

筑波大学

博士（医学）学位論文

肺腺癌における Cyclophilin A と
Hypoxia inducible factor-1alpha の発現の
臨床病理学的検討

2017

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

中野 雅之

目次

第1章	1
1-1. はじめに	1
1-1-1. 肺腺癌の疫学と組織学的分類	1
1-1-2. 早期肺腺癌の初期進行にかかわる蛋白質	3
1-1-3. 肺腺癌と cyclophilin A	4
1-1-4. 肺腺癌と HIF-1 α	6
1-2. 研究の目的	10
1-3. 予備解析：WHO 分類第4版による肺腺癌の組織病理学的診断と予後	11
1-3-1. 方法	11
症例	11
1-3-2. 統計解析	12
1-3-3. 結果	13

WHO 分類に基づく肺腺癌の組織病理学的診断	・ ・ ・ ・ ・	13
野口分類による小型肺腺癌の組織病理学的診断	・ ・ ・ ・ ・	13
肺腺癌の組織形態と予後との関連	・ ・ ・ ・ ・	14
1-3-4. 結論	・ ・ ・ ・ ・	15

第 2 章：肺腺癌における CypA 発現の意義についての臨床病理学的検討

	・ ・ ・ ・ ・	16
2-1. 方法	・ ・ ・ ・ ・	16
2-1-1. 肺腺癌細胞株の培養条件	・ ・ ・ ・ ・	16
2-1-2. Western blotting	・ ・ ・ ・ ・	17
2-1-3. 肺癌細胞株への siRNA(siCypA)の導入	・ ・ ・ ・ ・	18
2-1-4. 外科的切除症例と組織病理学的検討	・ ・ ・ ・ ・	19
2-1-5. CypA の免疫組織化学	・ ・ ・ ・ ・	19
2-1-6. 免疫組織化学の評価	・ ・ ・ ・ ・	19
2-1-7. Driver gene alternation との関連	・ ・ ・ ・ ・	20

2-1-8. 統計解析	21
2-2. 結果	22
2-2-1. 肺腺癌細胞株の Western blotting と免疫細胞化学	22
2-2-2. 外科的切除材料における CypA の免疫組織化学	22
2-2-3. CypA の発現と、組織学的亜分類との相関	23
2-2-4. CypA の発現と Driver gene の変化との関連	24
2-2-5. CypA の発現と予後との関連	25
1) 肺腺癌全 198 例での解析	25
2) 小型腺癌 100 例での解析	27
2-3. 考察	29

第 3 章：肺腺癌における HIF-1 α の発現と CypA 発現との関連および臨床病理学

的検討	32
3-1. 方法	32
3-1-1. 肺腺癌細胞株の培養条件	32

3-1-2. 塩化コバルトを用いた化学的低酸素状態での培養	・・・	33
3-1-3. Western blotting	・・・	33
3-1-4. 外科的切除症例	・・・	34
3-1-5. HIF-1 α の免疫組織化学	・・・	34
3-1-6. 免疫組織化学の評価	・・・	34
3-1-7. Driver gene alternation との関連	・・・	35
3-1-8. 統計解析	・・・	35
3-2. 結果	・・・	36
3-2-1. 肺腺癌細胞株の Western blotting と免疫細胞化学	・・・	36
3-2-2. 外科的切除材料における HIF-1 α の免疫組織化学	・・・	36
3-2-3. HIF-1 α 発現と Driver gene の変化および CypA との関連	・・・	38
3-2-4. HIF-1 α の発現と予後との関連	・・・	39
1) 肺腺癌全 198 例での解析	・・・	39
2) 小型腺癌 100 例での解析	・・・	40

3-2-5. EGFR 遺伝子変異および CypA の発現と HIF-1 α の発現の相関	41
3-3. 考察	43
第 4 章：総合的な考察	49

図表

- 図 1 プロテオミクスによる AAH と正常肺組織における CypA の発現解析
- 図 2 CypA の機能と構造
- 図 3 MALDI-TOF MS による肺癌 (NSCLC) での CypA の同定
- 図 4 肺癌 (NSCLC) での CypA の機能解析
- 図 5 組織型別 (AIS, MIA, Adenocarcinoma, IMA) の予後曲線
- 図 6 小型肺腺癌の野口分類 type 別の予後曲線
- 図 7 PNA-LNA PCR clamp 法による EGFR 変異遺伝子の検出法
- 図 8 肺腺癌細胞株における CypA の発現と siRNA (siCypA) 導入

- 図 9 外科的切除材料の肺腺癌における CypA の免疫組織化学の染色性
- 図 10 組織型別の H-score (CypA) の比較
- 図 11 反応性病変と腺癌との CypA の染色性の差異
- 図 12 Driver gene の変化と CypA の H-score (中央値) との関連
- 図 13 Kaplan-Meier 法による肺腺癌の CypA 発現と予後との関連 肺腺癌全
198 例での生存曲線
- 図 14 Kaplan-Meier 法による肺腺癌の CypA 発現と予後 小型腺癌 100 例で
の生存曲線
- 図 15 肺腺癌細胞株 A549 における CoCl₂ を用いた化学的低酸素状態下での
HIF-1 α と CypA の発現の変化
- 図 16 肺腺癌における HIF-1 α の染色像
- 図 17 HIF-1 α 陽性症例における CypA 染色像の対比
- 図 18 HIF-1 α の染色パターンと肺腺癌の組織型との関連 (全 198 例)
- 図 19 HIF-1 α の染色パターンと肺腺癌の組織型との関連
(小型肺腺癌 100 例)

図 20 Kaplan-Meier 法による肺腺癌における HIF-1 α の発現と予後 肺腺癌全
198 例での生存曲線

図 21 Kaplan-Meier 法による肺腺癌における HIF-1 α の発現と予後 HIF-1 α の
発現パターン別, 全 198 例

図 22 Kaplan-Meier 法による肺腺癌における HIF-1 α の発現と予後 小型肺
腺癌 100 例での生存曲線

図 23 Kaplan-Meier 法による肺腺癌における HIF-1 α の発現と予後(HIF-1 α の
発現パターン別, 小型肺腺癌 100 例)

表 1 小型肺腺癌の野口分類

表 2 WHO 分類 (第 4 版, 2015 文献 2) による肺腺癌の分類

表 3 先行研究で報告されているヒト各臓器での腫瘍組織における CypA の
発現と機能

表 4 本研究で用いた肺腺癌症例の概要

表 5 本研究で用いた肺腺癌の組織学的分類

表 6 免疫組織化学およびウエスタンブロッティングで用いた一次抗体と反

応条件

表 7 siRNA (siCypA) の塩基配列

表 8 肺腺癌における CypA の発現と臨床病理学的因子との関連

表 9 Cox proportional hazards model による単変量および多変量解析(CypA,

全症例 n=198)

表 10 Cox proportional hazards model による単変量および多変量解析

(CypA, 小型腺癌 n=100)

表 11 HIF-1 α の染色パターンによる肺腺癌の分類

表 12 HIF-1 α の染色性による分類と組織型との関連

表 13 肺腺癌における HIF-1 α の発現と臨床病理学的因子との関連

表 14 Cox proportional hazards model による単変量および多変量解析

(HIF-1 α , 全症例 n=198)

表 15 Cox proportional hazards model による単変量および多変量解析

(HIF-1 α , 小型腺癌 n=100)

引用文献

略語一覽

参考論文

第 1 章

1-1. はじめに

1-1-1. 肺腺癌の疫学と組織学的分類

我が国の最新の人口動態統計（平成 27 年）¹によると、死因第 1 位は悪性新生物（28.7%）、2 位は心疾患（15.2%）、3 位が肺炎（9.4%）となっている。

このうち、肺癌は男性で第 1 位、女性で第 2 位、男女合計で第 1 位の死亡数であり、その数は上昇を続けている。

組織病理学的には、肺の悪性上皮性腫瘍は、大きく小細胞癌と非小細胞癌の 2 つに分類される。非小細胞肺癌は、腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌に分類されている。このうち、腺癌が最も多くを占める²。

Noguchi ら³は、直径 2cm 以下の小型肺腺癌の構造に注目した分類を報告した（表 1）。この分類は、CT 所見との関連性が極めて明瞭である。すなわ

ち、肺胞構造を保ったまま肺胞上皮置換性に増殖する type A, B, C では含気があり、CT 上で限局性のすりガラス状陰影 (ground glass appearance: GGO) という特徴的な所見を呈する。一方で、肺胞構造を破壊して浸潤性に増殖する type D, E, F では腫瘍内に含気が乏しく、GGO は見られない。小型肺腺癌を以上のように分類すると、肺腺癌の組織学的な多段階的進行と臨床的予後との関連が明瞭であり、術前 CT の段階で術式の選択の一助ともなる。

現行の世界保健機関 (world health organization: WHO) による肺癌の分類は、2015 年に改訂された第 4 版 (以下、WHO 分類, 表 2) である²。前版までの WHO 分類 (第 3 版, 1999) は、1) 上皮内腺癌から予後不良な肺炎様の腺癌までが一義的に細気管支肺胞上皮癌 (bronchioloalveolar carcinoma: BAC) に含まれる、2) 組織分類もほとんどが混合型 (adenocarcinoma, mixed subtype) に含まれ、組織学的亜分類の意義に乏しいなど、様々な問題点や矛盾点があった。しかし、現行の WHO 分類における肺腺癌の組織分類には、野口分類を基礎とした腺癌の多段階進行 (stepwise progression)^{3, 4} の概念が取り入れられた。これにより、既に定義されていた前癌病変である異型腺腫様過形成 (atypical adenomatous

hyperplasia: AAH) に加え、上皮内腺癌 (adenocarcinoma in situ: AIS) が前浸潤性病変として新設された。また、浸潤性腺癌と上皮内腺癌間に、微少浸潤性腺癌 (minimally invasive adenocarcinoma : MIA) が新設された。このほか、浸潤性腺癌の組織型も、従来の混合型から、最も優勢な組織型を基に置換型腺癌 (lepidic adenocarcinoma : lepidic) 、乳頭型腺癌 (papillary adenocarcinoma : papillary) 、腺房型腺癌 (acinar adenocarcinoma : acinar) 、微小乳頭型腺癌 (micropapillary adenocarcinoma : micropapillary) 、充実型腺癌 (solid adenocarcinoma : solid) に整理された。浸潤性粘液性腺癌 (invasive mucinous adenocarcinoma : IMA) をはじめとする特殊型腺癌 (variant) も定められた。全体として、組織分類自体が予後予測因子として機能するようになった。

1-1-2 : 早期肺腺癌の初期進行にかかわるタンパク質

肺腺癌における多段階的進行の概念が確立したことで、stratifyn タンパク質 (SFN)^{5,6}や、Immunoglobulin binding protein-1 タンパク質 (IGBP-1)⁷ など、早期肺腺癌の進行 (悪化) に関与するタンパク質が同定されてきた。SFN は、野

口分類 type A よりも、type C で高発現であり、肺腺癌細胞株を用いた *in vitro* の環境でも、肺腺癌の進行を促進することが示唆されている^{5,6}。IGBP-1 も、野口分類 type A と B では低発現である一方で、type C, D, E および F では、その発現が段階的に亢進し、IGBP-1 陽性腺癌は、陰性腺癌と比較して、有意に予後不良だった⁷。

1-1-3 : 肺腺癌と cyclophilin A

本研究では、肺腺癌の多段階的進行に関わるタンパク質として、cyclophilin A タンパク質 (CypA) (別名 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A: PPIA) に特に注目した。CypA は、ウシ胸腺組織から初めて抽出され、後に T リンパ球の細胞質内タンパク質と同定された。この CypA は免疫抑制剤である cyclosporine A の結合部位でもある (図 2)^{9, 10, 11, 12, 13, 14}。ヒトの腫瘍組織では、悪性黒色腫¹⁵、乳癌^{16, 17}、胃癌¹⁸、胆管細胞癌¹⁹、大腸癌²⁰、膀胱癌^{21, 22, 23}、膠芽腫²⁴、および肺癌^{25, 26} など、様々な腫瘍での発現の亢進が報告されている (表 3)。CypA は、低酸素誘導因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α : HIF-1 α) による腫瘍の低

酸素への応答や¹³、TP53 タンパク質の安定化にも関与していると考えられており²⁷、各臓器の悪性腫瘍における CypA の役割が注目されている。

非小細胞肺癌 (non-small cell lung carcinoma: NSCLC) での CypA の過剰発現は、matrix-associated laser deposition/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) を用いたプロテオミクス的手法により、最初に確認された²⁵。

この報告では、CypA は、NSCLC と非腫瘍部の肺組織の臨床検体 (10 例) を用いた比較検討で、過剰発現しているタンパク質の 1 つとして同定された (図 3)。

また、ヒト肺腺癌細胞株での CypA の knock down は、腫瘍増殖速度の減少、細胞増殖の低下、およびアポトーシスの増加との関連も報告されている (図 4)^{25, 28}。しかしながら、その臨床病理学的意義はまだ明らかではない。

Haward ら²⁹ は、CypA を含む複数の分子について、234 例の NSCLC (腺癌 : 124 例、扁平上皮癌 : 82 例、大細胞癌 : 24 例、大細胞神経内分泌癌 : 4 例) の切除検体を用いて免疫組織化学を施行し、臨床病理学的意義の検討を行った。その結果、CypA は NSCLC において高発現しているタンパク質の 1 つであることが分かったが、その発現と予後との関連は認められなかった。

坂下⁸は、CypA の発現が AAH でも上昇していることを報告した。AAH および非病変部の肺組織からタンパク質を抽出し、プロテオミクス的手法を用いて、発現タンパク質の差異を解析したところ、非病変部の肺組織と比較して、AAH で高発現であるタンパク質の 1 つとして、CypA が同定された (図 1)。これまで、NSCLC での CypA の発現の亢進が報告されてきたが、肺腺癌の前癌病変である AAH においてもすでに発現の亢進が生じていることは、CypA が肺腺癌の初期進行に関与している可能性があり、きわめて興味深い。

1-1-4 : 肺腺癌と HIF-1 α

肺腺癌の進行においては、様々な CypA の生物学的機能の中でも低酸素誘導因子 HIF-1 α との関連は組織病理学的に重要と考えられる。CypA は、低酸素の状態が発現が亢進することが報告されている²³。肺腺癌の進行により線維芽細胞の増生巣や腫瘍細胞の浸潤によって肺胞腔が破壊され、気腔であった空間が腫瘍組織で充満していくことは、肺腺癌の進行に伴う組織形態の変化の特徴であり、その結果細胞が低酸素状態におかれると考えられる。組織学的に低分

化な腺癌であるほど、浸潤の形態が充実性増殖になり、気腔が減少する。CTの所見にもすりガラス状陰影の中に充実性成分が生じるようになることは、野口分類とCT所見との対比で、すでに広く知られている。このような腺癌は、小型腺癌でも予後が悪い³。

細胞が低酸素になると低酸素応答における重要な転写因子の1つであるHIF-1 α が、CypAのpromoter領域にあるHREに結合することでCypAの転写活性が上昇する^{31,32}。これはCypAのpromoter領域にhypoxia response element (HRE)が含まれていることによる^{23,30}。NSCLCでは、腫瘍内の微小環境は低酸素状態であり³³、その中でHIF-1 α の発現が上昇していると報告されている³⁴。

これまでに、肺癌におけるHIF-1 α の発現とその意義については、いくつかの報告がある。Berezowskaら³⁵は、早期NSCLCにおけるHIF-1 α 発現の意義について、近年NSCLCの発生 (initiation) で重要視されているGlycine decarboxylase (GLDC)の発現と共に検討した。検討されたNSCLCは合計428例であり、いずれもUICC分類第7版でStage IからIIの、扁平上皮癌：211例、腺癌：184例、大細胞癌：33例であった。免疫組織化学でHIF-1 α 発現を検討し

た結果、HIF-1 α は GLDC と共に予後不良に関連しており、独立した予後因子だった。

Kimら³⁶は、HIF-1 α 、そして HIF-1 α による発現調整の関与が深い VEGF、carbonic anhydrase IX (CA IX) 、および matrix metalloprotease-9 (MMP-9) の発現について、NSCLC で免疫組織化学的に検討した。検討された NSCLC は、扁平上皮癌：38 例、腺癌：26 例、大細胞癌：6 例、および分類困難な NSCLC：4 例の、合計 74 例であった。この検討では、HIF-1 α の発現は独立した予後因子ではなかったが、やはり予後不良に関連していた。MMP-9 を除く、他のタンパク質の発現とも有意な相関が得られた。

このほか、NSCLC と HIF-1 α 発現のメタ分析でも、HIF-1 α の発現は、VEGF や CA IX の発現と合わせて、予後に関連があったと報告されている³⁷。ただし、この報告でも腺癌は NSCLC の一部として解析され、多くの扁平上皮癌の症例が含まれていた。

以上の先行研究のいずれも、NSCLC における HIF-1 α の発現が予後不良に関連していることを報告している。しかし、肺腺癌に着目すると、いずれの

報告でも NSCLC 中に扁平上皮癌や大細胞癌と共にまとめられて解析されているため、肺腺癌の初期進行のメカニズムに、HIF-1 α がどのような役割を持っているかはよくわかっていない。

1-2. 研究の目的

肺腺癌における CypA の発現は、癌はもとより、前癌病変である AAH の段階から発現の亢進がみられることから、肺腺癌の初期進行に関連するタンパク質の 1 つと考えられる。また、肺腺癌の多段階的進行を考えれば、腫瘍の低酸素状態が腺癌の悪化・進行に関与しており、それによって誘導される HIF-1 α の関与が推測される。これまで NSCLC における CypA および HIF-1 α の発現の亢進と予後不良への関与が報告されているが、組織学的な腫瘍の進行との関連や、CypA と HIF-1 α の相互の関連性について検討されていない。

本研究では、詳細な組織病理学的分類に基づいて、肺腺癌における CypA と HIF-1 α の発現の意義、特に肺腺癌の初期進行における CypA の役割と、肺腺癌の多段階的進行に伴う HIF-1 α の発現の関連性について解析することを目的とする。

1-3.予備解析：

WHO 分類第 4 版による肺腺癌の組織病理学的 診断と予後

肺腺癌は、現行の WHO 分類第 4 版²によって、分類や概念が大きく刷新された。筑波大学附属病院で切除された肺腺癌の症例に対し、現行の WHO 分類を用いて診断を再検討し、研究に用いる症例の全体像を概観した。

1-3-1. 方法

症例

筑波大学付属病院で外科的に切除された、術前治療のない、単発の原発性肺腺癌症例 198 例（男性：114 例，女性：84 例，全体年齢（中央値（最小値－最大値））：66.5 歳（31 - 89），男性年齢（中央値）：67.9 歳（43 - 83），女性年齢：65.0 歳（31 - 89）：表 4）が検討された。

検体は、15%中性緩衝ホルマリンで固定されたのち、パラフィン包埋された。厚さ 4 μ m の連続切片で Hematoxilin-Eosin 染色と、Elastica van Gieson 染色

の標本が作製され、組織病理学的に評価された。組織病理学的診断は、WHO 分類²、および直径 2cm 以下の小型腺癌の場合は野口分類³を併用した。病期分類は、TNM 分類第 7 版³⁸に従った。全ての症例は、筑波大学附属病院にてインフォームドコンセントが取得された。

1-3-2. 統計解析

統計解析は、統計ソフト SPSS Statistics version 24 (IBM-Japan, Tokyo, Japan)、および EZR³⁹ (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan) を用いて行った。

1-3-3. 結果

WHO 分類に基づく肺腺癌の組織病理学的診断

WHO 分類に基づく肺腺癌の組織病理学的な診断結果を、表 5 に示す。

それぞれ、AIS : 28 例、MIA : 14 例、浸潤性腺癌 : 135 例と診断された。浸潤性腺癌の組織型は、置換型浸潤性腺癌 (lepidic adenocarcinoma: Lep) が 54 例であった。一方、置換型以外の浸潤性腺癌 (non-lepidic adenocarcinoma: non-Lep) は、乳頭型 (papillary) : 25 例、腺房型 (acinar) : 18 例、微小乳頭型 (micropapillary) : 4 例、および充実型 (solid) : 34 例であった。腺癌の variant では、浸潤性粘液性腺癌 (invasive mucinous adenocarcinoma: IMA) : 21 例であり、他の variant と診断された症例はなかった。

野口分類による小型肺腺癌の組織病理学的診断

野口分類が適応される腺癌 (最大径 2cm 以下の小型腺癌) は、100 例だった (表 5)。内訳は、type A : 9 例、type B : 17 例、type C' : 10 例、type C : 46 例、type D : 15 例、type E : なし、type F : 3 例だった。

肺腺癌の組織形態と予後との関連

各組織型の 5 年生存率を表 5 に示す。また、WHO 分類に基づいて AIS、MIA、浸潤性腺癌 (adenocarcinoma: lepidic, papillary, acinar, micropapillary and solid) 、および IMA の 4 群に群別して検討したところ、5 年生存率の全体に有意差が見られた (図 5, AIS: 100%, MIA: 84.6%, adenocarcinoma: 56.8%, IMA: 90.5%, $P < 0.01$, Log-Lank test) 。Bonferoni 法による多重比較を施行したところ、adenocarcinoma の 5 年生存率は、AIS および IMA と比較して有意に不良だった。MIA の 5 年生存率は、AIS、adenocarcinoma、および IMA のどの群とも有意差は見られなかった。

小型肺腺癌 ($n = 100$) では、野口分類の type 別に 5 年生存率を検討すると、全体に有意差が見られた (図 6: type A (100%), type B (100%), type C' (80%), type C (75.1%), type D (68.4%), $P < 0.05$, Log-Rank 検定) 。なお、type F ($n = 3$) は症例数が少なく、検討困難だった。Bonferoni 法による多重比較を施行したが、有意な因子は見られなかった。

1-3-4. 結論

WHO 分類と野口分類を併用して、肺腺癌の組織病理学的診断と予後との関連を検討した。肺腺癌の組織形態は、本研究に用いた症例全体、および小型腺癌のみいずれでも予後と関連があった。

第 2 章

肺腺癌における CypA 発現の意義についての臨床病理学的検討

肺腺癌における CypA の発現の意義について、前浸潤性病変から浸潤癌まで、幅広い進行段階の腺癌組織を用いて検討した。また、肺腺癌細胞株を用いて、CypA の発現解析も行った。

2-1. 方法

2-1-1. 肺腺癌細胞株の培養条件

非腫瘍部の気管支上皮細胞から樹立された PL16B⁴⁰、上皮内腺癌（野口分類 type A 相当）の腫瘍細胞から樹立された PL16T⁴⁰、および肺腺癌細胞株の PC9⁴¹、A549⁴² を用いた。それぞれの細胞株は、PL16B と PL16T は、2% ウシ胎児血清 (FBS) 添加 MCDB153HAA 培地 (Wako, Osaka, Japan) 、PC9 は、10% FBS 添加 RPMI1640 (Life Technologies, CA) 培地、A549 は、10%FBS 添加 DMEM/F12

(Life Technologies) 培地を用い、二酸化炭素 (CO₂) 濃度 5%、37°Cの条件で維持した。

2-1-2. Western blotting

氷冷下で全細胞溶解液を調整し、プロテアーゼ阻害薬を添加した M-PER (Life Technologies) を用いて whole cell lysate としてタンパク質を抽出した。抽出したタンパク質の総量を、BCA protein assay kit (Life Technologies) を用いて定量し、20 µg を 10% ミニプロテインプレキャストゲル (BioLad, CA) にアプライした。200 mV、定電圧で電気泳動を行ったのち、polyvinyliden difluoride (PVDF) 膜に転写した。CypA の一次抗体には、後に記述する外科的切除例の肺腺癌組織を用いた免疫組織化学で使用した抗体と同一 Lot の、ウサギポリクローナル抗 cyclophilin A 抗体 (ab42408, Abcam, Cambridge, UK) を用いた。抗体の稀釈倍率や抗原抗体反応の条件の概要は、表 6 に示した。その後、Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Life Technologies) を用いた化学発光法で検出を行った。内部コントロールとして、β-actin を用い、マウスモノクローナル抗β-actin

抗体 (Sigma Aldrich, Tokyo, Japan) により同様の方法で検出した。

2-1-3. 肺癌細胞株への siRNA (siCypA) の導入

A549 を $6.0 \times 10^6/\text{mL}$ の密度で播種し、抗菌薬を含まない 10% FBS 添加 D-MEM 培地で一晚培養した。翌日、細胞を phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄し、OPTI-MEM reduced serum medium (Life Technologies) を培地として添加した。CypA 特異的 siRNA (Stealth RNAi, Life Technologies) (表 7) と、lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) を OPTI-MEM 内に加え、siRNA-lipofectamine 複合体を形成させるために、室温で 20 分間静置した。siRNA-lipofectamine 複合体を含む培地を細胞に添加し、siRNA の最終濃度を 20 nM とした。細胞株は、定常状態で 48 時間培養し、Western blotting を施行して siRNA の効果を確認した。陰性コントロールとして、Stealth RNAi. Negative Control Medium GCDuplex #2 (Life Technologies) を用いた。

