

筑 波 大 学

博 士 （ 医 学 ） 学 位 論 文

肺腺癌における Ovarian cancer
immuno-reactive antigen domain containing 2
(OCIAD2) 発現の
臨床病理学的意義および機能解析

2 0 1 9

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

坂下麻衣

目次

1. 序章

1-1. 肺癌の臨床的特徴および組織学的分類

1-2. OCIAD2 とは

1-3. 研究の目的

2. 肺腺癌における OCIAD2 発現と臨床病理学的特徴

2-1. 材料と方法

i) 患者

ii) Tissue microarray (TMA)を用いた免疫組織化学

iii) 免疫組織化学の評価方法

iv) 統計解析

2-2. 結果

i) OCIAD2 発現と臨床病理学的特徴

ii) OCIAD2 発現と肺腺癌の様々な亜型

iii) OCIAD2 発現と予後

iv) 同一腫瘍内における OCIAD2 発現の heterogeneity

2-3. 考察

3. 肺腺癌細胞株を用いた OCIAD2 の機能解析

3-1. 材料と方法

i) 細胞株と培養条件

ii) siRNA transfection

iii) Quantitative real time reverse transcription PCR (qRT-PCR)

iv) 細胞増殖アッセイ (Cell proliferation assay)

v) Western blotting

vi) 蛍光免疫染色 (Immunofluorescence (IF))

vii) 電子顕微鏡

viii) 統計学的解析

3-2. 結果

i) siRNAのOCIAD2ノックダウン効果

ii) 複数の肺腺癌細胞株でのOCIAD2発現

iii) 細胞増殖アッセイ

iv) アポトーシスアッセイ

v) 蛍光免疫染色を用いた A549 細胞株における OCIAD2 の局在解析

vi) 電子顕微鏡を用いた siOCIAD2 トランスフェクション後の A549 細胞に
おけるミトコンドリアの変化

3-3. 考察

4. 全体の結語

5. 参考文献

6. 謝辞

7. 図

8. 表

1. 序章

1-1. 肺癌の臨床的特徴および組織学的分類

肺癌は全世界において最も罹患率および癌関連死が高い。2012 年時点で全ての癌患者のうち男性の 17 % および女性の 9 % が肺癌に罹患しており、癌関連死の 19 % を占めている。発生率は人口 10 万人当たり、男性は 34.2 人、女性は 13.6 人であり、死亡率は人口 10 万人当たり、男性 30.0 人、女性 11.1 人である (1)。肺癌の多くは進行した段階で診断され、予後は不良であり、5 年生存率は日本において約 30%である (1)。最新の WHO 分類 (第 4 版) によると、組織学的に肺癌は腺癌、扁平上皮癌、神経内分泌癌、大細胞癌の 4 つに大分類され、その他に腺扁平上皮癌、肉腫様癌、唾液腺型腫瘍などの特殊型がある (2)。

これらの中で、腺癌は日本および世界中で最も頻度の高い組織型である。腺癌は更に置換型腺癌、腺房型腺癌、乳頭型腺癌、微小乳頭型腺癌、充実型腺癌に亜型分類され、その他、浸潤性粘液性腺癌、コロイド腺癌、胎児型腺癌、腸型腺癌などの特殊型に分類される。肺腺癌の予後は不良であるが、WHO 分類第 4 版で新たに非常に初期の腺癌として、上皮内腺癌 (*Adenocarcinoma in situ* (AIS)) や微少浸潤性腺癌 (*Minimally invasive adenocarcinoma* (MIA)) が定

義された。勿論、これら 2 つの初期腺癌の予後は非常に良好である (3), (4), (5)。

初期の肺腺癌は異型腺腫様過形成から上皮内腺癌、微少浸潤性腺癌、置換型腺癌（浸潤性腺癌）と多段階的に悪性化していくと考えられている (6)。当研究室（筑波大学医学医療系診断病理学研究室）の野口は小型腺癌分類（野口分類）を 1995 年に報告し、最大径が 2 cm 以下の小型肺腺癌を 6 つに亜分類（type A, B, C, D, E, F）した (3)。Type A, B, C の小型肺腺癌は肺胞上皮置換性増殖を示すのに対し、type D, E, F の小型肺腺癌では肺胞上皮置換性増殖は認められず、充実性、腺房状、乳頭状などの増殖様式を示す。Type A, B, C の小型肺腺癌ではいずれも肺胞上皮置換性増殖がみられるが、予後は異なる。Type A, type B は WHO 分類第 4 版で新たに定義された上皮内腺癌の基礎となったものであり、増殖パターンは置換性増殖のみである。つまり、既存の肺胞構造を置換しながら増殖し、肺胞隔壁を破壊しない増殖様式であり、非浸潤癌と考えられる。また、腺房型、乳頭型などの浸潤性腺癌の増殖様式を示さない。一方、type C では肺胞上皮置換性増殖が優位にみられるものの、浸潤性腺癌の増殖様式も一部で認められる。Type A, B の 5 年生存率は 100 % であるのに対し、type C の 5 年生存率は約 74.8 % である (3)。当研究室では、肺腺癌の初期悪性化に関与する因子を探索する目的で、肺腺癌のうち type A（非浸潤癌）と type C（初期浸潤癌）の発現遺伝子を網羅的に比較している。中でも 2007 年に石山らは suppression

