 / 10	0.001*
Pathological N (0 / 1 / 2 / 3)	14 / 0 / 0	50 / 6 / 10	0.12
Pleural invasion (0 / 1 / 2 / 3)	11 / 2 / 1 / 0	46 / 14 / 6 / 2	0.83
Presence of vascular invasion (%)	2 (14.3%)	25 (36.8%)	0.10
Presence of lymphatic permeation (%)	3 (21.4%)	33 (48.5%)	0.063
Modified scar grade (1 / 2 / 3 / 4)	2 / 7 / 5 / 0	0 / 34 / 32 / 1	0.013*
Predominant (lepi / aci / pap)	14 / 0 / 0	34 / 18 / 16	0.003*
CEA (Av.±S.D.) ng/ml	4.5±5.4	10.2±19.1	0.11
CYFRA (Av.±S.D.) ng/ml	1.2±0.92	1.7±1.4	0.038*

表 3 OCIAD2 の免疫細胞化学結果(細胞判定基準別、組織型別の OCIAD2 免疫染色陽性数)

	Histology				Total
	Ad	Sq	Small	Others	
Negative	4/22	1/10	0/1	1/8	6/41
Suspicious	6/10	1/2	NA	1/1	8/13
Positive	19/25	6/11	5/5	7/11	37/52
Total	29/57	8/23	5/6	9/20	51/106

Ad: adenocarcinoma, Sq: squamous cell carcinoma, Small: small cell carcinoma.

表 4 コントロールとして用いた 30 例の臨床情報内訳。

サルコイドーシス	7
間質性肺炎(疑い含む)	6
非結核性抗酸菌症	3
その他感染	4
真菌感染	2
その他	8
<hr/>	
	30