2-1-4. 外科的切除症例と組織病理学的検討

予備解析で用いた症例と同様の、肺腺癌 198 例を用いた（表 4, 表 5）。

2-1-5. CypA の免疫組織化学

組織の脱パラフィンおよび水和を行ったのち、10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で 115°C、10 分間のオートクレーブによる熱処理抗原賦活を行った。染色には、自動免疫染色装置 (HISTOSTAINER 48A, Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) を用いた。組織切片は、peroxidase-blocking solution (DAKO REAL, Dako, Tokyo, Japan) で、室温・20 分間の内因性ペルオキシダーゼ阻害処理を行った。続いて、抗-cyclophilin A antibody (ab42408, Abcam, 表 6) を、室温・30 分間反応させた。続いて、二次抗体 (EnVision+ Dual link system: Dako, Tokyo, Japan) を室温・30 分で反応させた。免疫反応は、diaminobenzidine (DAB) で検出した。

2-1-6. 免疫組織化学の評価

CypA の免疫組織化学の染色性は、腫瘍細胞の細胞質に染色性が見られ

る場合を陽性とした。染色性は以下のように行った。まず、細胞質の染色性は、非腫瘍部の肺胞上皮細胞あるいは血管壁と比較して、0点：染色されていない、または、1点よりも弱い染色性、1点：非腫瘍部の肺胞上皮細胞と同程度の染色性が見られる、2点：1点と2点の中間の染色性、3点：血管壁と同等かそれ以上の強さの染色性、の4段階に評価された。続いて、各強度の染色性が占める割合が評価された。最終的に、 $0 \times$ (0点の領域の割合) + $1 \times$ (1点の領域の割合) + $2 \times$ (2点の領域の割合) + $3 \times$ (3点の領域の割合) = 最小0点～最大300点として、CypAのH-score⁴³を算出した。

2-1-7. Driver gene alternation との関連

EGFR 遺伝子変異は、外部検査機関 (LSI Medience Corporation, Tokyo, Japan) に委託し、PNA-LNA PCR clamp 法 (図7)⁴⁴で検索された。ALKの融合 oncoprotein は、ALK-iAEP キット (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) を用いた免疫組織化学で検索した。染色性の判定は、ALK-iAEP キットの添付文書、および日本肺癌学会・日本病理学会合同 ALK-IHC 精度管理ワーキンググループによ

るガイドライン（肺癌における ALK 免疫染色プラクティカルガイド）⁴⁵ に従って、腫瘍細胞における細胞質の陽性像が 80%を超えている場合（スコア 3）を陽性とした。それ以外の染色性（スコア 2：0% \geq 陽性腫瘍細胞率 > 50%，境界域；スコア 1：50% \geq 陽性腫瘍細胞率 > 0%，境界域；スコア 0：陽性腫瘍細胞なし，陰性）は、本研究では陰性とした。

2-1-8. 統計解析

統計学的解析は、予備解析と同様に、EZR および SPSS を用いて行った。

CypA の H-score の中央値により、CypA 高発現群 (CypA-H) と CypA 低発現群 (CypA-L) の 2 群に分類した。臨床病理学的因子と CypA 発現は χ^2 検定で検討した（期待値 5 未満の項目がある場合は、Fisher の正確検定を併用した）。 Kaplan-Meier 法で 5 年生存率の生存曲線を作製し、Log-Lank 検定を行った。また、有意な臨床病理学的因子を用いて単変量解析を行い、さらにその陽性だった因子を用いて Cox 比例ハザードモデル（強制投入法）を用いた多変量解析を行った。

2-2. 結果

2-2-1. 肺腺癌細胞株の Western blotting と免疫細胞化学的検討

CypA の免疫細胞化学染色では、非腫瘍性気管支上皮細胞 (PL16B) , 前浸潤性肺腺癌 (PL16T) 、および腺癌 (PC9 and A549) の細胞株のいずれでも陽性像が見られた (図 8A) 。 Western blotting では、いずれの細胞株からも、CypA に合致したバンド (18 kDa) が得られた (図 8B) 。 PL16B から得られた CypA のバンド、すなわち PL16B での CypA の発現は、他の 3 つの肺腺癌細胞株よりも相対的に弱かった。

A549 を用いて CypA 特異的 siRNA (siCypA) を導入したところ、CypA の発現が減弱した (図 8C) 。

2-2-2. 外科的切除材料における CypA の免疫組織化学

図 9 に外科的切除材料における CypA の免疫組織化学の、主な染色像を示す。染色性の CypA が核に陽性となる染色性が一部に見られたが、CypA は細

胞質タンパク質であるため、細胞質での染色性のみを検討の対象とした。CypA の H-score の中央値は、135 であり、これにより、97 例 (49.0%) が CypA-H に、101 例 (51.0%) が CypA-L に、それぞれ分類された (表 8)。

2-2-3. CypA の発現と、組織学的亜分類との相関

AIS は 28 例中 24 例 (85.7%)、MIA は 14 例中 10 例 (71.4%) が CypA-L に分類された (表 8)。一方、浸潤性腺癌 135 例中、CypA-L は 54 例 (40.0%) であり、81 例 (60.0%) が CypA-H に分類された。IMA は、21 例中 8 例 (38.1%) が CypA-H に分類された。

組織型別では、AIS から MIA、Lep、non-Lep と段階的に群別の平均 H-score が上昇した。各群の中央値と最大値および最小値は、AIS: (中央値 (最大値-最小値)) 100.0 (10 - 210), MIA: 107.5 (50 - 200), Lep: 135.0 (30 - 270), non-Lep 165 (0 - 280) であった。Kruskal-Wallis 検定を施行したところ、各群の中央値に有意差が認められた ($df = 3$, $\chi^2 = 28.70$, $P = < 0.001$)。Steel - Dwass 法による多重比較を行ったところ、Lep および non-Lep の CypA の H-score は、AIS の H-score より

も有意に高かった (AIS vs. Lep: $P = 0.004$; AIS vs. non-Lep: $P < 0.001$)。また、MIA と non-Lep の間にも有意差が見られた ($P = 0.003$)。MIA と Lep の間には有意差は見られなかった ($P = 0.107$)。

腫瘍周囲に含まれていた反応性肺胞上皮細胞 ($n = 5$) では、CypA の染色性は非腫瘍部の肺胞上皮細胞とほぼ同等の染色性だった (H-score 100: $1 + x$ 100% ; 図 11)。AAH ($n = 5$) も同様か、AIS に比べてわずかに弱い程度の染色性だった (H-score = 100: $1 + x$ 100%)。

2-2-4. CypA の発現と Driver gene の変化との関連

EGFR 変異の有無について、36 症例で情報が得られた。36 症例中、変異が検出されたのは 9 例 (25%) だった (表 8)。36 例中、小型腺癌が 17 例含まれていたが、EGFR の変異が検出された症例はなかった。ALK oncoprotein について 181 例で免疫組織化学的に検討が可能だった。ALK oncoprotein が検出された (陽性) 症例は 5 例 (2.8 %) だった (表 8)。

EGFR 変異症例と野生型 EGFR 症例の、各群の H-score (中央値 (最小値

—最大値)) は、EGFR 変異症例 : 190 (110 - 190) ; 野生型 EGFR 症例 : 110 (10 - 210)であった。症例数が少なく、統計的な検定力は強くはないものの、Mann-Whitney の U 検定を行ったところ、群間の中央値に有意差が認められた ($U = 209.0, P < 0.002$; 図 12A) 。一方で、ALK oncoprotein の有無と CypA の発現には、有意差は見られなかった (ALK oncoprotein 陽性症例 (中央値 (最小値—最大値)) : 110 (90 - 200) ; ALK oncoprotein 陰性症例 : 140 (0 - 280), $U = 381.5, P = 0.62$; 図 12B)) 。

2-2-5. CypA の発現と予後との関連

1) 肺腺癌全 198 例での解析

CypA-H と CypA-L の Kaplan-Meier 曲線を図 13 に示す。CypA-H 群の 5 年生存率は、CypA-L 群と比較して有意に不良だった (CypA-L : 79.5%, CypA-H : 57.2%, Log-Rank 検定, $df = 1, \chi^2 = 14.54, P < 0.001$) 。CypA との関連が有意であった臨床病理学的因子、および CypA-H、CypA-L についてそれぞれの単変量解析を行ったところ、性別 (女性 vs. 男性; Hazard ratio (HR): 1.72, 95% CI: 1.06 -

2.71, $P = 0.02$ 、組織型 (lepidic (AIS, MIA, Lep) vs. non-Lep; HR: 4.59, 95% CI: 4.59, 95% CI: 2.62 - 8.05, $P < 0.001$)、pStage 因子 (pStage I vs. II, III, IV; HR 3.60, 95% CI: 2.33 - 5.56, $P < 0.001$)、pT 因子 (pT1 vs. pT2, 3, 4; HR 3.37, 95% CI: 2.32 - 5.97, $P < 0.001$)、pN 因子 (pN0 vs. pN1, 2, 3; HR 3.97, 95% CI: 2.55 - 6.18, $P < 0.001$)、胸膜浸潤 (pl: pl0 vs. pl1, 2, 3; HR: 4.19, 2.71 - 6.48, $P < 0.001$)、血管侵襲 (V: V0 vs. V1; HR 1.95, 1.21 - 3.16, $P < 0.01$)、および CypA (CypA-L vs. CypA-H; HR: 2.31, 95% CI: 1.21 - 3.16, $P < 0.0001$) が有意な因子として選択された。単変量解析で有意となった因子を用いて多変量解析を (Cox 比例ハザード分析、強制投入法) 行ったところ、性別 (Hazard ratio (HR): 1.72, 95% 信頼区間 (95% CI): 1.06 - 2.71, $P < 0.001$)、組織型 (HR: 4.85, 95% CI: 2.47 - 9.52, $P < 0.001$) が有意な因子として選択された。また、pStage 因子に有意傾向 (HR: 1.59, 95% CI: 0.97 - 2.62, $P = 0.06$) が認められた。血管侵襲 (V: HR: 1.25, 95% CI: 0.73 - 2.12, $P = 0.41$) と、CypA (HR: 1.31, 95% CI: 0.81 - 2.13, $P = 0.23$) は、有意な因子ではなかった。なお、pT 因子、pN 因子、および胸膜浸潤 (pl) は、pStage 因子の決定に関与しており、共変量関係にあると考えられるため、多変量解析からは除外した。

2) 小型腺癌 100 例での解析

小型腺癌 100 例に絞って解析した場合の、CypA-H と CypA-L の Kaplan-Meier 曲線を、図 14 に示す。小型肺腺癌でも、CypA-H 群の 5 年生存率は、CypA-L 群と比較して有意に不良だった (CypA-L : 87.8%, CypA-H : 73.2%, Log-Rank 検定, $df = 1$, $\chi^2 = 11.20$, $P < .01$)。CypA との関連が有意であった臨床病理学的因子、および CypA-H、CypA-L についてそれぞれの単変量解析を行ったところ、組織型 (lepidic (AIS, MIA, Lep) vs. non-Lep; HR: 4.21, 95% CI: 1.66 - 10.66, $P < 0.001$)、pStage 因子 (pStage I vs. II, III, IV; HR: 3.11, 95% CI: 1.73 - 5.59, $P < 0.001$)、pT 因子 (pT1 vs. pT2, 3, 4; HR: 3.20, 95% CI: 1.70 - 6.01, $P < 0.001$)、および胸膜浸潤 (pI0 vs. pI1, 2, 3; HR: 4.54, 95% CI: 2.51 - 8.23, $P < 0.001$) が有意な因子として選択された。また、野口分類 (type A, B, C', C vs. type D, E, F) には有意傾向が認められた (HR: 2.77, 95% CI: 0.99-7.73, $P = 0.052$)。CypA は、有意な因子ではなかった (HR: 1.40, 95% CI: 0.76 - 2.55, $P = 0.27$)。単変量解析で有意となった因子を用いて多変量解析を (Cox 比例ハザード分析、強制投入法) 行ったところ、組織型 (HR: 2.17, 95% CI: 1.02 - 4.64, $P = 0.05$) と胸膜浸潤 (pI0 vs. pI1, 2,

3; HR: 2.16, 95%CI: 1.13 - 4.11, $P < 0.02$)が有意な因子となった。なお、全症例での解析時と同様に、pT 因子、pN 因子、および胸膜浸潤 (pI) は、pStage 因子の決定に関与しており、共変量関係にあると考えられるため、多変量解析では解析から除外した。

2-3. 考察

肺腺癌における CypA の発現が確認され、外科的切除された肺腺癌において、CypA の発現が予後不良に関連していることが示された。また、腺癌の組織学的進行に伴って、CypA の発現は上昇することが判明した。

CypA は、cyclophilin ファミリーの 1 つであり、広い種にわたって保存された遍在性のタンパク質である。CypA は、様々な生物学的機能を有していると考えられており、タンパク質の高次機能を形成する際のシャペロンタンパク質や、T 細胞の活性化に関与していることが知られている^{9, 10, 11, 12, 13, 14, 46}。CypA は、大動脈瘤や動脈硬化などの血管性疾患、糖尿病、ウイルス感染、アルツハイマー病などの様々な疾患にも関与していることが知られている。そして、様々な臓器の悪性疾患において、発現が亢進していると知られている¹⁵⁻²⁶。肺腺癌では、CypA が細胞増殖、細胞周期の促進、アポトーシスの阻害、および腫瘍細胞の遊走能や浸潤能の獲得に関与していることが知られている^{26, 28}。

本研究では、CypA の高発現が、肺腺癌の組織学的な進行に関連していた。AIS から浸潤癌へと組織学的な進行に伴って、CypA の発現が段階的に増大

したことは興味深い。また、MIA と Lep の間には、CypA の発現の差がなかった。

MIA は現行の WHO 分類で新設された概念である。野口分類 type A あるいは type B に類似した極めて予後良好と思われる初期の腺癌、すなわち野口分類 type C の中の、浸潤部分が限局的 type A, B (すなわち AIS) 並みの良好な予後が期待される症例 (type C')⁴⁷ が見出されることを基に新設された。我々の結果から、CypA の発現は、MIA に至った段階で Lep との差がなくなっていることを示している。したがって、CypA の発現の上昇は、肺腺癌の進行の中でも初期段階の、特に AIS が MIA に移行する段階に重要な役割を担っている可能性を示唆している。

今回の結果からは、CypA の高発現が、予後不良に関係していることが示された。先行研究では、CypA の NSCLC における CypA の発現の亢進が見出されたが²⁹、肺腺癌における CypA の発現の意義は不明瞭なままだった。その一方で、本研究では、肺腺癌における CypA の発現と臨床的な予後不良との関連が見出された。これは、先行研究²⁹が NSCLC の分類で様々な組織型をまとめて解析していたのに対して、本研究では、肺腺癌を WHO 分類および野口分類に基づ

いて詳細に組織学的診断および分類を行ったことを背景に得られた結果と考えられる。同時に今回の結果は、AIS、MIA、Lep、および non-Lep と、野口分類で示された肺腺癌の多段階的進行^{3,4}が反映された肺腺癌の詳細な組織学的分類が、肺腺癌の診療および研究において重要かつ有用であることを示している。

CypA の発現は、今回の研究では多変量解析で独立した予後因子には選択されなかったものの、進行癌を含めた全 198 例での単変量解析では有意な因子の 1 つであり、肺腺癌の予後予測因子としても何らかの役割を持っている可能性は未だ残っている。どのような独立因子と関連しているかは、今後の検討課題である。

また、今回は siRNA 導入による CypA の発現の抑制を確認したが、これに伴う増殖能や浸潤能、およびアポトーシス能の変化などの機能的な解析ができていない。したがって、現段階では、肺腺癌における CypA の発現は、機能的には関連が不明である。今後、肺腺癌における CypA の機能解析を行う必要がある。

第3章

肺腺癌における HIF-1 α の発現と CypA 発現との 関連および臨床病理学的検討

第2章では CypA が肺腺癌の組織学的進行に添って、段階的に上昇することを見いだした。CypA の発現の上昇をもたらす要因として、肺腺癌の多段階的進行における組織形態の推移から、低酸素の関与、すなわち HIF-1 α の肺腺癌における発現に注目し、免疫組織化学を用いて検討した。

3-1. 方法

3-1-1. 肺腺癌細胞株の培養条件

肺腺癌細胞株 A549 を用いた。培養条件は、第2章と同様に、10% FBS 添加 DMEM/F12 (Life Technologies) 培地を用い、CO₂ 濃度 5%、37°C の条件で維持した。

3-1-2. 塩化コバルトを用いた化学的低酸素状態での培養

上記の定常状態で semi-confluent まで培養した A549 を、PBS で十分に洗浄したのち、最終濃度 100 μ M の塩化コバルト二水和物 (cobalt (II) chloride: CoCl₂, ナカライタスク : 東京) を添加した 10%FBS 添加 DMEM/F12 培地に交換し、定常状態でさらに 24 時間培養した。対照条件では、等添加量の PBS を加えた 10%FBS 添加 DMEM/F12 培地を用い、CoCl₂ 添加条件と同時に、同条件で培養した⁴⁸。

3-1-3. Western blotting

氷冷下で、プロテアーゼ阻害薬を添加した NE-PER (Life Technologies) を用いて核タンパク抽出物し、HIF-1 α の検出に用いた。また、2-1-2. Western blotting に記載の方法と同様に、whole cell lysate でのタンパク質の抽出も行い、CypA の検出に用いた。タンパク質の定量、泳動、PVDF 膜への転写、および化学発光法によるバンドの検出は、2-1-2. Western blotting と同様の方法で行った。一次抗体には、表 6 に示した条件で各種抗体を用い、抗原抗体反応を行った。

3-1-4. 外科的切除症例

予備解析と同様の、198 例の肺腺癌症例を用いた。(表 4, 表 5)

3-1-5. HIF-1 α の免疫組織化学

抗原賦活には、TE buffer pH 9.0 を用い、120°C、10 分間のオートクレーブによる熱処理抗原賦活を行った。一次抗体には、3-1-3. Western blotting と同じ、マウスモノクローナル抗 HIF-1 α 抗体 (GT-10211, GeneTex, CA, 表 6) を用いた。それ以外の手続きは、2-1-5. CypA の免疫組織化学と同様に行った。

3-1-6. 免疫組織化学の評価

HIF-1 α の免疫組織化学の染色性は、腫瘍細胞の核に染色性が見られる場合を陽性とした。染色性の半定量解析は、Allred score⁴⁹を用いて、以下のように行った。まず、核陽性像が見られる範囲を、0 点：染色されていない、1 点：全体の 1%未満、2 点：1%-10%未満、3 点：10%-1/3 未満、4 点：1/3-2/3 未満、5 点：2/3 以上、の 5 段階に評価した (proportion score: PS)。続いて、染色性の強

さを、0点：陰性、1点：弱陽性（陰性ではないが、かすかな陽性像）、2点：中間陽性（1点と3点の間）、3点：強陽性（陽性コントロールとして同時に染色した淡明細胞型腎細胞癌の腫瘍細胞の核と同等か、それ以上）、の3段階に評価した（intensity score: IS）。最終的に、PSとISを足してtotal score (TS)とした。この評価を、腫瘍の中心部と腫瘍の辺縁部の領域でそれぞれ行った。

3-1-7. Driver gene alternation との関連

2-1-7. Driver gene alternation との関連に記載の方法と同様に行った。

3-1-8. 統計解析

2-1-8. 統計解析と同様に解析した。CypA (CypA-H, CypA-L)と HIF-1 α (陽性, 陰性) の関連については、 χ^2 検定と Cramer の連関係数を算出して検討した。

3-2. 結果

3-2-1. 肺腺癌細胞株の Western blotting と免疫細胞化学

CoCl₂ 添加条件 (CoCl₂ +) と、コントロール条件 (CoCl₂ -) の western blotting の結果を図 15 に示す。CoCl₂ + で、HIF-1 α のバンドがより強く検出された。同時に、CypA の発現も上昇した。A549 のセルブロックを用いた免疫細胞化学では、CoCl₂ +、CoCl₂ - のどちらの条件でも、HIF-1 α の陽性像が見られた。

3-2-2. 外科的切除材料における HIF-1 α の免疫組織化学

図 16 に外科的切除材料における HIF-1 α の免疫組織化学の、主な染色像を示す。肺腺癌における染色パターンは、次の 4 型に分かれた。すなわち、HIF-1 α の染色性は、I 型：腫瘍辺縁部・中心部のいずれも陰性、II 型：腫瘍辺縁部が HIF-1 α 陽性、腫瘍中心部は陰性、III 型：腫瘍の辺縁部・中心部のいずれも陽性、IV 型：腫瘍中心部が陽性、辺縁部は陰性の 4 パターンが見られた (表 11, 図 16, 図 17)。これを基に、各症例は、HIF-1 α 陰性 (I 型：119 例, 60.1%) と、HIF-1 α 陽性 (合計 79 例 (39.9%) ; II 型：12 例 (6.1%), III 型：34 例 (17.2%), IV 型：33

例 (16.7%)) に分類された (表 11) 。さらに、腺癌の組織型 (AIS、MIA、Lep、および non-Lep) ごとにパターンを詳しく分類すると、HIF-1 α 陽性である II, III, および IV 型のうち、AIS と MIA での II~IV は少数だった。一方で、Lep および non-Lep、すなわち浸潤性腺癌では、陰性症例の割合が減少し、陽性症例が増加した。Lep では III 型の陽性像が最大の割合となった。non-Lep では III 型にかわって IV 型が増加した。陰性である IV 型には AIS と MIA のほぼ全例が含まれた。 ($\chi^2 = 20.45, P = 0.015$; 表 12A, 図 18) 。

小型肺腺癌でも、組織型ごとの、各染色パターンの割合は、全 198 例での解析と同様の傾向が認められた (表 12B, 図 19) 。野口分類 type A~type C' ではほとんどの症例が HIF-1 α 陰性 (I型) となった。特に type A は 9 例全例 (100%) が陰性だった。type C と type D では II 型~IV 型の各パターンに分散し、type C では III 型が最大の割合となったが、type D では IV 型の割合が増加した ($\chi^2 = 26.77, P = 0.03$; 表 12B, 図 19) 。

臨床病理学的因子では、組織型、野口分類、T 因子 (pT) 、リンパ管侵襲 (Ly) 、静脈侵襲 (V) 、および CypA の発現が、有意な因子となった (表 13) 。

腫瘍周囲に含まれていた反応性肺胞上皮細胞 (n = 5) 、および AAH (n = 5) はいずれも HIF-1 α 陰性だった。

3-2-3. HIF-1 α の発現と Driver gene の変化および CypA との関連

EGFR 変異陽性は HIF-1 α の発現と有意な関連があった (χ^2 検定, df = 1, $\chi^2 = 5.40$, $P = 0.02$; 表 12) 。なお、今回の症例に含まれる EGFR 変異陽性の 9 症例 (Lepidic: n = 4, Acinar: n = 2, Solid: n = 3) では、HIF-1 α 陽性は 7 例 (77.8%) であり、陽性の内訳は、II 型 (Solid: 1) 、III 型 (n = 3; Lepidic : n = 3) 、IV 型 (n = 3; Lepidic: 1, Acinar: 1, Solid: 1) だった。ALK oncoprotein と HIF-1 α には有意な関連はなかった。

CypA の発現 (高発現 : CypA-H, 低発現 : CypA-L) と HIF-1 α の発現の関連では、CypA-H の 97 例のうち、50 例 (51.5%) が HIF-1 α 陽性だった。CypA-L 群の症例は、101 例のうち 29 例 (28.7%) が HIF-1 α 陽性だった。EGFR 変異と同様に、CypA の発現と HIF-1 α 陽性にも有意な関連が見られた (χ^2 検定, df = 1, χ

$\chi^2 = 10.76, P = 0.05$, 表 13)。

3-2-4. HIF-1 α の発現と予後との関連

1) 肺腺癌全 198 例での解析

HIF-1 α 陽性群と HIF-1 α 陰性群の Kaplan-Meier 曲線を、図 20 に示す。

HIF-1 α 陽性群と HIF-1 α 陰性群の 5 年生存率には、統計的な有意差は見られなかった (HIF-1 α 陽性: (生存率) 65.0%, (95% CI) 0.53 - 0.75 ; HIF-1 α 陰性: 71.2%, 0.62 - 0.79, Log-Rank 検定, $P = 0.390$)。HIF-1 α の染色パターンごとに群別して同様に解析を行ったが、有意差は見られなかった (I 型: (5 年生存率) 71.2%, (95% CI) 0.62-0.79; II 型: 83.3%, 0.48-0.96; III 型: 59.6%, 0.41-0.74; IV 型: 63.8%, 0.44-0.78, Log-Rank 検定, $P = 0.62$; 図 21)。

HIF-1 α との関連が有意であった臨床病理学的因子、および HIF-1 α の陽性・陰性について、それぞれの単変量解析を行ったところ、組織型 (Lepidic (AIS, MIA, Lepidic adenocarcinoma) vs. non-Lepidic; HR: 4.59, 95% CI: 2.62 - 8.05, $P < 0.001$)、pT 因子 (pT1 vs. pT2, 3, 4; HR: 3.73, 95% CI: 2.32 - 5.97, $P < 0.001$)、胸

膜浸潤 (pI0 vs. pI1, 2, 3; HR: 4.19, 95% CI: 2.71 - 6.48, $P < 0.001$)、血管侵襲 (V0 vs. V1; HR: 1.95, 95% CI: 1.21 - 3.16, $P = 0.01$)、および CypA (CypA-H vs. CypA-L; HR: 2.31, 95% CI: 1.46 - 3.65, $P < 0.001$) が有意な因子として選択された (表 14)。

HIF-1 α は有意な因子ではなかった (Negative vs. Positive; HR: 1.09, 95% CI: 0.70 - 1.69, $P = 0.70$)。単変量解析で有意となった因子を用いて多変量解析 (Cox 比例ハザード分析、強制投入法) を行ったところ、組織型 (HR: 2.17, 95% CI: 1.02 - 4.64, $P = 0.05$)、および胸膜浸潤 (HR: 2.16, 95% CI: 1.13 - 4.11, $P = 0.02$) が有意な因子として選択された。CypA は有意傾向が認められたが (HR: 1.49, 95% CI: 0.92 - 2.40, $P < 0.10$, 表 14)、多変量解析では有意な因子ではなかった。

2) 小型腺癌 100 例での解析

小型肺腺癌での HIF-1 α 陽性群と HIF-1 α 陰性群の Kaplan-Meier 曲線を、図 22 に示す。小型肺腺癌でも、HIF-1 α 陽性群と HIF-1 α 陰性群の 5 年生存率には、統計的な有意差は見られなかった (HIF-1 α 陽性: (生存率) 85.8%, (95% CI) 0.75 - 0.92; HIF-1 α 陰性: 70.6%, 0.48 - 0.85, Log-Rank 検定, $P = 0.22$)。HIF-1 α の染色パターンごとに群別して同様の解析を行ったが、有意差は認められなかつ

た (I 型 : 85.8%, 0.75 - 0.92 ; II 型 : 75.0%, 0.13 - 0.96 ; III 型 : 58.3%, 0.23 - 0.82 ; IV 型 : 80.0%, 0.41 - 0.95, Log-Rank 検定, $P = 0.40$; 図 23) 。

小型腺癌 100 例での単変量解析では、組織型 (HR: 4.21, 95% CI: 1.66 - 10.66, $P < 0.001$)、pT 因子 (HR: 3.20, 95% CI: 1.70 - 6.01, $P < 0.001$)、および胸膜浸潤 (HR: 4.54, 95% CI: 2.51 - 8.23, $P < 0.001$) が有意な因子として選択された (表 15)。小型肺腺癌 100 例においては、CypA (HR: 1.40, 95% CI: 0.76 - 2.55, $P = 0.27$) と HIF-1 α (HR: 1.30, 95% CI: 0.69 - 2.48, $P = 0.42$) は、単変量解析の時点で有意な因子ではなかった。単変量解析で有意となった因子を用いて多変量解析 (Cox 比例ハザード分析、強制投入法) を行ったところ、胸膜浸潤 (HR: 3.83, 95% CI: 1.47 - 9.97, $P = 0.01$) のみが有意な因子として選択された。また、組織型に有意傾向が認められた (HR: 2.14, 95% CI: 0.82 - 7.08, $P = 0.10$) (表 15)。

3-2-5. EGFR 遺伝子変異および CypA の発現と

HIF-1 α 発現の相関

EGFR 変異 (変異なし vs. 変異あり) と HIF-1 α の発現 (HIF-1 α 陽性、

HIF-1 α 陰性) には、有意な関連があり ($\chi^2 = 4.25, P = 0.04$: 表 13) 、Cramer の
連関係数の算出を行ったところ、両者に有意な相関があると判定された
(Cramer's $V = 0.387, P = 0.020$) 。

CypA の発現 (CypA-H vs. CypA-L) と HIF-1 α の発現 (HIF-1 α 陽性、
HIF-1 α 陰性) には、有意な関連があり ($\chi^2 = 8.53, P < 0.001$: 表 13) 、Cramer
の連関係数の算出を行ったところ、両者に有意な相関があると判定された
(Cramer's $V = 0.147, P = 0.039$) 。

3-3. 考察

肺腺癌細胞株において、HIF-1 α の発現と、CoCl₂によって誘導される化学的低酸素状態での、HIF-1 α の検出量の上昇を確認した。また、CypA も HIF-1 α と同時に発現が上昇した。肺腺癌における HIF-1 α と CypA との発現に関連があると考えられた。なお、Western blotting および cell block を用いた免疫組織化学のいずれでも、対照群でも比較的明瞭な HIF-1 α の発現が見られた。少なくとも今回使用した A549 においては、定常状態でもある程度の HIF-1 α の発現があると考えられ、腺癌に関与している HIF-1 α の発現を厳密に検討するには、A549 以外の複数の細胞株を用いるなど、さらに解析が必要である。

本研究の外科的切除材料での検討では、HIF-1 α の発現は、進行腺癌の組織型（Lep vs. non-Lep；すなわち上皮内腫瘍あるいは上皮内増殖が優勢な置換型腺癌 vs. 浸潤性腺癌）に関連していた。このほか、HIF-1 α 陽性・陰性の関連の上で有意な臨床病理学的因子には pT 因子、胸膜浸潤、血管侵襲、およびリンパ管侵襲と共に CypA の発現が含まれていた。HIF-1 α の発現自体は予後との関連はなく、HIF-1 α は予後因子としては選択されなかった。HIF-1 α の肺癌 (NSCLC)

での発現が予後不良に関連していることは、先行研究^{35, 36, 37}ですでに報告されているが、腺癌を用いた本研究では予後との関連を見出せなかった。

今回の結果で興味深いのは、HIF-1 α の染色パターンの推移である。早期の組織型 (AIS および MIA) では、ほとんどの症例で HIF-1 α 陰性だった (I 型)。一方で、進行した組織型になると、HIF-1 α 陽性症例 (II, III, および IV 型) が増加した。Lep では、III 型 (腫瘍辺縁部、中心部ともに HIF-1 α 陽性) の割合が多かったが、non-Lep では、III 型に代わって、IV 型 (腫瘍中心部が HIF-1 α 陽性、辺縁部は陰性) の割合が増加した。小型の早期肺腺癌で検討しても同様の傾向があり、type A から type C' まではほとんど陰性であるのに対して、type C では III 型、あるいは IV 型の陽性像が多くなった。さらに type D では、IV 型が増加した。HIF-1 α は、主に浸潤癌で発現し、浸潤癌の辺縁や中心部に広く HIF-1 α が陽性となり、さらに低分化な腺癌になると、腫瘍の中心部に陽性像が推移する可能性がある。

少数ながらも AIS、MIA、および type B で III 型と IV 型となった症例の組織形態を再検討すると、病変部内の肺胞構造の虚脱や、腫瘍の間質の肥厚が

強く生じた症例だった。すなわち、これらの症例は早期の腺癌であっても腫瘍内が低酸素状態になっていた（あるいはそれに近い状態になっていた）ため、HIF-1 α 陽性となったと考えられる。同様に、non-Lep や type D で IV 型が多かったのは、腫瘍の浸潤による肺胞構造の破壊と充満からくる低酸素状態のため、HIF-1 α が陽性となったと考えられる。

II 型や III 型にみられる腫瘍辺縁の HIF-1 α 陽性像は、現段階では説明が難しい。いずれの組織型においても、辺縁部には置換型増殖の腺癌成分が存在している。症例によって割合に差があるが、組織形態としては、気腔を有する腫瘍細胞の置換型増殖である。したがって、II 型や III 型の腫瘍辺縁での陽性像を、組織形態や低酸素を原因として説明する事は難しい。あるいは、腫瘍辺縁で陽性となる HIF-1 α は、低酸素以外の要因によって誘導されている可能性も考えられる。

低酸素以外に HIF-1 α を誘導する要因として、EGFR 遺伝子の変異が挙げられる。Phillips ら (2005)⁵¹ は、本研究でも用いた肺癌細胞株、A549 を用い、肺癌や乳癌など、様々な腫瘍で腫瘍の転移に関連が深い CXC chemokine receptor

4 (CXCR4) が低酸素下で発現上昇する現象には、(EGF の添加によって誘導される) EGFR の過発現、HIF-1 α の発現の上昇を伴った phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT シグナル経路の働きが関与していることを報告した。EGFR の活性化は、HIF-1 α の発現の上昇をもたらし、A549 を用いた western blotting で HIF-1 α の検出量が増大した。

Signal Transducers and Activator of Transcription 3 (STAT3) による、interleukin-6/Janus activating kinase/STAT3 (IL-6/JAK/STAT3) シグナル経路を介した HIF-1 α の発現の調節も知られている。STAT3 は、HIF-1 α の C 末端に結合することで、pVHL による HIF-1 α のユビキチン化を阻害し、HIF-1 α 安定化（半減期の延長）をもたらす⁵²。その結果、HIF-1 α の発現が上昇する。癌細胞では、interleukin-6 (IL-6) からのシグナル伝達で STAT3 が活性化されていることが報告されている⁵³。活性化した STAT3 は、cyclinD1 や cMyc の発現を亢進させ、癌細胞の増殖能や浸潤能を高める。なお、STAT3 も EGFR 遺伝子変異との関連が知られており、EGFR 遺伝子変異 (deletion of exon 19 あるいは exon21 L858R) のある多くの肺腺癌では、IL-6 の発現の上昇があり、リン酸化 STAT3 (pSTAT3)

が免疫組織化学的に検出される⁵⁴。EGFR 変異陽性肺腺癌では、IL-6/JAK/STAT3 シグナル経路を介した HIF-1 α 発現の上昇が生じていると推定される。

先行研究から、肺腺癌の辺縁部において、低酸素以外の要因によって HIF-1 α が誘導されていると仮定すれば、その背景には EGFR 遺伝子変異が重要な役割を担っていると考えられる。本研究に含まれている EGFR 変異陽性症例でも、HIF-1 α 陽性症例の割合は、全体の割合より大きかった（全体：39.9%, 79/198 例 , EGFR 変異陽性症例：7/9 例, 77.8%）。ただし、今回の症例群では EGFR 遺伝子変異陽性が確認されているのは 9 症例のみであり、現段階では統計学的検定を含めて詳細な検討が難しい。また、EGFR 遺伝子変異を踏まえた考察は、9 症例を除いた、そのほか 189 例の EGFR 変異陰性あるいは未検索の症例に当てはめることができず、部分的にしか HIF-1 α の腫瘍辺縁での陽性像を考察することができない。

以上のように、本研究では、肺腺癌における HIF-1 α の発現について、腺癌の多段階的進行に伴って、腫瘍内での HIF-1 α の発現が変化している可能性を示唆した。肺腺癌における HIF-1 α の発現の時間的・空間的な検討は、今までに

報告がない。今後、さらに症例数を増やして詳細に検討していく必要がある。

特に、より多数の EGFR 変異陽性肺腺癌を用いての検討が興味深いと考えられる。肺腺癌の細胞株を用いて、肺腺癌における HIF-1 α の機能解析もさらに進める必要がある。

HIF-1 α と CypA の肺腺癌での関係性については、CypA の発現が MIA の時点ですでに置換型の浸潤癌と差がない程度まで上昇していたのに対し、HIF-1 α の陽性症例が増加するのは浸潤癌以降だった。肺腺癌では、CypA の発現の亢進の方が、HIF-1 α の誘導よりも時間的に先行していることが示唆される。肺腺癌での CypA の発現の亢進は、HIF-1 α による発現の調節のみでは説明できない部分があり、CypA の発現の亢進には、HIF-1 α 以外の別の要因が関与していると推定される。

第4章

総合的な考察

本研究では、肺腺癌における cyclophilin A (CypA) と hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1 α) の発現に注目し、最新の WHO 分類と、早期肺腺癌の野口分類に基づいた詳細な組織病理学的分類（組織形態）を背景としてそれぞれを検討した。

まず、研究に用いた 198 例の肺腺癌を、WHO 分類と野口分類を併用して詳細な組織病理学的分類を行った。WHO 分類で示されているように、組織形態自体が予後に関連しており、腺癌の組織学的な多段階的進行が確認できた（予備解析）。

次に、肺腺癌における CypA の発現を検討した（第2章, 研究1）。CypA は、肺腺癌の前癌病変である AAH でもすでに発現が亢進しており、肺腺癌の初期進行に関連するタンパク質の一つと期待できると考えた。AAH だけでなく、

AIS、MIA、および浸潤性腺癌の、幅広い進行段階の肺腺癌で、免疫組織化学を用いて CypA の発現を比較検討した。

肺腺癌における CypA の発現を、細胞株を用いた *in vitro* で解析した。

CypA の発現は、肺腺癌の組織学的進行に伴って段階的に上昇した。AIS での CypA の発現は、浸潤性腺癌のすべての組織型より有意に低かった。AIS と MIA における CypA の発現に有意差は認められなかった。一方で、MIA は進行した形態の腺癌 (non-Lep) よりは発現が低かったが、置換型腺癌 (Lep) とは、CypA の発現に統計学的有意差は認められなかった。MIA は、「浸潤巣が極めて限局的で AIS 並みの予後が期待される腺癌」をコンセプトに、AIS と浸潤性腺癌をリレーする位置に設けられている。CypA の発現が、AIS と MIA との間ですでに差異が生じていたことは重要な結果である。CypA が肺腺癌の初期進行に関与している可能性が、組織学的に示唆された。さらに、CypA の発現は独立した予後因子としては選択されなかったものの、CypA の発現が高発現の群は、低発現の群よりも有意に予後不良だった。これまで CypA の発現は NSCLC では予後との関連は不明とされてきたが、本研究では、CypA の発現の亢進が肺腺癌の予後

不良と関連している事を見出した。

第3章(研究2)では、肺腺癌の組織学的な多段階的進行に伴って、組織形態から気腔が失われていく事、すなわち低酸素状態を引き起こす組織形態になっていることが推測されることから、肺腺癌における HIF-1 α の発現について解析した。興味深いことに、CypA の発現調節には HIF-1 α の関与も知られており、HIF-1 α が肺腺癌における CypA の上昇をもたらす要因の1つとして考えられた。

肺腺癌細胞株における HIF-1 の発現を *in vitro* で確認し、かつ、CoCl₂ 添加によって化学的に誘導した低酸素条件下で、HIF-1 α の検出量の増加を確認した。同時に、CypA の発現も亢進していることを確認した。外科手術材料での免疫組織化学では、HIF-1 α の陽性像の染色パターンを基に4型(I型:陰性、II型:腫瘍の辺縁部で HIF-1 α 陽性、中心部では陰性、III型:腫瘍の辺縁部、中心部の両方で HIF-1 α 陽性、IV型:腫瘍の中心部で HIF-1 α 陽性、辺縁部は陰性)に分類した。HIF-1 α の発現は、早期癌(AIS、MIA)ではほとんど陰性(I型)だったが、浸潤性腺癌では陽性症例が増加し、Lep では III型や IV型が多く、non-Lep

では IV 型が増加した。すなわち、肺腺癌における HIF-1 α の発現は、組織学的な多段階的進行に伴って局在が推移している可能性が考えられた。HIF-1 α の発現自体は、予後にとの関連がなかった。CypA と HIF-1 α との関連については、CypA の発現が MIA と置換型の浸潤癌との間にはすでに差がなかったのに対し、HIF-1 α の発現は AIS・MIA ではほとんど陰性で、浸潤癌から陽性症例が増加した。すなわち、肺腺癌での CypA の発現の亢進は、HIF-1 α が陽性となるよりも早い段階から生じていると考えられた。肺腺癌の CypA の発現が亢進するメカニズムは、HIF-1 α による調節では説明できない部分があり、HIF-1 α 以外の別の要因も存在することが示唆された。

なお、本研究の結果は、WHO 分類と野口分類による肺腺癌の詳細な組織病理学的分類が大きく貢献した。肺腺癌の組織学的分類は、それ自体が明瞭に予後に関連している。肺腺癌の悪性化を理解し、新たな予後因子の探索のためには、肺腺癌の組織形態に基づく詳細な分類を基礎とすることが極めて有用であると考えられた。

今後は、肺腺癌での CypA の機能解析をさらに進める必要がある。HIF-1 α

については、今回用いた症例群では免疫組織化学での HIF-1 α 陽性症例が多くな
く、肺腺癌での、HIF-1 α の発現パターンの変化、特に腫瘍辺縁で生じていると
推定される HIF-1 α の低酸素以外での誘導のメカニズムについては、現段階では
統計学的検定や考察が十分ではない。EGFR 遺伝子変異も HIF-1 α の発現の重要
な要因である可能性があり、EGFR 変異陽性症例を含め、HIF-1 α 陽性症例をさら
に増やして、肺腺癌における HIF-1 α の発現と機能解析を引き続き検討したい。

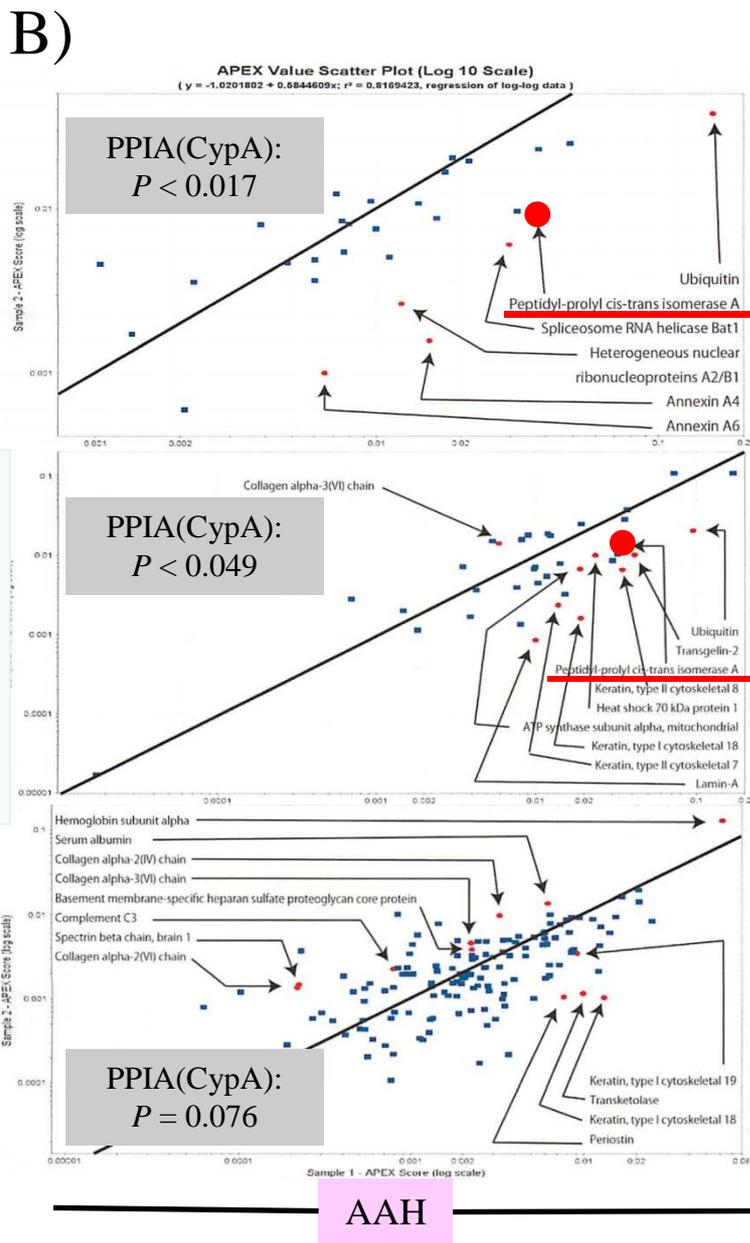
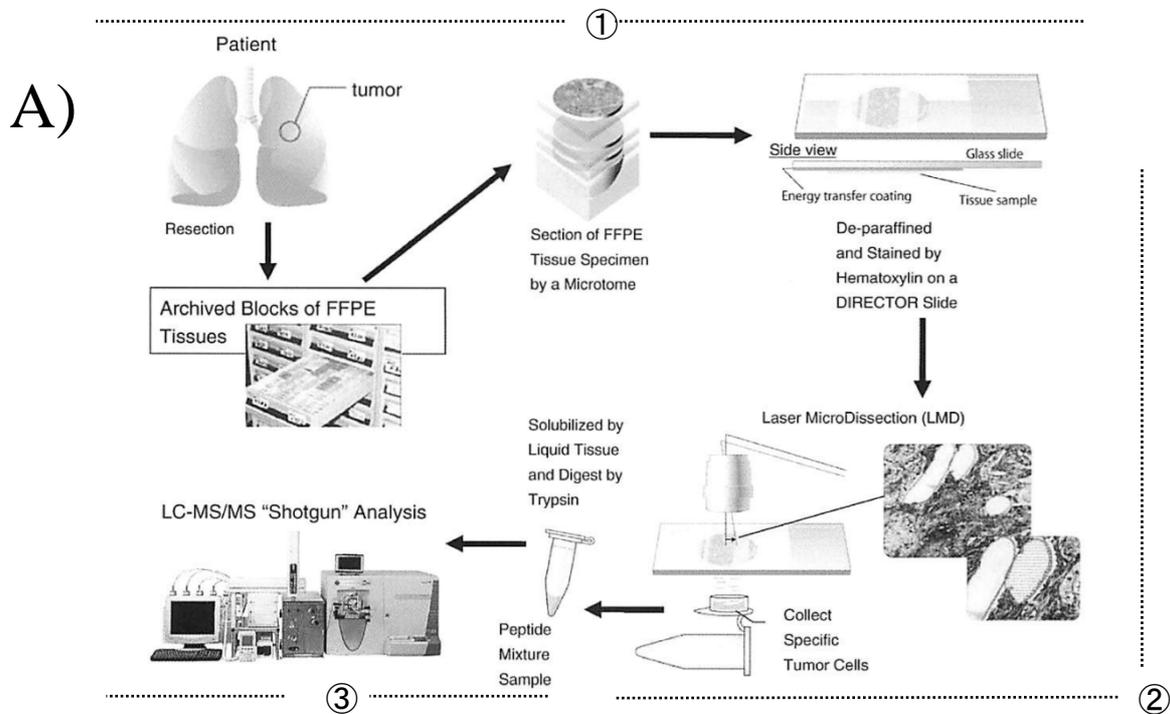


図1 プロテオミクスによるAAHと正常末梢肺組織におけるCypAの発現解析(文献8より引用・改変)

A)解析の流れ

- ①ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)標本の組織切片を製作する。
- ②Laser micro dissection (LMD)により、病変部の組織のみを切片から回収する。
- ③トリプシン処理により蛋白質をペプチドに断片化し、液体クロマトグラフィ(Liquid chromatography: LC)で分離したのち、タンデム質量分析(ms/ms)で蛋白質を同定する。

B) AAH vs 正常末梢肺組織での蛋白発現量の半定量的解析 (n=3, X軸: AAH, Y軸: 正常末梢肺組織)

3例中2例で、AAHでのCypAの発現量が、末梢肺組織と比べて有意に高かった。また、残り1症例でもCypAの発現量に有意傾向があった。CypAは、3例に共通して有意差ないし有意傾向が見られた。

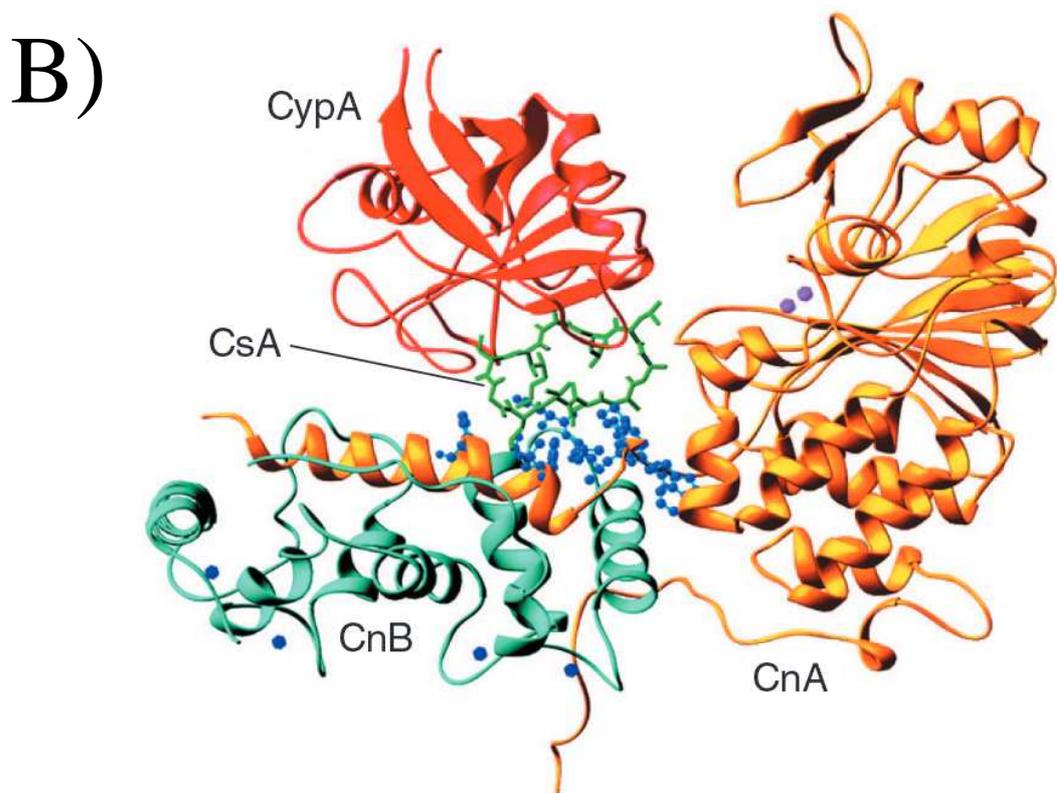
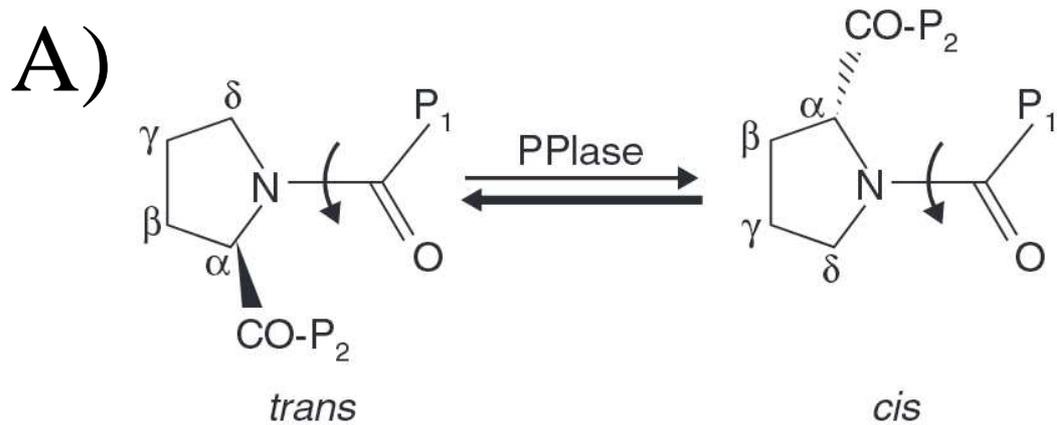
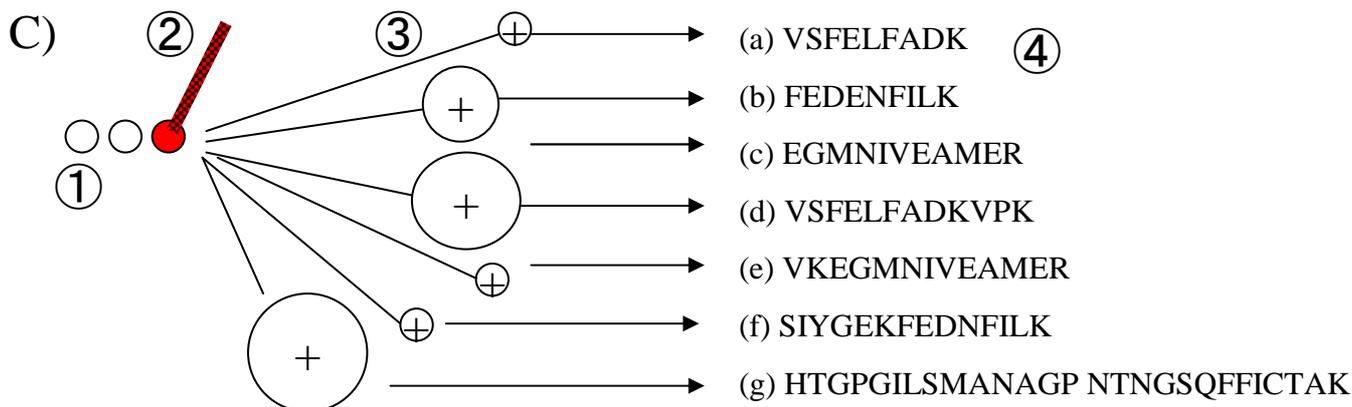
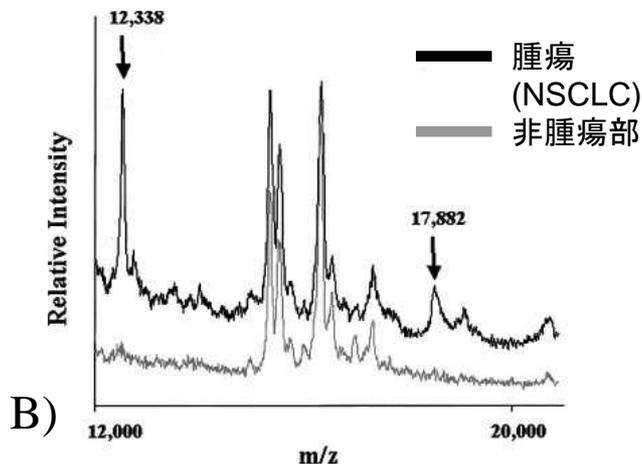


図2 CypAの機能と構造(文献9)

A) CypAは、蛋白質のtrans体からcis体への移行を触媒する。

B) CypAは、Cyclosporine A(CsA)と複合体を形成しcalcineurinを抑制する(CnA: catalytic subunit of calcineurin, CnB: regulatory subunit of calcineurin)。

これらの機能は、最初別々に報告され、Aの機能を有する蛋白質がpeptidyl-prolyl isomerases (PPIase)、Bの機能を有する蛋白質がcyclophilinと呼ばれていた。現在では、同じ蛋白質である事がわかり、peptidyl-prolyl isomerase A(PPIA)とcyclophilin A(CypA)は同義語として考えられている。



Cyclophilin A (NP_066953.1)

MVNPTVFFDIAVDGEPLGRVVSFELFADKVPKTAENFRALSTGEKGFYKGSCHFRIIPGFMC

- D) (a) VSFELFADK
 (d) VSFELFADKVPK

QGGDFTRHNGTGGKSIYGEKFEDENFILKHTGPGILSMANAGPNTNGSQFFICTAKTEWLD

- (b) FEDENFILK
 (f) SIYGEKFEDENFILK
 (g)

HTGPGILSMANAGPNTNGSQFFICTAK

GKHVVFGKVKEGMNIVEAMERFGSRNGKTSKKITIADCGQLE

- (c) EGMNIVEAMER

- (e) VKEGMNIVEAMER

図3 : MALDI-TOF MSによる肺癌(NSCLC)でのCypAの同定(文献24より引用・改変)

A) 解析された肺癌症例の1例(CT画像)。

B) 同症例のMALDI-TOF MS解析結果。腫瘍から得られた波形の12.338と17.882m/z値にピークが得られている。

C) MALDI-TOF MS解析の模式図。①組織溶解サンプル(tissue lysate)をイオン化されやすいマトリックスと混合し、②紫外レーザー照射によりイオン化する(matrix-associated laser deposition/ionization: MALDI)。次に、③それぞれのイオンがその質量(荷電量)に応じて有する運動エネルギーにより、飛行時間分析計を飛行し、質量が割り出される(time of flight: TOF型の、質量分析計(mass spectrometry: ms)、すなわちMALDI-TOF MS)。各質量のサンプルについて、④MS/MS解析によってペプチドのアミノ酸配列が解析される。

D) m/z値17.882のサンプルから得られたペプチドは、CypAのアミノ酸配列の40.6%と合致した。CypAの質量は約18kDaと知られていることも含めて、CypAと推定された。

E)

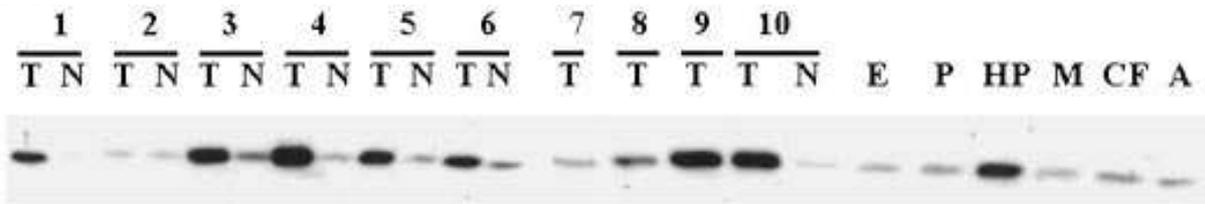


図3(続き) : MALDI-TOF MSによる肺癌(NSCLC)でのCypAの同定(文献24より引用・改変)

E) 解析された肺癌症例のサンプルを用いたCypAのwestern blotting (T: tumor, N: matched normal, E: emphysema, P: pneumonia, HP: hypersensitivity pneumonitis, M: melanoma, CF: cystic fibrosis and A: atelectasis)。CypAの高発現がみられる(matched tumor/normal pairs: 6/7例(1, 3-6, 10), nonmatched tumor lysates: 3例 (7-9)。肺癌以外では、過敏性肺炎(HP)でのCypA発現の上昇が目立つ。

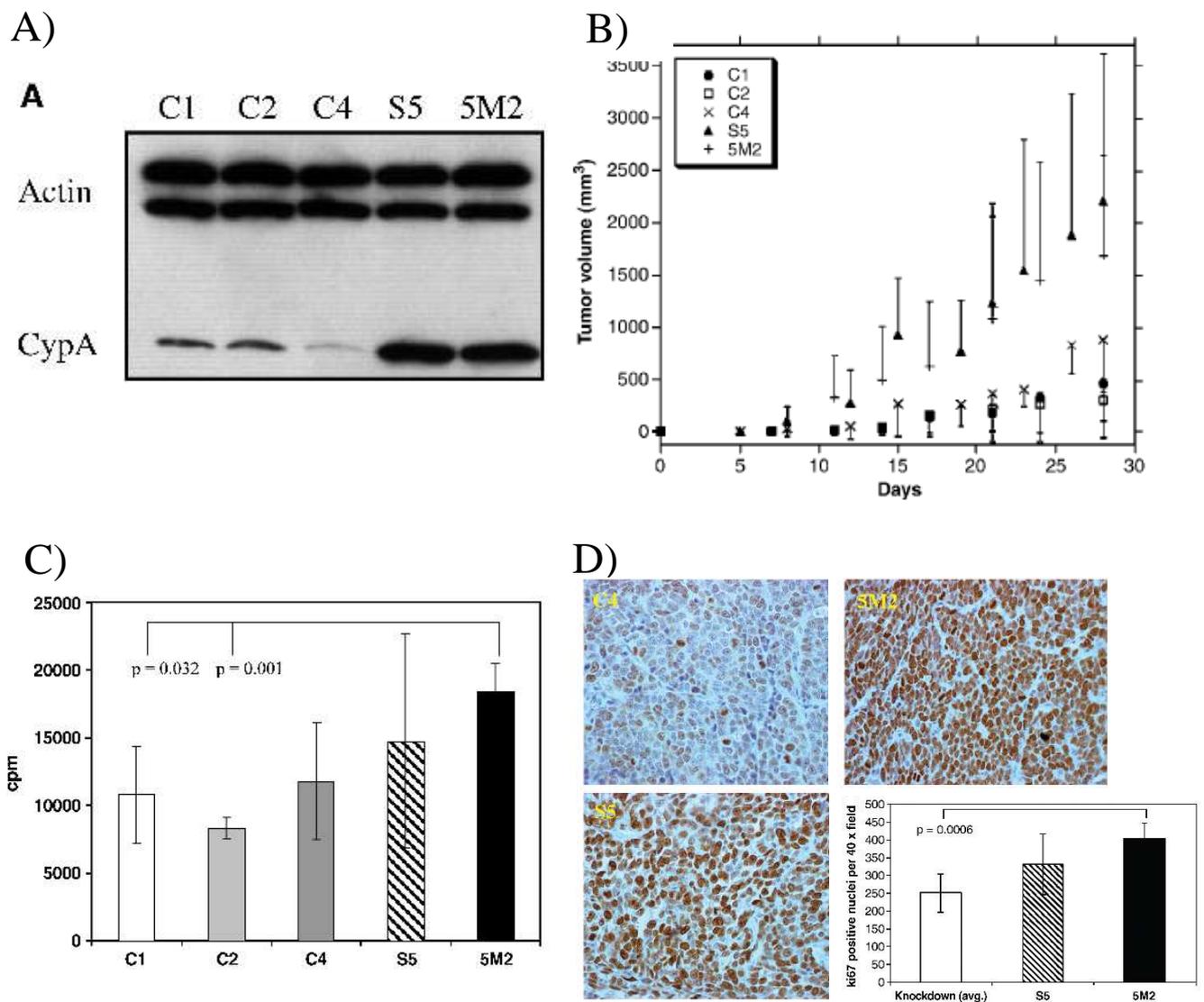


図4：肺癌(NSCLC)でのCypAの機能解析(文献25より引用・改変)

- A) 肺腺癌細胞株(ADLC-5M2: 5M2)でのsiRNAを用いたCypAの抑制。(C1, C2, C4 : siCypA, S5: scrambled clone, 5M2: parental clone)
- B) siCypAの腫瘍増大速度への影響 C1, C2, C4のクローンは、腫瘍増大速度が低下している。
- C) 5M2でのCypA抑制の細胞増殖への影響。C1, C2, C4の5M2は、トリチウムチミジン取り込み実験でのチミジン取り込み量(単位 cpm: counts per minutes)がS5や5M2と比べて有意に減少する。
- D) Ki-67の免疫細胞化学を用いたCypA抑制の細胞増殖に対する影響の検討 C4では、5M2と比較して、Ki-67陽性率が有意に低い

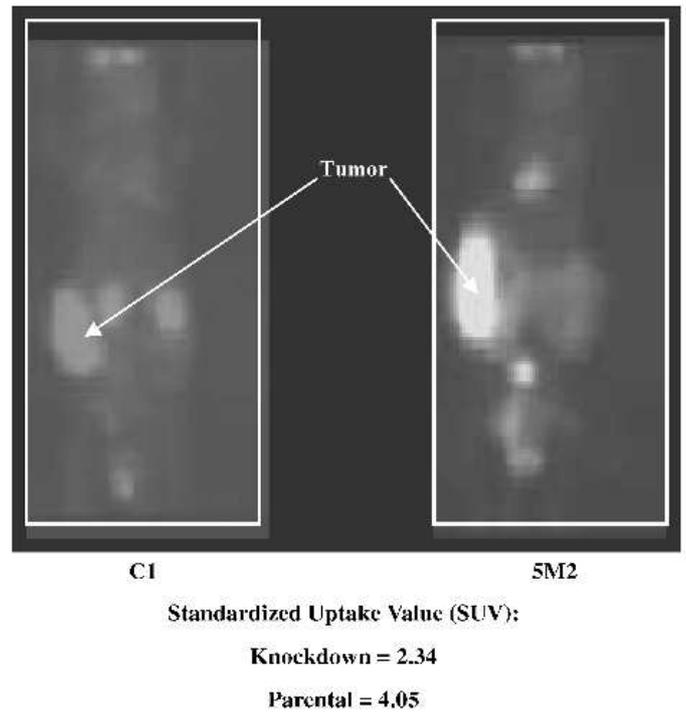
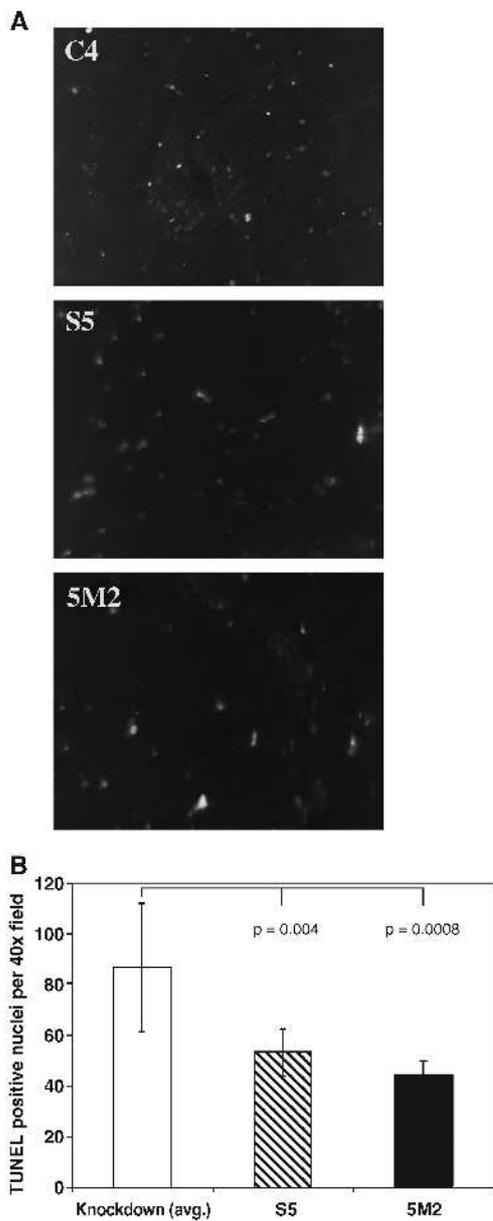


図4(続き)：肺癌(NSCLC)でのCypAの機能解析(文献25より引用・改変)

- E) 肺腺癌細胞株(ADLC-5M2: 5M2)でのCypAの抑制とアポトーシスとの関連(TUNEL法)。CypA knock down細胞では、TUNEL陽性の核が、S5(scrambled clone)と5M2よりも有意に多い。
- F) 免疫不全マウスに移植されたxenograftのFDG-PET。CypA抑制細胞(C1)のxenograftは、対照の5M2細胞に比べて、SUVの値が低い。

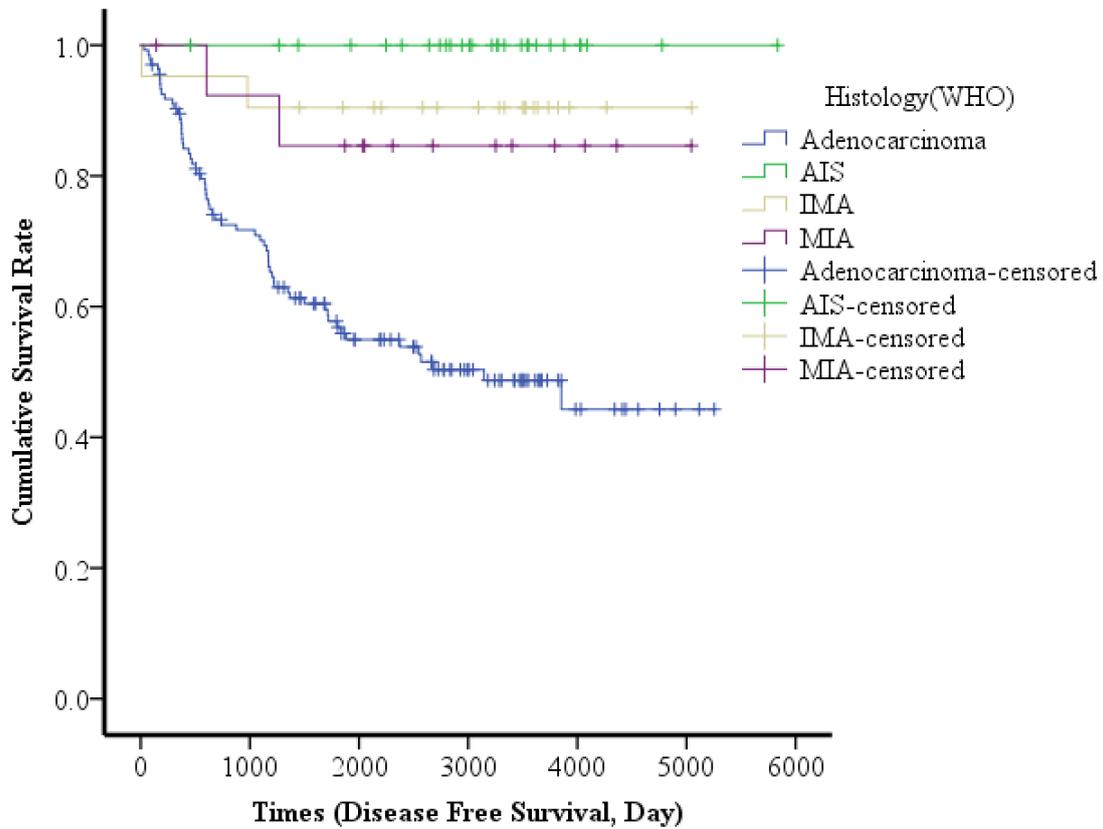


図 5：組織型別 (AIS, MIA, Adenocarcinoma, IMA) の予後曲線 (5年無病生存率, Kaplan-Meier 法)

それぞれの組織型の5年無病生存率 (disease free survival: DFS) は、AIS : 100%, MIA : 84.6%, Adenocarcinoma: 56.8%, IMA : 90.5%であり、Log-Rank 検定で有意差が見られた ($P < 0.01$)。Bonferoni 法による多重比較では、Adenocarcinoma の5年 DFS が、AIS および IMA と比較して不良だった。MIA の5年 DFS は、AIS、adenocarcinoma、および IMA のどの群とも有意差は見られなかった。

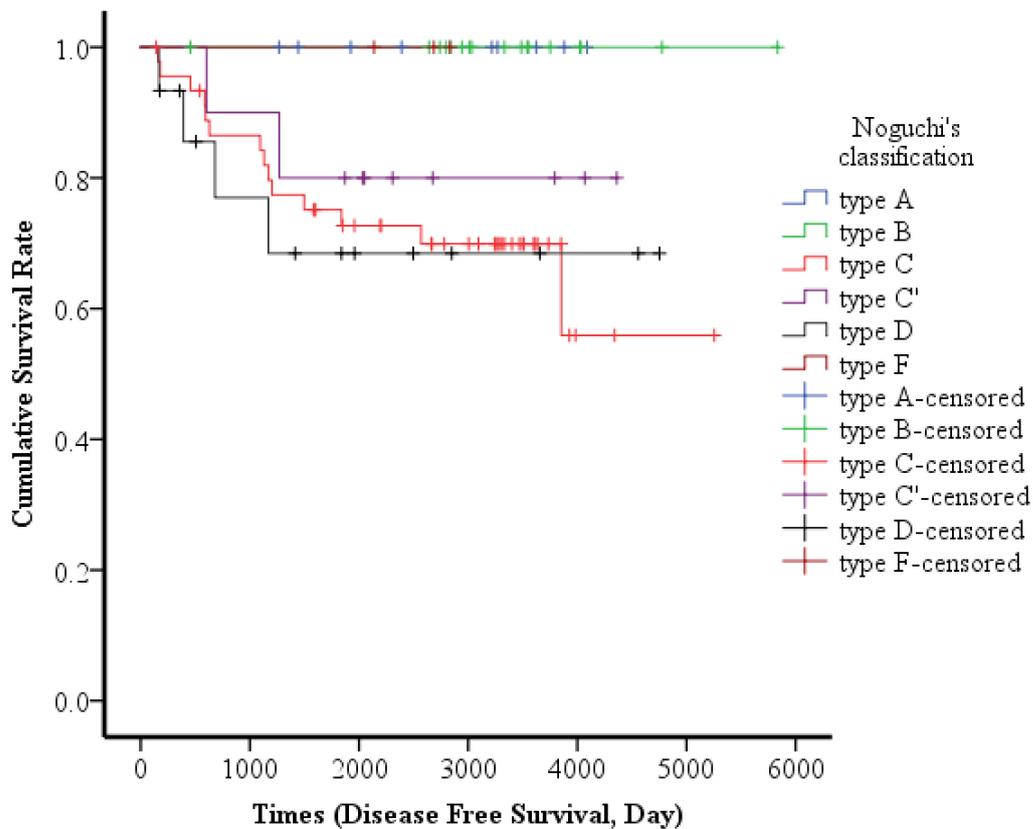


図 6 : 小型肺腺癌の野口分類 type 別の予後曲線 (5 年無病生存率, Kaplan-Meier 法)

それぞれの組織型の 5 年無病生存率 (disease free survival: DFS) は、type A (100%), type B (100%), type C' (80%), type C (75.1%), type D (68.4%) であり、Log-Rank 検定で有意差が見られた ($P < 0.05$)。なお、type F ($n = 3$) は症例数が少なく、検討困難だった。Bonferoni 法による多重比較を施行したが、有意な因子の組み合わせは見られなかった

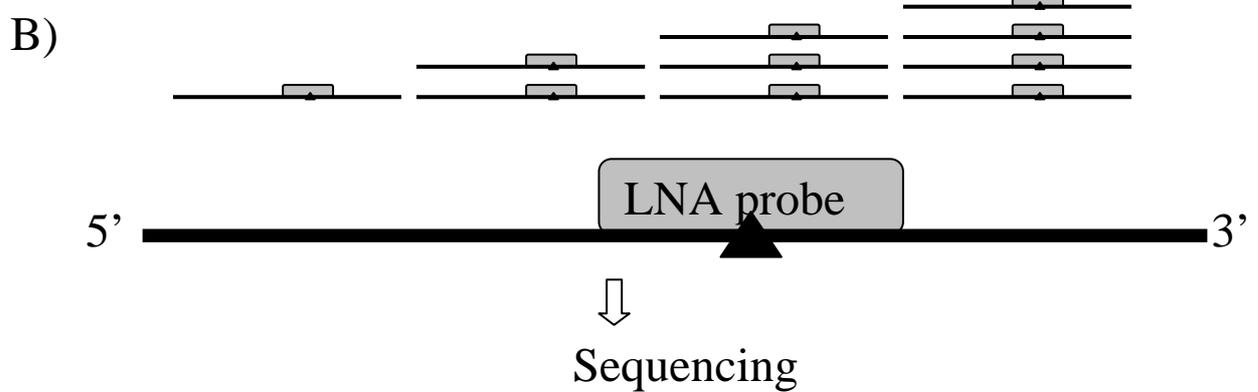
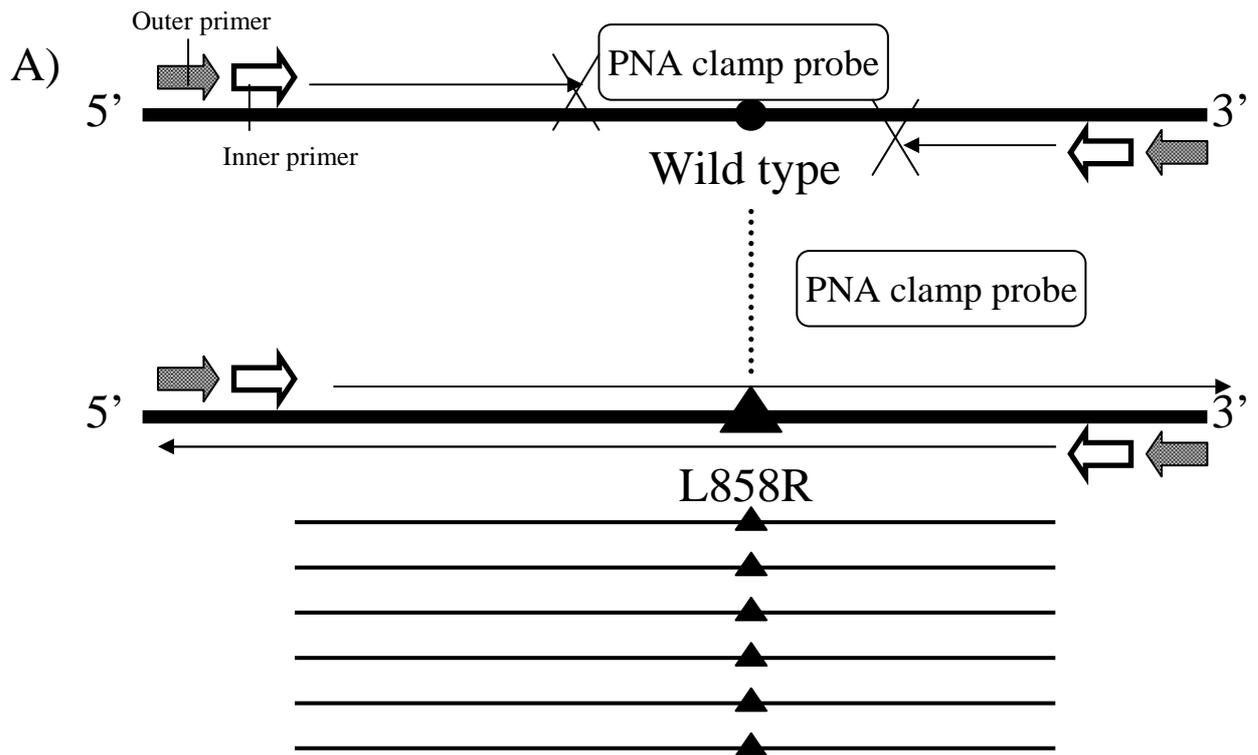


図7 PNA-LNA PCR clamp法によるEGFR変異遺伝子の検出法(文献44)

A) PNA clamp probeを用いた遺伝子の増幅(L858R変異の場合)。PNA probeは、PNAの配列に相補的塩基配列に強く結合する。PNAの配列は野生型EGFRの塩基配列に相補的で、野生型DNAに強く結合し、野生型配列のPCRによる増幅を阻害する。結果、変異型配列の増幅が優先的に行われる。

B) LNAprobeが変異配列に結合し、probeの蛍光標識によりシグナルを検出する。最後に変異シグナルが検出された増幅産物のシーケンス解析を行い、変異を確定する。

EGFR: epidermal growth factor receptor, LNA: locked nucleic acid, PCR: polymerase chain reaction, PNA: peptide nucleic acid

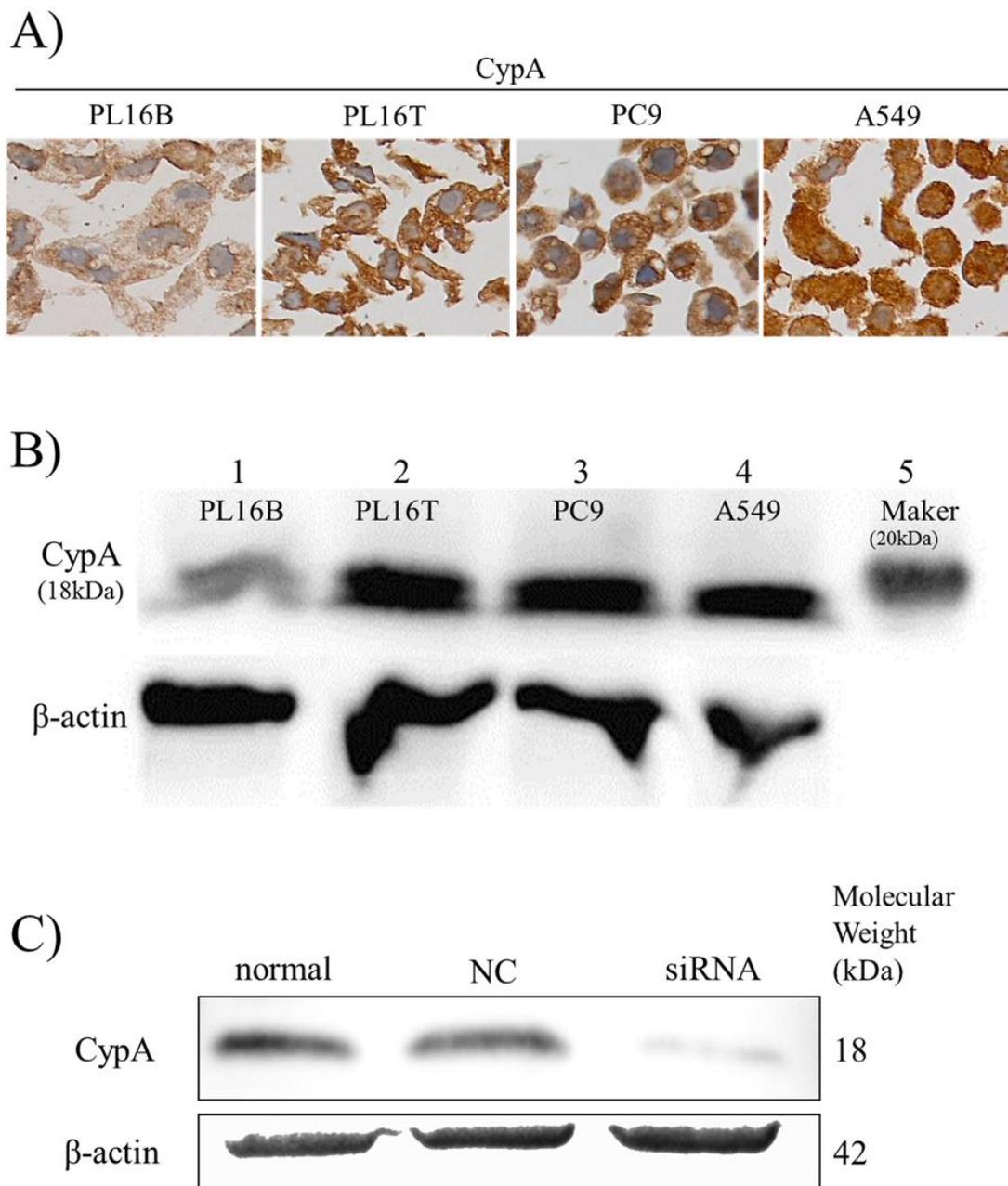


図 8 肺腺癌細胞株における CypA の発現と siRNA (siCypA) 導入

A) 肺腺癌細胞株、非腫瘍性気管支上皮細胞 (PL16B)、前浸潤性肺腺癌(PL16T)、および腺癌 (PC9 and A549)のセルブロックにおける CypA の免疫細胞化学。

B) 同細胞株を用いた、CypA の Western blotting。

C) A549 を用いた CypA 特異的 siRNA (siCypA) の導入の結果。

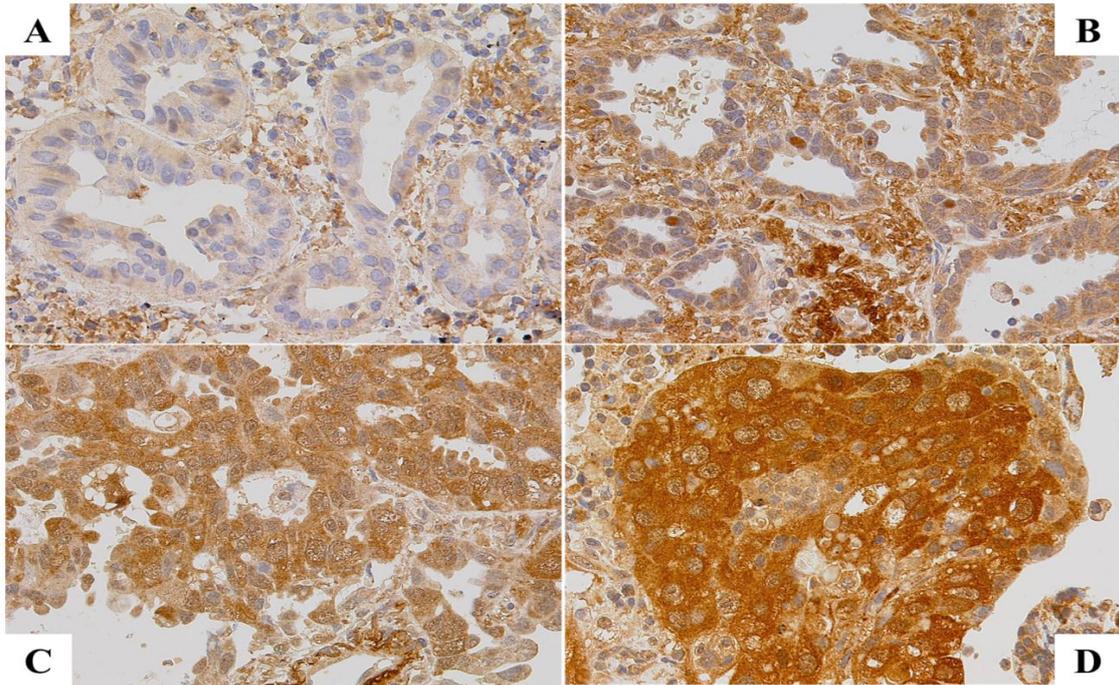


図9 外科的切除材料の肺腺癌におけるCypAの免疫組織化学の染色性

0点：染色されていない、または、1点よりも弱い染色性。(A)

1点：非腫瘍部の肺胞上皮細胞と同程度の染色性。(B)

2点：1点と2点の中間の染色性。(C)

3点：血管壁と同等かそれ以上の強さの染色性。(D)

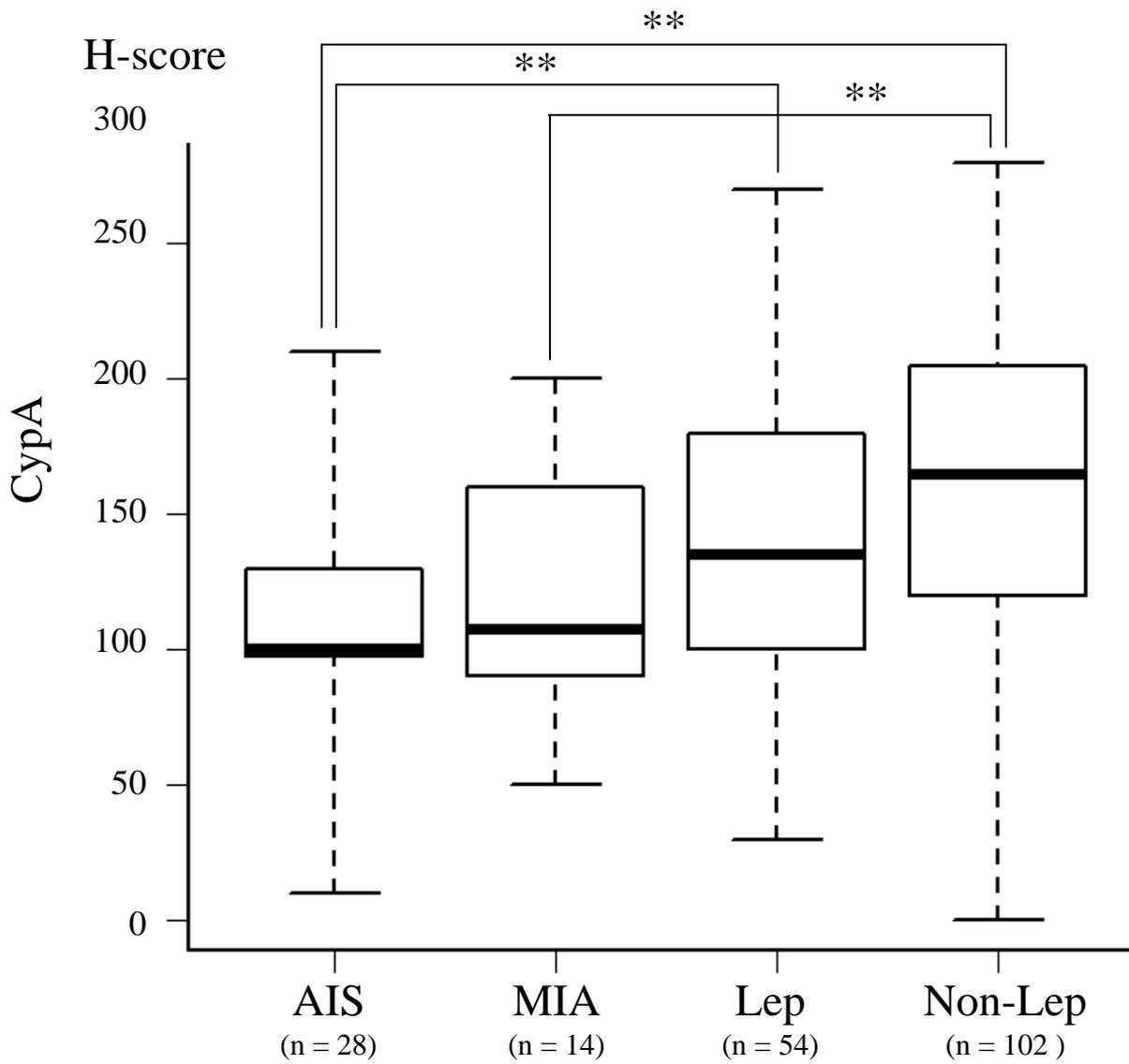


図10 組織型別のH-score (CypA) の比較

Kruskal-Wallis検定 ($df = 3, \chi^2 = 28.70, P < 0.001$)、およびSteel-Dwas法による多重比較 (** $P < 0.01$)。

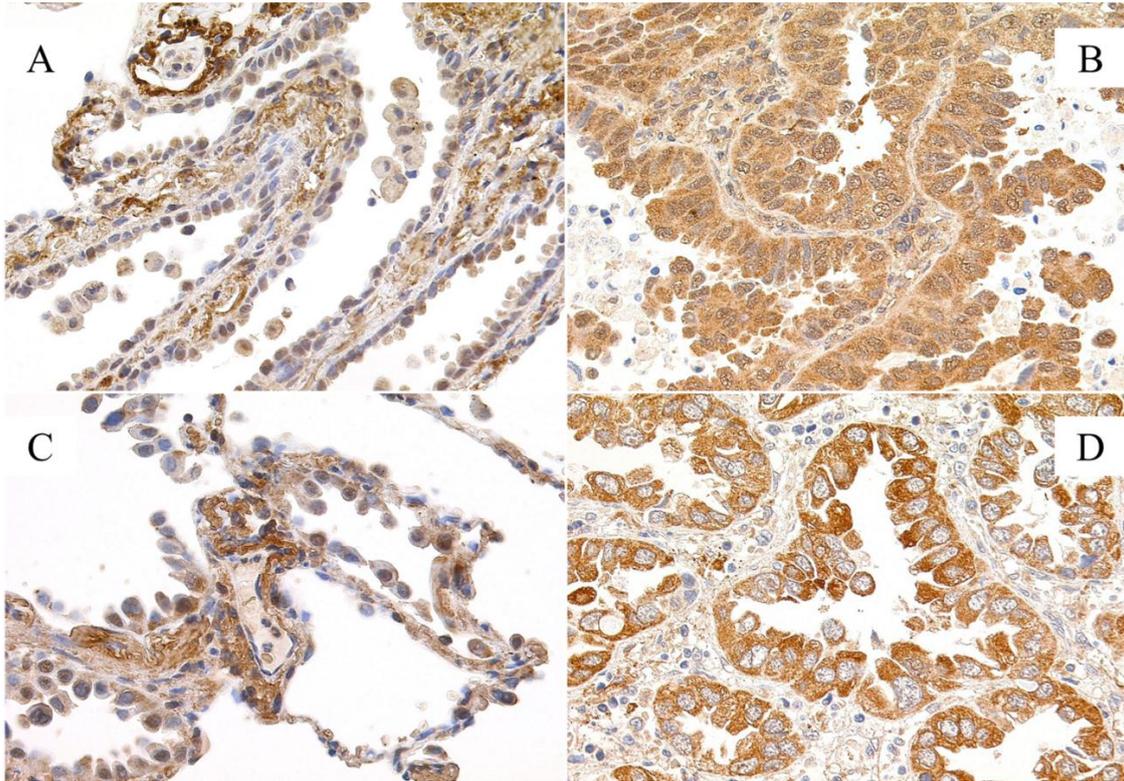


図 11 反応性病変と腺癌との CypA の染色性の差異

A : 反応性に腫大した 2 型上皮細胞

B : A の病変の近傍にある腺癌

C : AAH

D : C の病変の近傍にある腫瘍

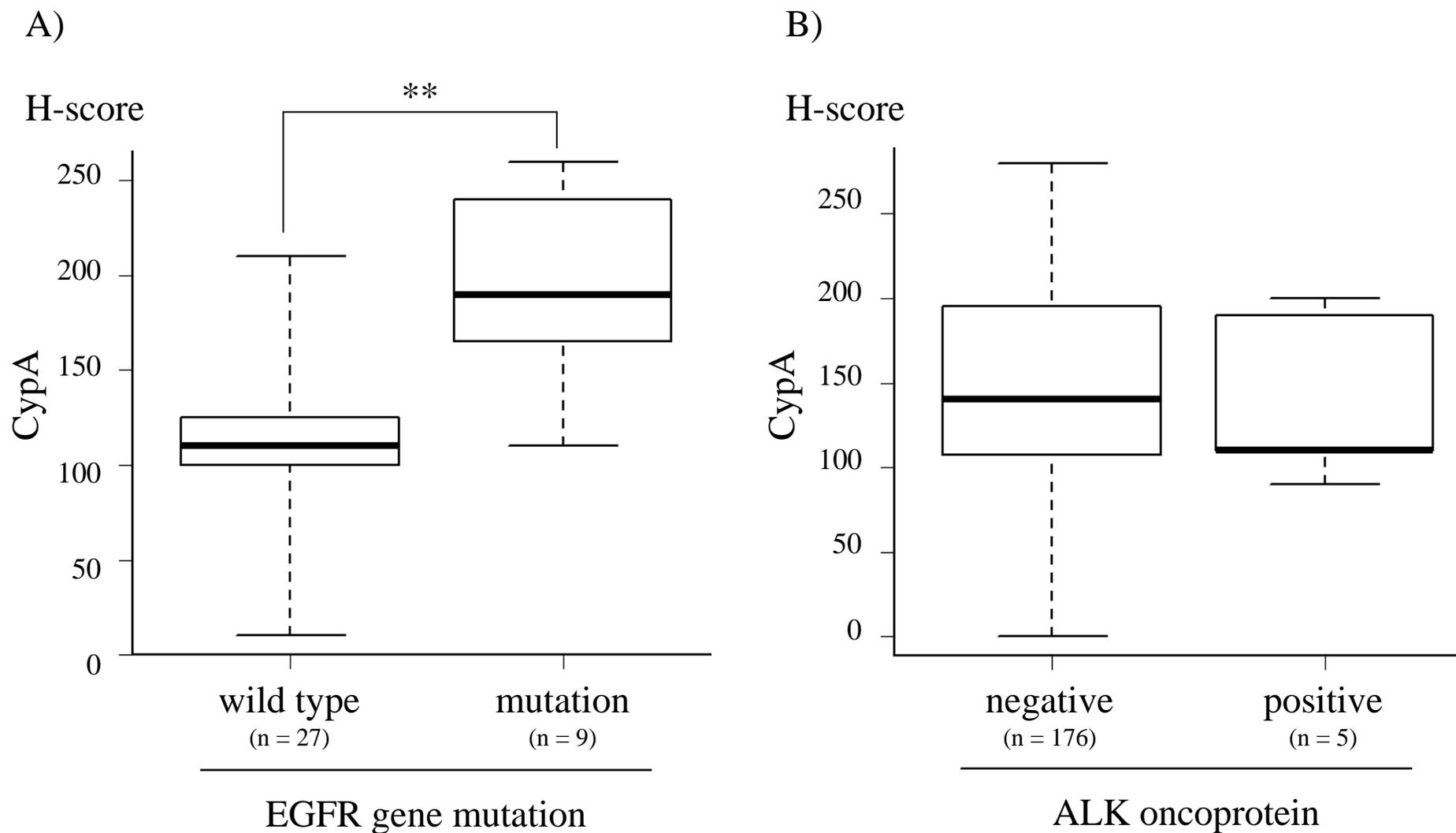


図12 Driver gene の変化とCypAのH-score（中央値）との関連

A) EGFR遺伝子 野生型症例と変異症例のH-score (CypA) (Mann-WhitneyのU検定, $U = 209.0$, $P < 0.002$: **)

B) ALK oncoproteinの免疫組織化学 陰性症例と陽性症例のH-score (CypA) (Mann-WhitneyのU検定, $U = 381.5$, $P = 0.62$)

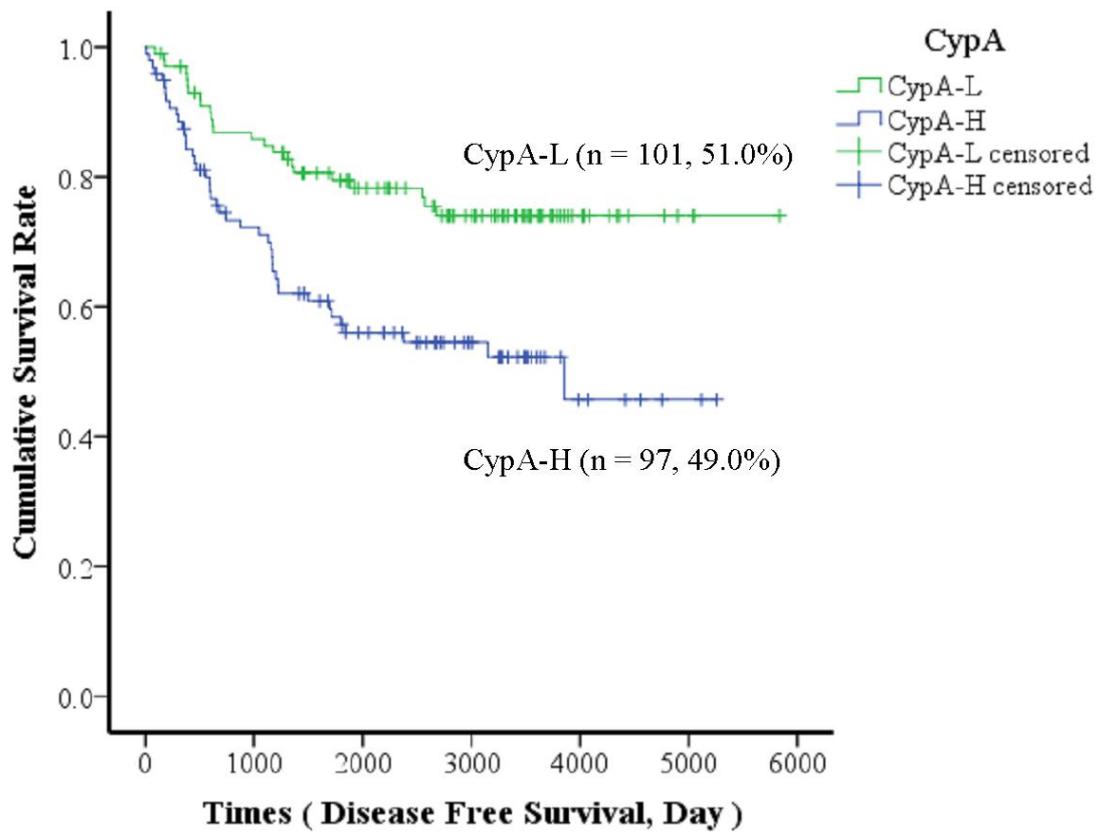


図 13 : Kaplan-Meier 法による肺腺癌の CypA 発現と予後との関連
肺腺癌全 198 例での生存曲線 (5 年無病生存率, $P < 0.01$, Log-Rank 検定)

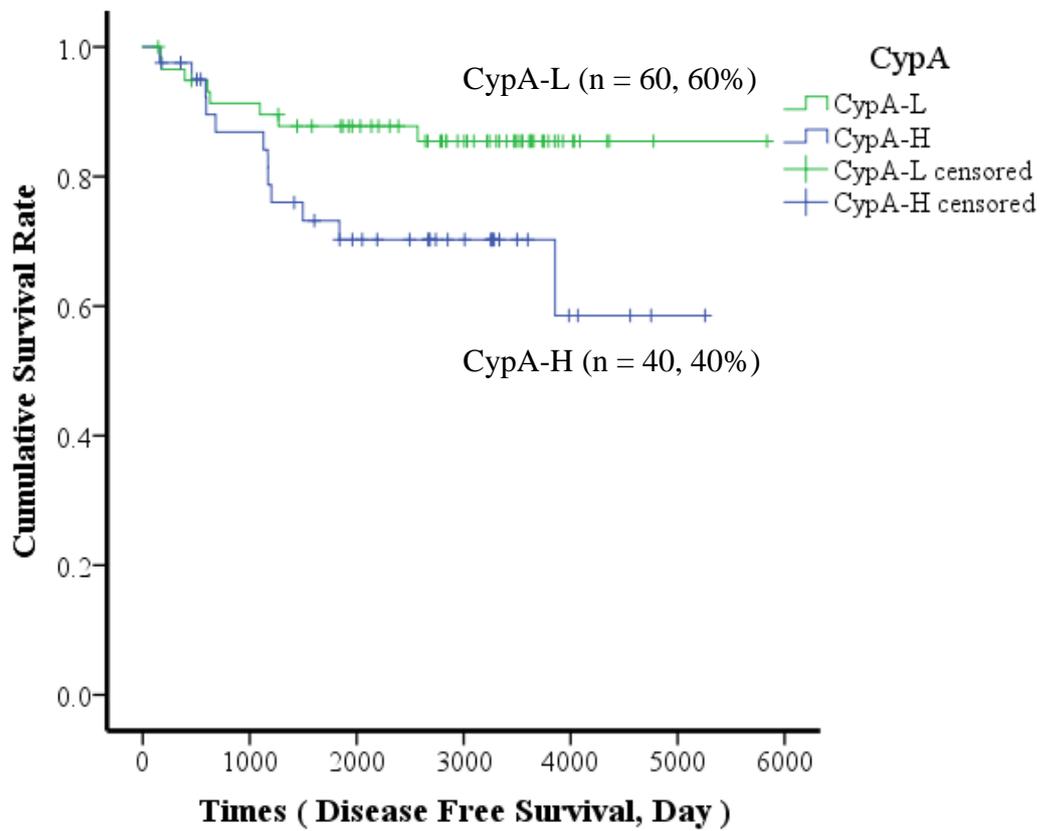
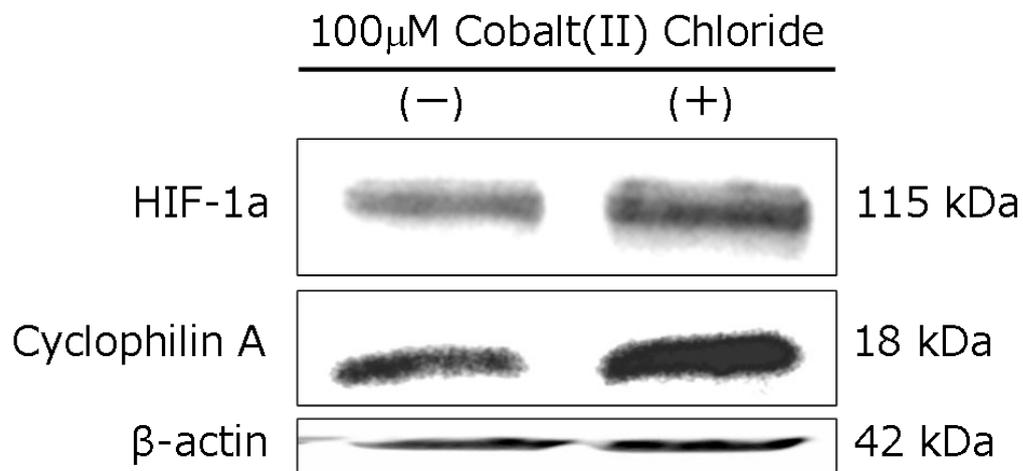


図 14 : Kaplan-Meier 法による肺腺癌の CypA 発現と予後

小型腺癌 100 例での生存曲線 (5 年無病生存率, $P < 0.01$, Log-Rank 検定)

(A)



(B)

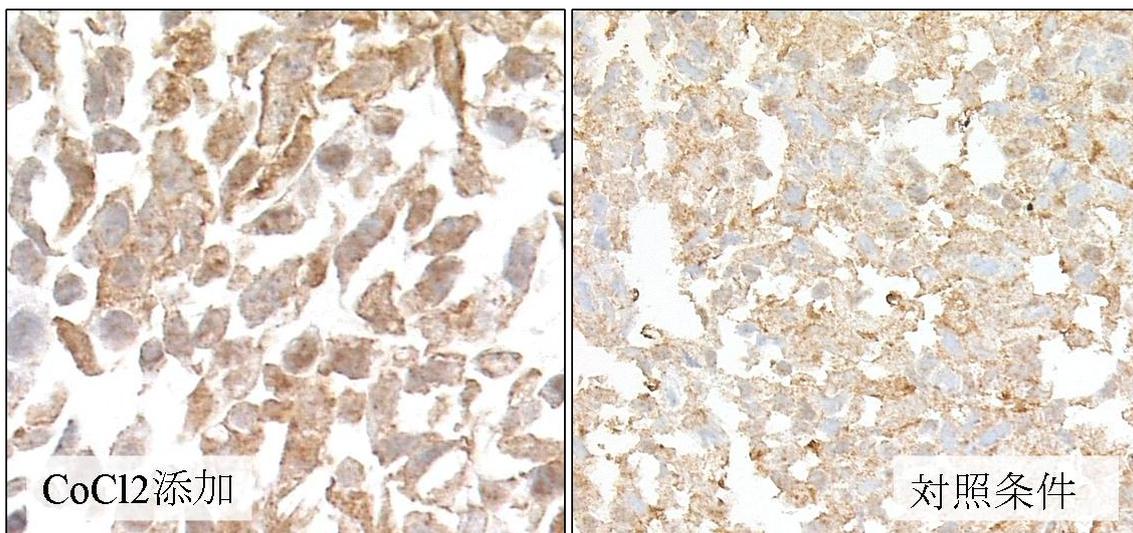


図 15 肺腺癌細胞株 A549 における CoCl₂ を用いた化学的低酸素状態下での HIF-1 α と CypA の発現の変化

(A) : 100 mM CoCl₂ を添加した化学的低酸素状態下での培養により、HIF-1 α の検出量が上昇し、それに伴って CypA の発現も上昇した。

(B) : それぞれの群での免疫細胞化学

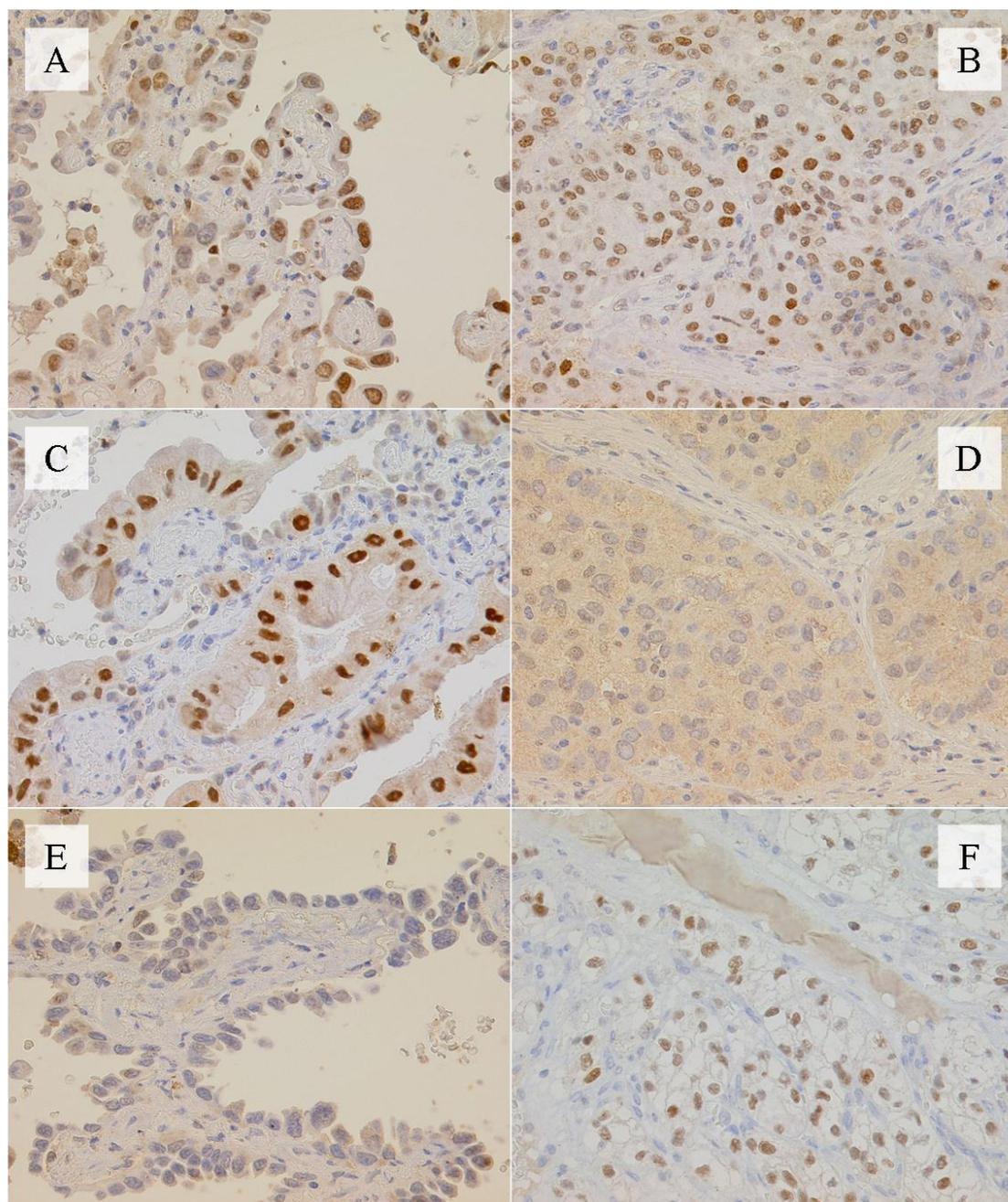


図 16 肺腺癌における HIF-1 α の染色像

A : 置換型増殖、陽性 ; B : 充実型増殖、陽性 ; C : 浸潤性粘液性腺癌、陽性

D : 充実性増殖、陰性 ; E : 置換型増殖、陰性

F : 陽性コントロールに用いた淡明細胞型腎細胞癌での陽性像

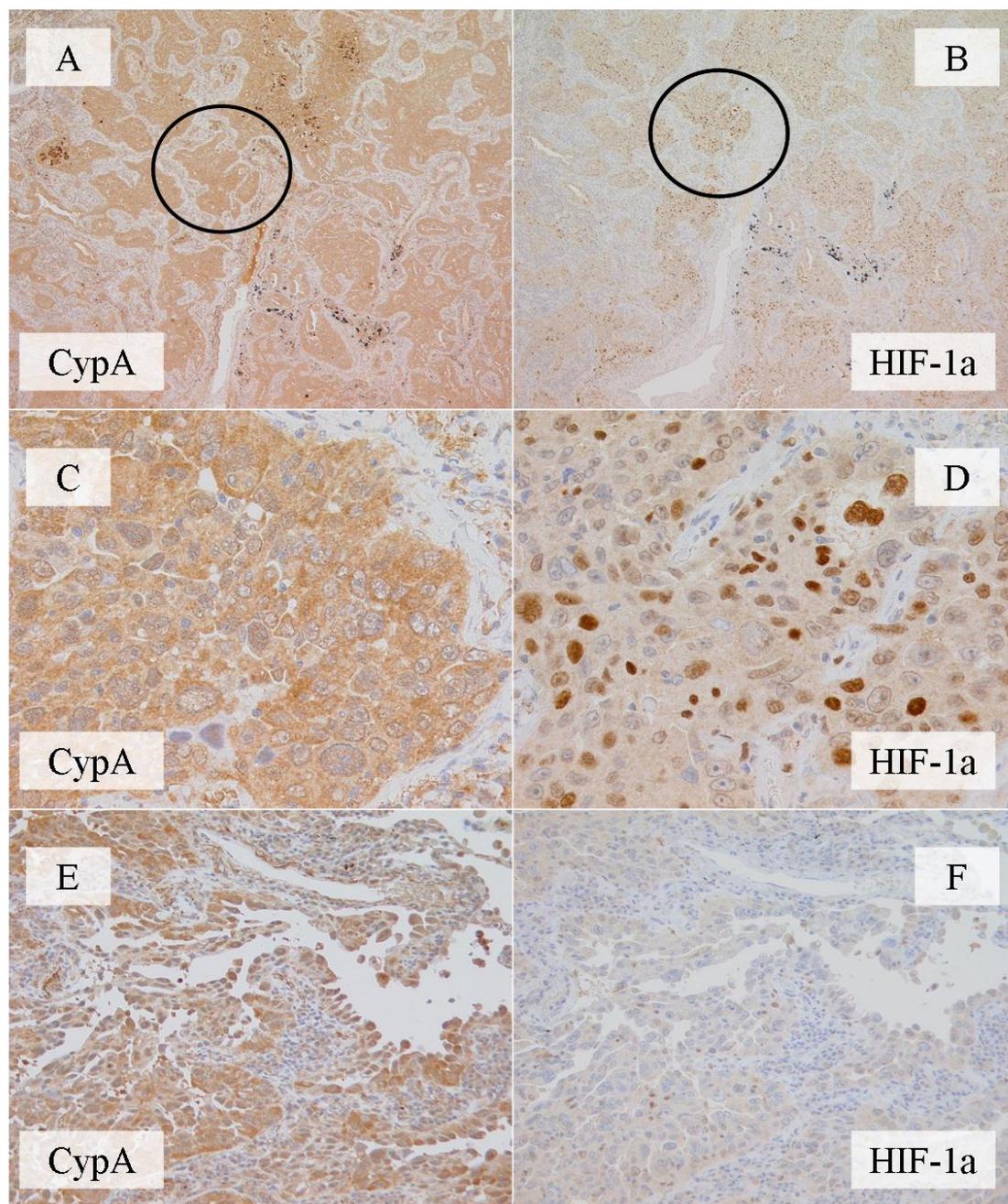


図 17 HIF-1 α 陽性症例における CypA 染色像の対比

A : 腫瘍浸潤部の CypA の染色像 (40 倍)

B : 腫瘍浸潤部の HIF-1 α の染色像 (40 倍)

C : 写真 A の囲み部を拡大。CypA は腫瘍細胞の胞体にびまん性強陽性。(200 倍)

D : 写真 B の囲み部を拡大。HIF-1 α は腫瘍細胞の核に強陽性。(200 倍)

E : 同腫瘍の辺縁部 (非浸潤部)。CypA は腫瘍細胞の胞体に陽性。(100 倍)

F : 同腫瘍の辺縁部 (非浸潤部)。HIF-1 α は陰性。(100 倍)

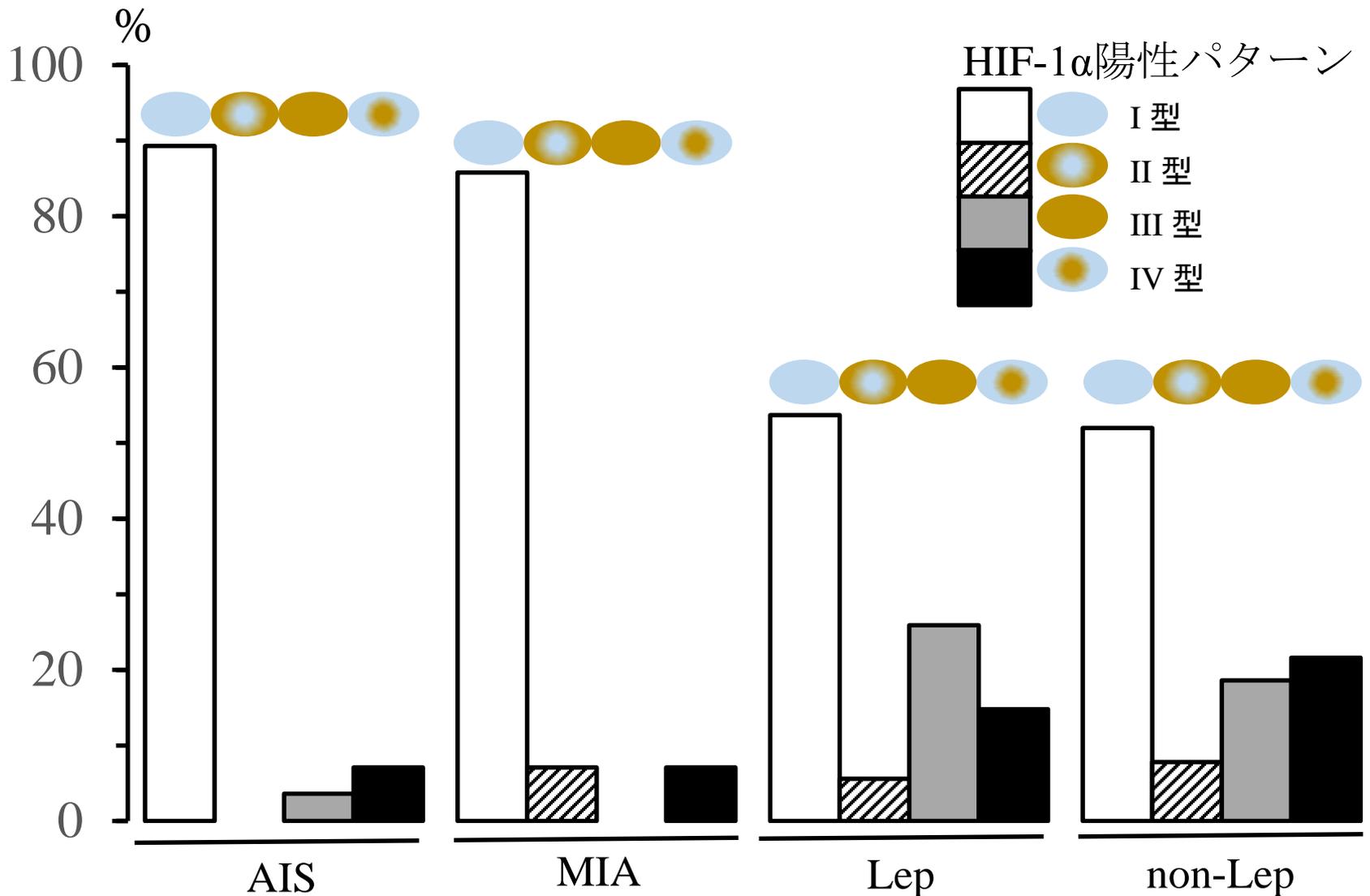


図18：HIF-1 α の染色パターンと肺腺癌の組織型との関連（全198例）横軸に、各組織型と染色パターン（I型：腫瘍辺縁部・中心部のいずれも陰性。II型：腫瘍辺縁部がHIF-1 α 陽性、腫瘍中心部は陰性、III型：腫瘍の辺縁部・中心部のいずれも陽性、IV型：腫瘍中心部が陽性、中心部は陰性）を示した。縦軸には、組織型ごとの各染色型の割合を示した。

AIS、MIAはほとんどがI型（陰性）となった。Lepおよびnon-Lepでは、I型が減少し、陽性症例の割合が上昇した。LepではIII型が最大の割合となるが、non-LepではIV型が増加した。

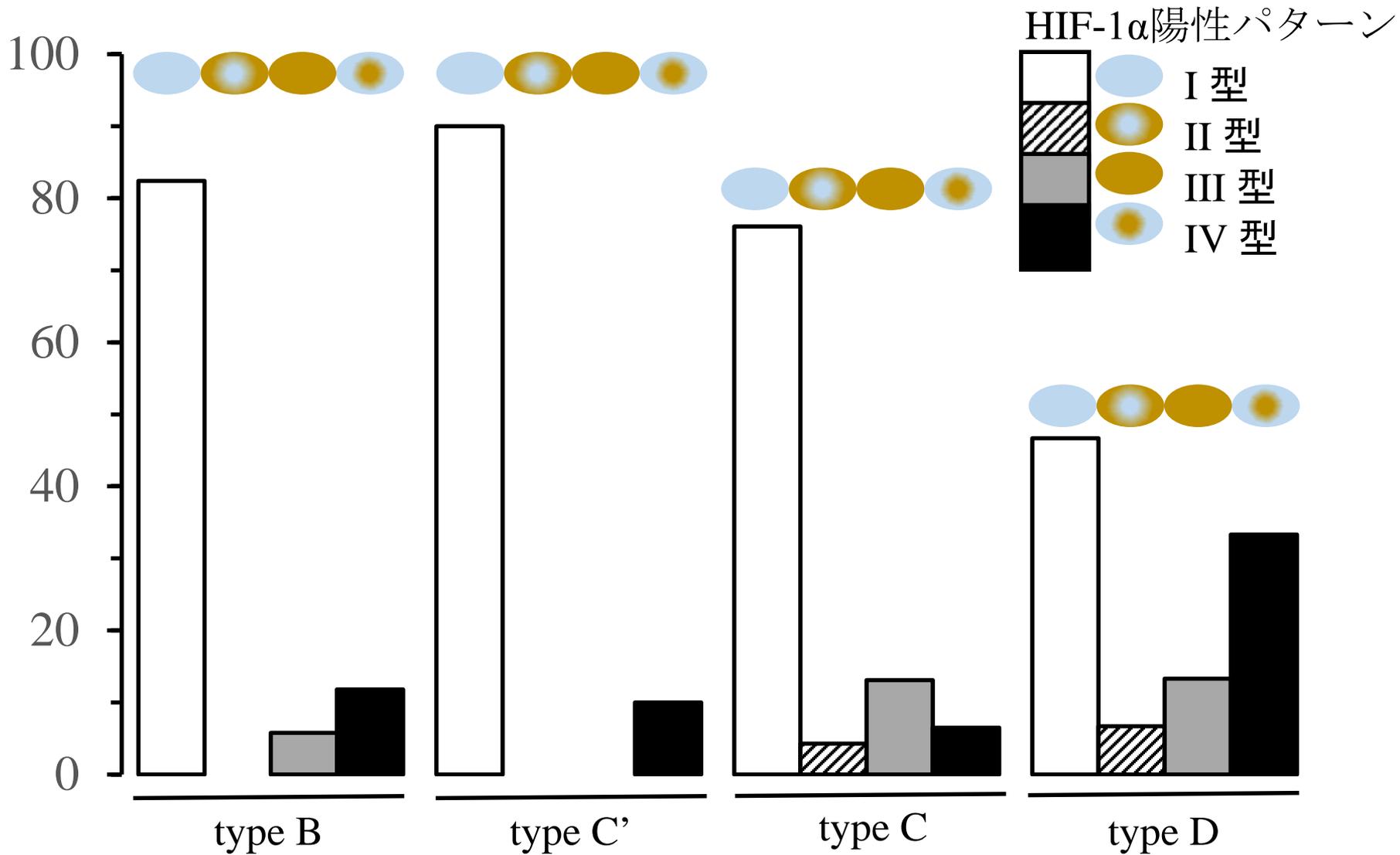


図19：HIF-1 α の染色パターンと肺腺癌の組織型との関連（小型肺腺癌100例）組織型ごとの各染色型の割合は、全198例での解析と同様の傾向が認められる。野口分類 type Aは全例がI型（陰性）となった。同様にtype Bとtype C'も、ほとんどの症例がI型（陰性）となった。野口分類 type Cでは陽性症例が増加し、III型が多く、type DではIV型が増加した。

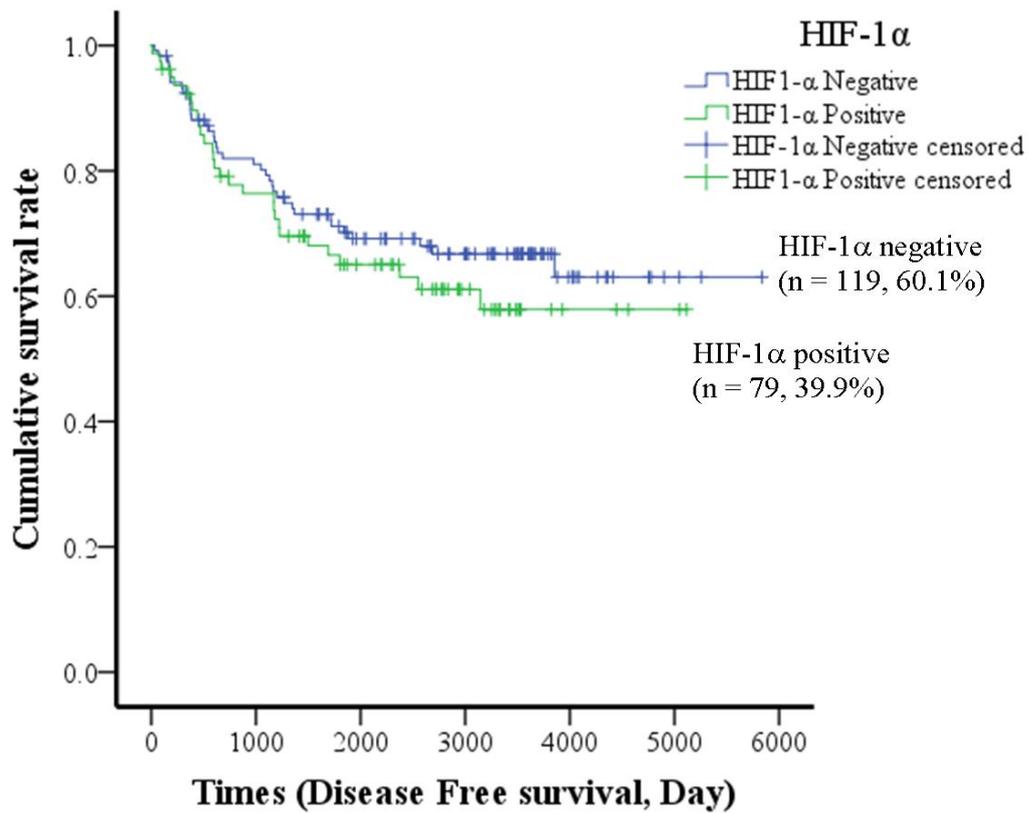


図 20 Kaplan-Meier 法による肺腺癌における HIF-1 α の発現と予後
肺腺癌全 198 例での生存曲線 (5 年無病生存率, $P = 0.39$, Log-Rank 検定)

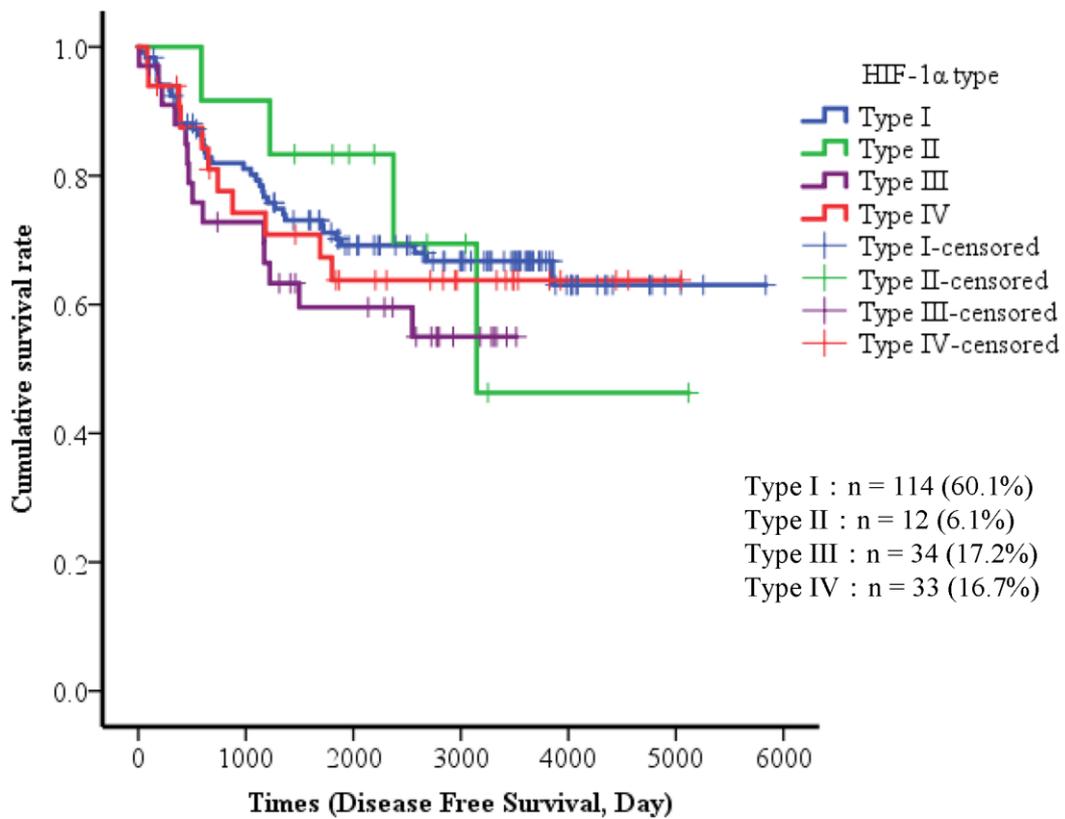


図 21 Kaplan-Meier 法による肺腺癌における HIF-1 α の発現と予後
 肺腺癌全 198 例を、HIF-1 α の発現パターン I~IV で群別して解析した。
 (5 年無病生存率, $P = 0.62$, Log-Rank 検定)

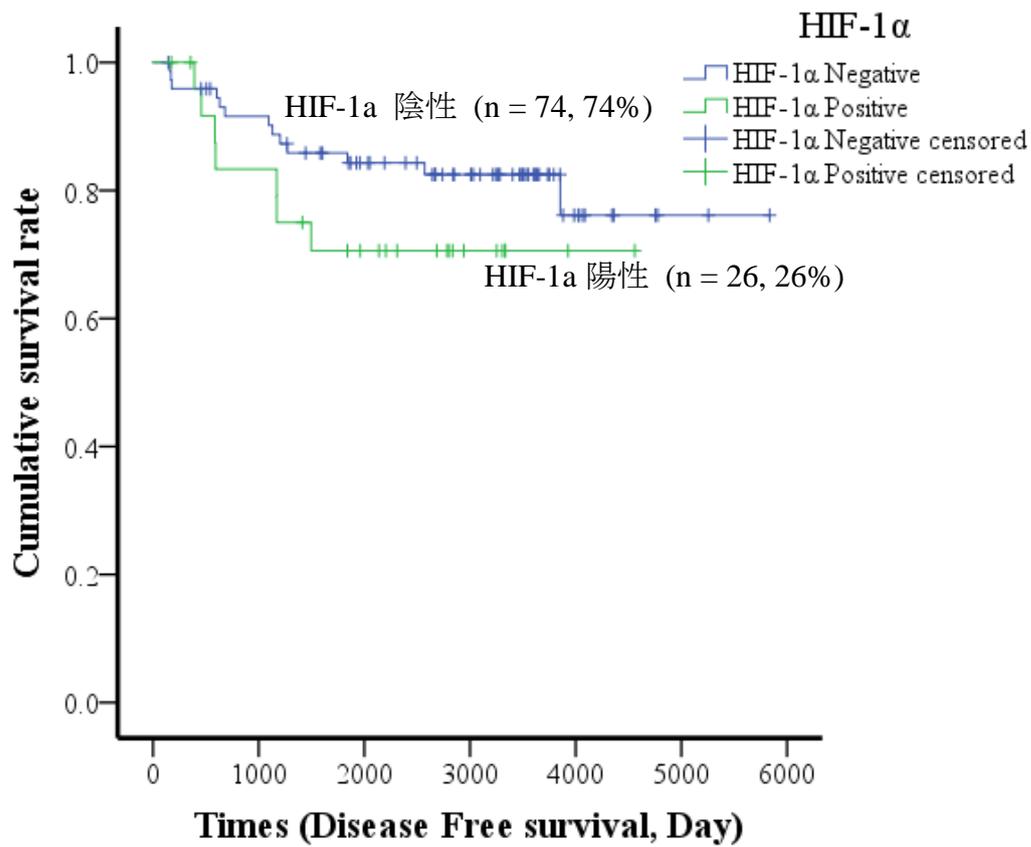


図 22 Kaplan-Meier 法による肺腺癌における HIF-1 α の発現と予後
 小型肺腺癌 100 例での生存曲線 (5 年無病生存率, $P = 0.22$, Log-Rank 検定)

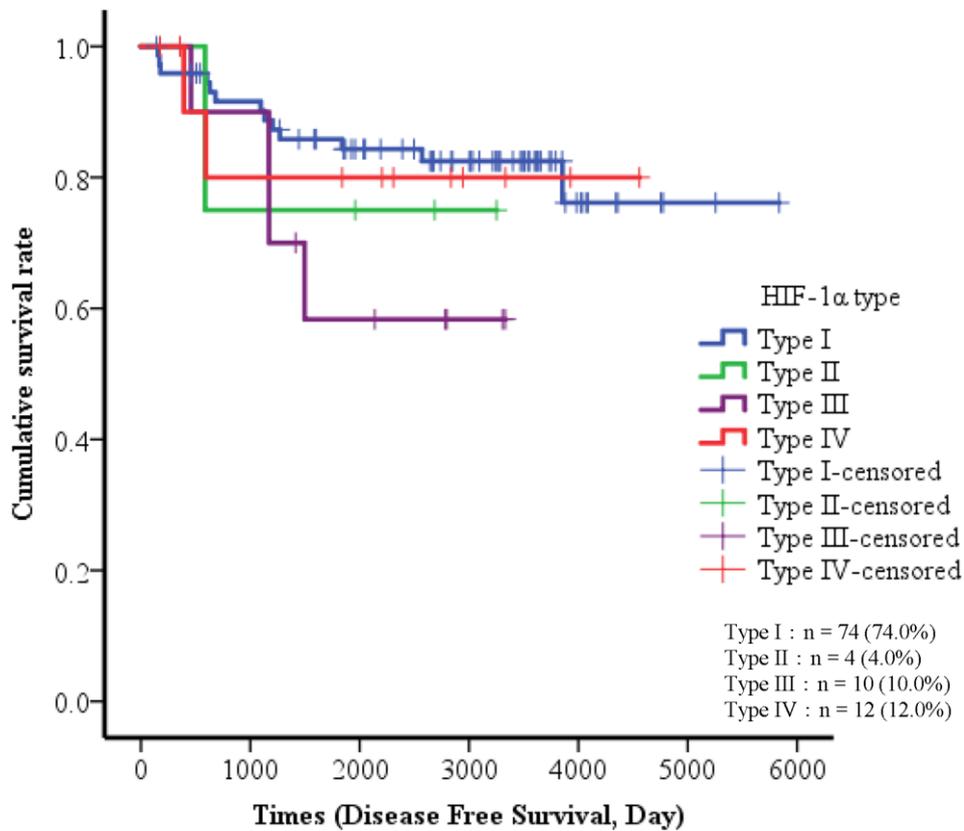


図 23 Kaplan-Meier 法による肺腺癌における HIF-1 α の発現と予後
 小型腺癌 100 例を、HIF-1 α の発現パターン I~IV で群別して解析した。
 (5 年無病生存率, Log-Rank 検定, $P = 0.40$)

表 1 : 小型肺腺癌の野口分類 (文献 3)

直径 2.0cm 以下の小型腺癌	切除後の 5 年生存率
type A 限局性の細気管支肺胞上皮癌 (LBAC)	100%
type B LBAC に肺胞構造の虚脱が生じた腫瘍	100%
type C LBAC に活動性線維芽細胞の増生巣があるもの	74.8%
type D 低分化腺癌	52.4%
type E 腺管状腺癌	
type F 破壊性に増殖する乳頭状腺癌	

表 2 : WHO 分類 (第 4 版, 2015 文献 2) による肺腺癌の分類

Adenocarcinoma: malignant epithelial tumors with glandular differentiation, mucin production, or pneumocyte marker expression.

(腺癌: 腺管への分化傾向、あるいは粘液産生、あるいは肺胞上皮マーカーの発現を伴う悪性上皮性腫瘍)

Adenocarcinoma (腺癌)

Lepidic adenocarcinoma (置換型腺癌)

Acinar adenocarcinoma (腺房型腺癌)

Papillary adenocarcinoma (乳頭型腺癌)

Micropapillary adenocarcinoma (微小乳頭型腺癌)

Solid adenocarcinoma (充実型腺癌)

(Variants of adenocarcinoma) (特殊型腺癌)

Invasive mucinous adenocarcinoma (浸潤性粘液性腺癌)

Colloid adenocarcinoma (コロイド腺癌)

Fetal adenocarcinoma (胎児型腺癌)

Enteric adenocarcinoma (腸型腺癌)

Minimally invasive adenocarcinoma (mucinous/non-mucinous) (微少浸潤性腺癌)

Preinvasive lesion (前浸潤性病変)

Atypical adenomatous hyperplasia (異型腺腫様過形成)

Adenocarcinoma in situ (mucinous/non-mucinous) (上皮内腺癌)

(日本語訳付き)

表3 先行研究で報告されているヒト各臓器での腫瘍組織における CypA の発現と機能

検体	CypA 検討方法と結果	文献
肺癌		
臨床検体	MALDI-TOF MS : 肺癌での CypA の上昇を最初に報告	25
細胞株	knock down : cell proliferation ▼, TUNEL (apoptosis) △, Ki-67 ratio ▼, FDG uptake ▼	26
悪性黒色腫		
細胞株	MS/MS : 転移性悪性黒色腫細胞株での CypA の発現が、原発巣および繊維芽細胞の細胞株より上昇	15
乳癌		
細胞株	MALDI-TOF MS : CypA の down regulation が治療抵抗性 (melphalan resistance) に関連している。	16
細胞株	CypA の抑制 (cyclosporine A の投与) により、Jak2 tyrosine kinase を介した増殖シグナルが抑制される	17
胃癌		
臨床検体	免疫組織化学 : 正常胃粘膜よりも、腫瘍組織で強い染色性。特に腸型の腫瘍細胞に強く陽性	18
細胞株	knock down : cell proliferation ▼, colony formation ▼, apoptosis (n.c.), xenografted tumor growth ▼	

表 3 (続き)

検体	CypA 検討方法と結果	文献
胆管細胞癌		
臨床検体	免疫組織化学：正常胆管よりも、腫瘍組織で強い染色性	19
細胞株	knock down：wound healing test ▼, cell proliferation ▼, tumor growth (tumor volume) ▼	
大腸癌		
臨床検体	SELDI-TOF-MS：CypA の腫瘍の増殖と進展への関連を同定	20
膵癌		
臨床検体	LC-MS/MS：膵癌組織での CypA の発現が、非腫瘍膵組織よりも上昇している	21
臨床検体	免疫組織化学：非腫瘍性水組織よりも、膵癌組織で強い染色性。 mRNA の量も、腫瘍組織が正常組織に比べて上昇 (4/7 例：57%)	22
細胞株	western blotting：膵癌細胞株で CypA の発現量が上昇。CypA の添加により、膵癌細胞株の増殖を刺激。	
臨床検体	免疫組織化学：CypA (+) は HIF-1a (+) と有意な相関がある。 CypA (+) の膵管癌は CypA (-) よりも有意に予後不良。CypA (+) かつ HIF-1a (+++：強陽性) はさらに予後不良	23
細胞株	knock down：cell pliriferation ▼, apoptosis △, cell migration ▼	

表 3 (続き)

検体	CypA 検討方法と結果	文献
膠芽腫		
臨床検体	免疫組織化学：非腫瘍の脳組織と比較して、膠芽腫組織で強い染色性。	24
細胞株	knock down：cell proliferation ▼ , apoptosis △ , cell migration ▼	

CypA: cyclophilin a, FDG: fludeoxyglucose, HIF-1a: hypoxia inducible factor-1 alpha, Jak2: Janus activating kinase 2, LC-MS/MS : liquid chromatography–tandem mass spectrometry, mRNA: messenger ribonucleic acid, SELDI-TOF-MS: surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry, TUNEL: TdT-mediated dUTP nick end labeling, MALDI-TOF: matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight, MS (MS/MS) : mass spectrometry (tandem mass spectrometry) , n.c.: no change

▼ : 低下あるいは抑制、△ : 上昇あるいは増大

表 4 本研究で用いた肺腺癌症例の概要

性別	症例数	年齢（中央値）	最小値-最大値
全体	198	66.5 歳	31 - 89
男性	114	67.9 歳	43 - 83
女性	84	65.0 歳	31 - 89

表 5 本研究で用いた肺腺癌の組織学的分類

組織分類	症例数	5 年生存率
WHO 分類 (第 4 版, 2015)	Total 198	68.8%
Adenocarcinoma in situ (AIS)	28	100%
Minimally invasive adenocarcinoma (MIA)	14	84.6%
Adenocarcinoma	135	56.8%
Lepidic adenocarcinoma	54	67.3%
Papillary adenocarcinoma	25	45.8%
Acinar adenocarcinoma	18	48.3%
Micropapillary adenocarcinoma	4	50.0%
Solid adenocarcinoma	34	53.3%
Variants: Invasive mucinous adenocarcinoma	20.5%	
野口分類 (直径 2cm 以下の小型腺癌)		
type A	9	100%
type B	17	100%
type C'	10	80.0%
type C	46	75.1%
type D	15	68.4%
type E	0	
type F	3	

表 6 : 免疫組織化学およびウエスタンブロッティングで用いた一次抗体と反応条件

抗体名 (clone)	免疫動物	クロナリティ	製造元	反応	稀釈率	反応条件
1) Cyclophilin A の検討						
抗 Cyclophilin A 抗体 (ab42408)	ウサギ	polyclonal	Abcam (Kembridge, UK)	IHC/ICC	200 倍	室温 30 分
				WB	1000 倍	4°C over night
抗 b-actin 抗体 (A5316)	マウス	monoclonal	Sigma-Ardrich (Tokyo, Japan)	WB	5000 倍	室温 60 分
2) HIF-1 α の検討						
抗 HIF-1 α 抗体 (GT10211)	マウス	monoclonal	GeneTex (CA)	IHC/ICC	200 倍	室温 30 分
				WB	1000 倍	4°C over night
抗 Cyclophilin A 抗体 (ab42408)	ウサギ	polyclonal	Abcam (Kembridge, UK)	WB	1000 倍	4°C over night
抗 b-actin 抗体 (A5316)	マウス	monoclonal	Sigma-Ardrich (Tokyo, Japan)	WB	5000 倍	室温 60 分

CA: california, HIF-1 α : hypoxia inducible factor-1alpha, ICC: immunocytochemistry, IHC: immunohistochemistry, TFRC: transferin receptor, UK: unided kingdom, VEGF: vascular endothelial growth factor, WB: western blott

表 7 : siRNA (siCypA)の塩基配列

	Forward sequence (5' to 3')	
	Reverse sequence (5' to 3')	Length (bp)
siCyclophilinA	GCUAUGUUAACAGAUUGGAGGUGUU	25
	AACAGCUCCAAUCUGUUAACAUAGC	25

表 8 肺腺癌における CypA の発現と臨床病理学的因子との関連 (肺腺癌 198 例)

Clinicopathological features	Cyclophilin A			P-value
	Patients	CypA-L (%)	CypA-H (%)	
All patients	198	101 (51.0)	97 (49.0)	
Age (years old, median = 66)				
<= median	91	50 (54.9)	41 (45.1)	0.21
> median	107	51 (47.7)	56 (52.3)	
Gender				
Male	114	48 (42.1)	66 (57.9)	< .01
Female	84	53 (63.1)	31 (36.9)	
Histology				
Reactive and precancerous lesions ^b	10	10 (100.0)	0 (0.0)	}
Reactive pneumocytes	5	5 (100.0)	0 (0.0)	
Atypical adenomatous hyperplasia	5	5 (100.0)	0 (0.0)	
Adenocarcinoma in situ	28	24 (85.7)	4 (14.3)	<.01 ^a
Minimally invasive adenocarcinoma	14	10 (71.4)	4 (28.6)	
Adenocarcinoma	135	54 (40.0)	81 (60.0)	
Lepidic	54	29 (53.7)	25 (46.3)	< .01 ^a
Non-lepidic	81	25 (30.9)	56 (69.1)	< .01 ^a
Papillary	25	7 (28.0)	18 (72.0)	
Acinar	18	9 (50.0)	9 (50.0)	
Micropapillary	4	1 (25.0)	3 (75.0)	

表 8 続き (CypA, 肺腺癌 198 例)

Clinicopathological features	Cyclophilin A			P-value
	Patients	CypA-L (%)	CypA-H (%)	
Solid	34	8 (23.5)	26 (76.5)	
Invasive mucinous adenocarcinoma	21	13 (61.9)	8 (38.1)	
Noguchi classification (adenocarcinoma with a maximum diameter of 2 cm or less)				
Total	100	60 (60.0)	40 (40.0)	
type A	9	9 (100.0)	0 (0)	< .01 ^a
type B	17	15 (88.2)	2 (11.8)	
type C [*]	10	7 (70.0)	3 (30.0)	
type C	46	24 (52.2)	22 (47.8)	
type D	15	3 (20.0)	12 (80.0)	
type F	3	2 (66.6)	1 (33.4)	
Pathological stage				
pStage I (IA, IB)	138	82 (59.4)	56 (40.6)	< .01 ^a
pStage II (IIA, IIB)	32	11 (34.4)	21 (65.6)	
pStage III (IIIA, IIIB)	26	8 (30.8)	18 (69.2)	
pStage IV	2	0 (0)	2 (100.0)	
pT factor				
pT1 (pT1a, pT1b)	105	66 (62.9)	39 (37.1)	< .01 ^a
pT2 (pT2a, pT2b)	66	26 (39.4)	40 (60.6)	
pT3	24	9 (37.5)	15 (62.5)	

表 8 続き (CypA, 肺腺癌 198 例)

Clinicopathological features	Cyclophilin A			P-value
	Patients	CypA-L (%)	CypA-H (%)	
pT4	3	0 (0)	3 (100.0)	
Lymph node metastasis				
pN0/pNX	152	89 (58.5)	63 (41.4)	< .01 ^a
pN1/pN2	46	12 (26.1)	34 (73.9)	
Pleural invasion				
pI0	136	81 (59.6)	55 (40.4)	< .01 ^a
pI1-3	62	20 (32.3)	42 (67.7)	
Lymphatic permeation				
Ly0	131	81 (61.8)	50 (38.2)	< .01 ^a
Ly1	67	20 (29.9)	47 (70.1)	
Vascular invasion				
V0	119	75 (63.0)	44 (37.0)	< .01 ^a
V1	79	26 (32.9)	53 (67.1)	
Driver gene alternations				
EGFR mutation (PCR ^b)	36	23 (63.9)	13 (36.1)	< .01 ^a
wild type	27	21 (77.8)	6 (22.2)	
mutated	9	2 (22.2)	7 (77.8)	

表 8 続き (CypA, 肺腺癌 198 例)

Clinicopathological features	Cyclophilin A			<i>P</i> -value
	Patients	CypA-L (%)	CypA-H (%)	
ALK oncoprotein (immunohistochemistry)	181	91 (50.3)	90 (49.7)	0.33
positive	5	3 (60.0)	2 (40.0)	
negative	176	88 (50.0)	88 (50.0)	

a: Fisher's exact test.

b: All lesions were obtained from around of adenocarcinoma.

表9 Cox proportional hazard modelによる単変量および多変量解析 (CypA 全症例 n = 198)

臨床病理学的因子	n	単変量解析			多変量解析		
		Hazard比	95% 信頼区間	P	Hazard比	95% 信頼区間	P
性別	女性	84	1.00		1.00		
	男性	114	1.72	1.06 - 2.71	0.02	3.13	1.90 - 5.14
組織型	Lepidic	96	1.00		1.00		
	Non-lepidic	102	4.59	2.62 - 8.05	< 0.001	4.85	2.47 - 9.52
pStage	pStage I	138	1.00		1.00		
	pStage II, III, IV	60	3.60	2.33 - 5.56	< 0.001	1.59	0.97 - 2.62
pT	pT1	105	1.00				
	pT2, pT3, pT4	93	3.73	2.32 - 5.97	< 0.001		
pN	pN0	152	1.00				
	pN1, pN2, pN3	46	3.97	2.55 - 6.18	< 0.001		
pl	pl0	136	1.00				
	pl1, pl2, pl3	62	4.19	2.71 - 6.48	< 0.001		
Ly	Ly0	131	1.00				
	Ly1	67	1.26	0.78 - 2.02	0.34		
V	V0	119	1.00		1.00		
	V1	79	1.95	1.21 - 3.16	0.01	1.25	0.73 - 2.12
CypA	Low	101	1.00		1.00		
	High	97	2.31	1.46 - 3.65	< 0.001	1.31	0.81 - 2.13

表10 Cox proportional hazard modelによる単変量および多変量解析 (CypA 小型肺腺癌 n = 100)

臨床病理学的因子	n	単変量解析			多変量		
		Hazard比	95% 信頼区間	P	Hazard比	95% 信頼区間	P
性別	女性	49	1.00				
	男性	51	1.58	0.88 - 2.85	0.13		
組織型	Lepidic	73	1.00		1.00		
	Non-lepidic	27	4.21	1.66 - 10.66	< 0.001	2.91	1.08 - 7.81
野口分類	type A, B, C', C	82	1.00				
	type D, E, F	18	2.77	0.99-7.73	0.052		
pStage	pStage I	62	1.00		1.00		
	pStage II, III, IV	38	3.11	1.73 - 5.59	< 0.001	2.24	1.20 - 4.17
pT	pT1	50	1.00				
	pT2, pT3, pT4	50	3.20	1.70 - 6.01	< 0.001		
pI	pI0	34	1.00				
	pI1, pI2, pI3	66	4.54	2.51 - 8.23	< 0.001		
Ly	Ly0	86	1.00				
	Ly1	14	1.02	0.43 - 2.41	0.94		
V	V0	80	1.00				
	V1	20	1.80	0.76 - 4.24	0.18		
CypA	Low	60	1.00				
	High	40	1.40	0.76 - 2.55	0.27		

表 11 HIF-1 α の染色パターンによる肺腺癌の分類

腫瘍中心部	腫瘍辺縁部	
	陰性	陽性
陰性	I 型 HIF-1 α 陰性 119 例 (60.1%)	II 型 HIF-1 α 陽性 12 例 (6.1%)
陽性	IV 型 HIF-1 α 陽性 33 例 (16.7%)	III 型 HIF-1 α 陽性 34 例 (17.2%)
合計	HIF-1 α 陰性 : 119 例 (60.1%)	HIF-1 α 陽性 : 79 例 (39.9%)

表 12 HIF-1 α の染色性による分類と組織型との関連

A: 肺腺癌全 198 例

HIF-1 α type	組織型				Total
	AIS	MIA	Lepidic	non-Lepidic	
I (%)	25 (89.3)	12 (85.7)	29 (53.7)	53 (52.0)	119 (60.1)
II (%)	0 (0.0)	1 (7.1)	3 (3.6)	8 (16.9)	12 (6.1)
III (%)	1 (3.6)	0 (0.0)	14 (25.9)	19 (18.6)	34 (17.2)
IV (%)	2 (7.1)	1 (7.1)	8 (14.8)	22 (21.6)	33 (16.7)
Total	28	14	54	102	198

$$\chi^2 = 20.45, P = 0.015$$

表 12 HIF-1 α の染色性による分類(続き)

B: 小型肺腺癌 100 例

HIF-1 α type	野口分類 (type)						Total
	A	B	C'	C	D	F	
I	9	14	9	35	7	0	74
(%)	(100)	(82.4)	(90.0)	(76.1)	(46.7)	(0.0)	(74.0)
II	0	0	0	2	1	1	4
(%)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(4.3)	(6.7)	(33.3)	(4.0)
III	0	1	0	6	2	1	10
(%)	(0.0)	(5.9)	(0.0)	(13.0)	(13.3)	(33.3)	(10.0)
IV	0	2	1	3	5	1	12
(%)	(0.0)	(11.8)	(10.0)	(6.5)	(33.3)	(33.3)	(12.0)
Total	9	17	10	46	15	3	100

$$\chi^2 = 26.77, P = 0.03$$

表 13 肺腺癌における HIF-1 α の発現と臨床病理学的因子との関連

Clinicopathological features	HIF-1 α			P-value
	Patients	Negative (%)	Positive (%)	
All patients	198	119 (60.1)	79 (39.9)	
Age (years old, median = 66)				
<= median	91	55 (60.4)	36 (39.6)	1.00
> median	107	64 (59.8)	43 (40.2)	
Gender				
Male	114	65 (57.0)	49 (43.0)	0.31
Female	84	54 (64.3)	30 (35.7)	
Histology				
Reactive and precancerous lesions ^b	10	10 (100.0)	0 (0.0)	
Reactive pneumocytes	5	5 (100.0)	0 (0.0)	
Atypical adenomatous hyperplasia	5	5 (100.0)	0 (0.0)	
Adenocarcinoma in situ	28	25 (89.3)	3 (10.7)	< .01 ^a
Minimally invasive adenocarcinoma	14	12 (85.7)	2 (14.3)	
Adenocarcinoma	135	73 (54.1)	62 (45.9)	
Lepidic	54	29 (53.7)	25 (46.3)	0.60
Non-lepidic	81	44 (54.3)	37 (45.7)	
Papillary	25	14 (56.0)	11 (44.0)	
Acinar	18	12 (66.7)	6 (33.3)	
Micropapillary	4	2 (50.0)	2 (50.0)	

表 13 続き (HIF-1 α)

Clinicopathological features	HIF-1 α			<i>P</i> -value
	Patients	Negative (%)	Positive (%)	
Solid	34	17 (50.0)	17 (50.0)	
Invasive mucinous adenocarcinoma	21	9 (42.9)	12 (57.1)	
Noguchi classification (adenocarcinoma with a maximum diameter of 2 cm or less)				
Total	100	74 (74.0)	26 (26.0)	
type A	9	9 (100)	0 (0)	< .01 ^a
type B	17	14 (82.4)	3 (17.6)	
type C [*]	10	9 (90.0)	1 (10.0)	
type C	46	35 (76.1)	11 (23.9)	
type D	15	7 (46.7)	8 (53.3)	
type F	3	0 (0.0)	3 (100.0)	
Pathological stage				
pStage I (IA, IB)	138	89 (64.5)	49 (35.5)	0.27
pStage II (IIA, IIB)	32	15 (46.9)	17 (53.1)	
pStage III (IIIA, IIIB)	26	14 (53.8)	12 (46.2)	
pStage IV	2	1 (50.0)	1 (50.0)	
pT factor				
pT1 (pT1a, pT1b)	105	77 (73.3)	28 (26.7)	< .01 ^a
pT2 (pT2a, pT2b)	66	30 (45.5)	36 (54.5)	
pT3	24	10 (41.7)	14 (58.3)	

表 13 続き (HIF-1 α)

Clinicopathological features	HIF-1 α			<i>P</i> -value
	Patients	Negative (%)	Positive (%)	
pT4	3	2 (66.7)	1 (33.3)	
Lymph node metastasis				
pN0/pNX	152	95 (62.5)	57 (37.5)	0.23
pN1/pN2	46	24 (52.2)	22 (47.8)	
Pleural invasion				
pI0	136	88 (64.7)	48 (35.3)	0.06
pI1-3	62	31 (50.0)	31 (50.0)	
Lymphatic permeation				
Ly0	131	91 (69.5)	40 (30.5)	< .01 ^a
Ly1	67	28 (41.8)	39 (58.2)	
Vascular invasion				
V0	119	81 (68.1)	38 (31.9)	< .01 ^a
V1	79	38 (48.1)	41 (51.9)	
Driver gene alternations				
EGFR mutation (PCR ^c)	36	20 (55.6)	16 (44.4)	0.06
wild type	27	18 (66.7)	9 (33.3)	
mutated	9	2 (22.2)	7 (77.8)	

表 13 続き (HIF-1 α)

Clinicopathological features	HIF-1 α			<i>P</i> -value
	Patients	Negative (%)	Positive (%)	
ALK oncoprotein (immunohistochemistry)	181	104 (57.5)	77 (42.5)	0.17
positive	5	1 (20.0)	4 (80.0)	
negative	176	103 (58.5)	73 (41.5)	
Cyclophilin A expression	198	119 (60.1)	79 (39.9)	0.05 ^a
CypA-Low	101	72 (71.3)	29 (28.7)	
CypA-High	97	47 (48.5)	50 (51.5)	

a: Fisher's exact test.

b: All lesions were obtained from around of adenocarcinoma.

c: EGFR mutation was explored in the commercial laboratory by polymerase chain reaction using FFPE section

表14 Cox proportional hazard modelによる単変量および多変量解析 (HIF-1 α 全症例 n = 198)

臨床病理学的因子	n	単変量解析			多変量		
		Hazard比	95% 信頼区間	P	Hazard比	95% 信頼区間	P
組織型	Lepidic	96	1.00		1.00		
	Non-lepidic	102	4.59	2.62 - 8.05	< 0.001	2.17	1.02 - 4.64
pT	pT1	105	1.00		1.00		
	pT2, pT3, pT4	93	3.73	2.32 - 5.97	< 0.001	1.24	0.59 - 2.63
pl	pl0	136	1.00		1.00		
	pl1, pl2, pl3	62	4.19	2.71 - 6.48	< 0.001	2.16	1.13 - 4.11
Ly	Ly0	131	1.00				
	Ly1	67	1.26	0.78 - 2.02	0.34		
V	V0	119	1.00		1.00		
	V1	79	1.95	1.21 - 3.16	0.01	1.09	0.65 - 1.83
CypA	Low	101	1.00		1.00		
	High	97	2.31	1.46 - 3.65	< 0.001	1.49	0.92 - 2.40
HIF-1a	Negative	119	1.00				
	Positive	79	1.09	0.70 - 1.69	0.70		

表15 Cox proportional hazard modelによる単変量および多変量解析 (HIF-1 α 小型肺腺癌 n = 100)

臨床病理学的因子		n	単変量解析			多変量		
			Hazard比	95% 信頼区間	P	Hazard比	95% 信頼区間	P
組織型	Lepidic	73	1.00			1.00		
	Non-lepidic	27	4.21	1.66 - 10.66	< 0.001	2.14	0.82 - 7.08	0.10
pT	pT1	50	1.00			1.00		
	pT2, pT3, pT4	50	3.20	1.70 - 6.01	< 0.001	1.20	0.41 - 3.51	0.74
pI	pI0	34	1.00			1.00		
	pI1, pI2, pI3	66	4.54	2.51 - 8.23	< 0.001	3.83	1.47 - 9.97	0.01
Ly	Ly0	86	1.00					
	Ly1	14	1.02	0.43 - 2.41	0.94			
V	V0	80	1.00					
	V1	20	1.80	0.76 - 4.24	0.18			
CypA	Low	60	1.00					
	High	40	1.40	0.76 - 2.55	0.27			
HIF-1a	Negative	74	1.00					
	Positive	26	1.30	0.69 - 2.48	0.42			

引用文献

- 1 厚生労働省 平成 27 年(2015) 人口動態統計 (確定数) の概況

- 2 Travis WD, Brambilla E, Burke AP, et al. eds WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart, 4th edn. Lyon: IARC, 2015.

- 3 Noguchi M, Morikawa A, Kawasaki M et al. Small adenocarcinoma of the lung. Histologic characteristics and prognosis. *Cancer* 1995; **75**: 2844-2852.

- 4 Noguchi M Stepwise progression of pulmonary adenocarcinoma—clinical and molecular implications. *Cancer Metastasis Rev* 2010; **29**: 15-21.

- 5 Shiba - Ishii A, Kano J, Morishita Y 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**: 2445-2453.

6 Shiba-Ishii A, Kim Y, Shiozawa T et al. Stratifin accelerates progression of lung adenocarcinoma at an early stage. *Mol Cancer* 2015; **14**: 142-147.

7 Sakashita S, Li D, Nashima N et al. Overexpression of immunoglobulin (CD79a) binding protein1 (IGBP-1) in small lung adenocarcinomas and its clinicopathological significance: Overexpression of IGBP-1 in lung adenocarcinoma. *Pathol Int* 2011; **61**: 130-137.

8 坂下信悟 2011 筑波大学博士 (医学) 学位論文 (甲第 5820 号)

9 Wang P and Heitman J The cyclophilins. *Genome Biol* 2005; **6**: 226.1-226.6

10 Handschumacher R, Harding M, Rice J, et al. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 1984; **226**: 544-547.

11 Lang K, Schmid FX and Fischer G. Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature* 1987; **329**: 268-270.

12 Lee J. Role of cyclophilin a during oncogenesis. *Arch Pharm Res* 2010; **33**: 181-187.

13 Lee J and Kim SS. Current implications of cyclophilins in human cancers. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; **29**: 97-102.

14 Nigro P, Pompilio G and Capogrossi MC. Cyclophilin A: a key player for human disease. *Cell Death Dis* 2013; **4**: e888.

15 Al-Ghoul M, Brück TB, Lauer-Fields JL et al. Comparative proteomic analysis of matched primary and metastatic melanoma cell lines. *J Proteome Res* 2008; **7**:

4107-4118.

16 Hathout Y, Riordan K, Gehrmann M et al. Differential protein expression in the cytosol fraction of an MCF-7 breast cancer cell line selected for resistance toward melphalan. *J Proteome Res* 2002; **1**: 435-442.

17 Zheng J, Koblinski JE, Dutson LV et al. Prolyl isomerase cyclophilin A regulation of Janus-activated kinase 2 and the progression of human breast cancer. *Cancer Res* 2008; **68**: 7769-7778.

18 Feng W, Xin Y, Xiao Y et al. Cyclophilin A enhances cell proliferation and xenografted tumor growth of early gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2015; **60**: 2700-11.

19 Obchoei S, Weakley SM, Wongkham S et al. Cyclophilin A enhances cell proliferation and tumor growth of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Mol*

Cancer 2011; **10**: 102-116.

20 Melle C, Osterloh D, Ernst G et al. Identification of proteins from colorectal cancer tissue by two-dimensional gel electrophoresis and SELDI mass spectrometry. *Int*

J Mol Med 2005; **16**: 11-17.

21 Mikuriya K, Kuramitsu Y, Ryozaawa S et al. Expression of glycolytic enzymes is increased in pancreatic cancerous tissues as evidenced by proteomic profiling by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. *Int J Oncol* 2007; **30**: 849-855.

22 Li M, Zhai Q, Bharadwaj U et al. Cyclophilin A is overexpressed in human pancreatic cancer cells and stimulates cell proliferation through CD147. *Cancer* 2006; **106**: 2284-2294.

23 Zhang H, Chen J, Liu F et al. CypA, a gene downstream of HIF-1 α , promotes

the development of PDAC. *PLoS One* 2014; **9**: e92824.

24 Sun S, Wang Q, Giang A et al. Knockdown of CypA inhibits interleukin-8

(IL-8) and IL-8-mediated proliferation and tumor growth of glioblastoma cells through

down-regulated NF- κ B. *J Neurooncol* 2011; **101**: 1-14.

25 Campa MJ, Wang MZ, Howard B et al. Protein expression profiling identifies

macrophage migration inhibitory factor and cyclophilin a as potential molecular targets

in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2003; **63**: 1652-1656.

26 Howard BA, Furumai R, Campa MJ et al. Stable RNA interference-mediated

suppression of cyclophilin A diminishes non-small-cell lung tumor growth in vivo.

Cancer Res 2005; **65**: 8853-8860.

27 Yu X, Harris SL and Levine AJ. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res* 2006; **66**: 4795-4801.

28 Qian Z, Zhao X, Jiang M et al. Downregulation of cyclophilin A by siRNA diminishes non-small cell lung cancer cell growth and metastasis via the regulation of matrix metalloproteinase 9. *BMC Cancer* 2012; **12**: 442-452.

29 Howard BA, Zheng Z, Campa MJ et al. Translating biomarkers into clinical practice: prognostic implications of cyclophilin A and macrophage migratory inhibitory factor identified from protein expression profiles in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004; **46**: 313-323.

30 Choi K, Piao Y, Lim M et al. Overexpressed cyclophilin A in cancer cells renders resistance to hypoxia- and cisplatin-induced cell death. *Cancer Res* 2007; **67**: 3654-6362.

31 Wang GL and Semenza GL Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem* 1993; **268**:21513-21518.

32 Wang GL and Semenza GL Purification and characterization of hypoxia-inducible Factor 1. *J Biol Chem* 1995; **270**: 1230-1237.

33 Foster JG, Wong SC and Sharp TV The hypoxic tumor microenvironment: driving the tumorigenesis of non-small-cell lung cancer. *Future Oncol* 2014; **10**: 2659-2674.

34 Swinson DEB, Jones JL, Cox G et al. Hypoxia - inducible factor - 1 α in non-small cell lung cancer: Relation to growth factor, protease and apoptosis pathways. *Int J Cancer* 2004; **111**: 43-50.

35 Berezowska S, Galvan JA, Langer R et al. Glycine decarboxylase and HIF-1 α expression are negative prognostic factors in primary resected early-stage non-small cell lung cancer. *Virchows Arch* 2017; **470**: 323-330.

36 Kim SJ, Rabbani ZN, Dewhirst MW et al. Expression of HIF-1 α , CA IX, VEGF and MMP-9 in surgically resected non-small lung cancer. *Lung Cancer* 2005; **49**: 325-335.

37 Ren W, Mi D, Yang K et al. The expression of hypoxia-inducible factor-1 α and its clinical significance in lung cancer: a systemic review and meta-analysis. *Swiss Med Wkly* 2013; **143**: w13855.

38 Sobin LH, Gospodarowicz MK and Wittekind C eds. TNM classification of malignant tumours, 7th edn, Oxford: Wiley-Blackwell, 2010.

39 Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 2013; **48**: 452-458.

40 Shimada A, Kano J, Ishiyama T et al. Establishment of an immortalized cell line from a precancerous lesion of lung adenocarcinoma, and genes highly expressed in the early stages of lung adenocarcinoma development. *Cancer Sci* 2005; **96**: 668-675.

41 Koizumi F, Shimoyama T, Taguchi F et al. Establishment of a human non - small cell lung cancer cell line resistant to gefitinib. *Int J Cancer* 2005; **116**: 36-44.

42 Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1973; **51**: 1417-1423.

43 Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn J et al. Epidermal growth factor receptor in

non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol* 2003; **21**: 3798-3807.

44 Nagai Y, Miyazawa H, Huqun et al. Genetic heterogeneity of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cell lines revealed by a rapid and sensitive detection system, the peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR clamp. *Cancer Res* 2005; **65**: 7276-7282.

45 日本肺癌学会・日本病理学会合同 ALK-IHC 精度管理ワーキンググループ
肺癌における ALK 免疫染色プラクティカルガイド(第 1.4 版) 2017 年 2 月 21
日 改訂

46 Hoffmann H and Schiene-Fischer C Functional aspects of extracellular cyclophilins. *Biol Chem* 2014; **395**: 721-735.

47 Minami Y, Matsuno Y, Iijima T et al. Prognostication of small-sized primary pulmonary adenocarcinomas by histopathological and karyometric analysis. *Lung Cancer* 2005; **48**: 339-348.

48 Wu, D and Yotnda, P Induction and Testing of Hypoxia in Cell Culture. *J Vis Exp* 2011; **54**: e2899.

49 Allred DC, Harvey JM, Berardo M et al. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1998; **11**: 155-168.

50 Bakhashab S, Lary S, Ahmed F et al. Reference genes for expression studies in hypoxia and hyperglycemia models in human umbilical vein endothelial cells. *G3 (Bethesda)* 2014; **4**: 2159-2165.

51 Phillips RJ, Mestas J, Gharaee-Kermani M et al. Epidermal growth factor and

hypoxia-induced expression of CXC chemokine receptor 4 on non-small cell lung cancer cells is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/mammalian target of rapamycin signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1 α . *J Biol Chem.* 2005; **280**: 22473-22481.

52 Jung JE, Kim HS, Lee CS et al. STAT3 inhibits the degradation of HIF-1 α by pVHL-mediated ubiquitination. *Exp Mol Med* 2008; **40**: 479-485.

53 Ara T. and Declerck YA. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *Eur J Cancer* 2010; **46**: 1223–1231.

54 Gao SP, Mark KG, Leslie L et al. Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas. *J Clin Invest* 2007; **117**: 3846–3856.

略語一覽

AAH	atypical adenomatous hyperplasia
AIS	adenocarcinoma in situ
ALK	anaplastic lymphoma kinase
BAC	bronchioloalveolar carcinoma
C.I	confidence interval
CA IX	carbonic anhydrase IX
CO ₂	carbon dioxide
CoCl ₂	cobalt (II) chloride
CT	computed tomography
CypA	cyclophilin A
DAB	diaminobenzidine
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EGFR	epidermal growth factor receptor

FBS	fetal bovine serum
FDG	fludeoxyglucose,
GGO	ground glass opacity
GLDC	glycine decarboxylase
HIF-1 α	hypoxia inducible factor-1alpha
HR	hazard ratio
HRE	hypoxia response element
IGBP-1	immunoglobulin binding protein-1
IMA	invasive mucinous adenocarcinoma
IS	intensity score
IL-6	interleukin-6
JAK	Janus activating kinase
JAK2	Janus activating kinase 2
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
Lep	lepidic adenocarcinoma

LNA	locked nucleic acid
MALDI-TOF	matrix-associated laser deposition/ionization time-of-flight
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS	mass spectrometry
MS/MS	tandem mass spectrometry
MIA	minimally invasive adenocarcinoma
MMP-9	matrix metalloprotease-9n.c. no change
non-Lep	non-lepidic adenocarcinoma
NSCLC	non-small cell lung carcinoma: NSCLC
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PNA	peptide nucleic acid
PPIA	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
PS	proportion score
PVDF	polyvinyliden difluoride

ROC	receiver operating characteristic
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SD	standard deviation
SELDI-TOF	surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight
SFN	stratiffin
siRNA	small interfering ribonucleic acid
STAT3	signal transducers and activator of transcription 3
TE buffer	Tris-EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid) buffer
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling
TS	total score
UICC	Union for International Cancer Control
UK	united kingdom
WHO	world health organization