subtractive hybridization 法を用いて Ovarian cancer immuno-reactive antigen domain containing 2 (OCIAD2) が上皮内腺癌と比較して初期浸潤癌に有意に発現が高いと報告した (7)。

1-2. OCIAD2 とは

OCIAD2 は 2002 年に National Institutes of Health Mammalian Gene Collection Program によって、Ovarian cancer immuno-reactive antigen domain containing 1 (OCIAD1) と相同性が高い遺伝子として同定された (8)。OCIAD1 と OCIAD2 は共に 4p11 に存在して OCIAD1 は 11 個のエクソン、OCIAD2 は 7 個のエクソンを有し、OCIAD2 は OCIAD1 と 36.36 %の相同性を有する (9)。

OCIAD2 は 154 アミノ酸から構成される分子量 16954Da の蛋白質であるのに対し、OCIAD1 は 245 アミノ酸から構成される分子量 27626Da の蛋白質である。

OCIAD1 は卵巣癌患者の腹水中に存在する自己抗体として報告され (10)、卵巣癌において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することや (11)、OCIAD1 の高発現が化学療法抵抗性に関与している可能性があること (12)等が報告されている。

一方で OCIAD2 についての報告は少なく、OCIAD2 発現と腫瘍の悪性度や予後に関しての見解は一定していない。当研究室の永田らは、卵巣粘液性腫

瘍では、OCIAD2 の発現は腫瘍の悪性の過程において増加すると報告した (13)。また、グリオーマでは、予後の悪い群で OCIAD2 の過剰発現がみられたという報告がある (14) (15)。一方、肝芽腫では OCIAD2 のメチル化が悪い予後と関連している (16)と報告されている。また、肝細胞癌において OCIAD2 mRNA の発現が低下しているという報告がある (17)。このように、OCIAD2 の発現と予後に関して複数の報告があるものの、腫瘍における OCIAD2 の役割や機能は現在までに解明されていない。

1-3. 研究の目的

当研究室の石山らは、OCIAD2 は肺腺癌の進行に伴い発現が増すが、OCIAD2 mRNA の発現は肺胞上皮置換性増殖を有する浸潤性肺腺癌において良い予後と相関するという報告をした。

私は肺腺癌の進行に伴い OCIAD2 の発現が増すのであれば、浸潤性肺腺癌において OCIAD2 は悪い予後と相関する可能性があるという仮説を立て、本研究ではより多数の肺腺癌症例における OCIAD2 発現と臨床病理学的特徴について、蛋白レベルでの解析を行うことを目的とした。また、OCIAD2 の機能は現在のところほとんど解明されていないため、肺腺癌細胞株を用いて OCIAD2 の機能解析を行うことも目的とした。

2. 肺腺癌における OCIAD2 発現と臨床病理学的特徴

2-1. 材料と方法

i) 患者

筑波大学附属病院において 1999 年から 2007 年の間に外科的に切除され、肺腺癌と診断された組織のうち、206 例を tissue microarray (TMA) の作製に用いることができた。患者の臨床情報はカルテから収集された。全ての患者にインフォームドコンセントを行い、同意が得られた (筑波大学附属病院倫理審査委員会 H29-052)。腫瘍は WHO 分類第 4 版 (2) および UICC の TNM 分類第 8 版に (18) に従って分類された。直径 2 cm 以下の小型肺腺癌は野口分類 (3) (19) による分類も行った。Thyroid transcription factor -1 (TTF-1) および ALK の免疫組織化学の結果、epidermal growth factor receptor (EGFR) 遺伝子変異の結果は病理データベースから収集し、それぞれ 191 例、188 例、37 例の情報が得られた。

ii) TMA を用いた免疫組織化学

TMA は 15 % のホルマリンで固定されたパラフィン包埋ブロックから作製された。HE (hematoxylin and eosin) 染色を行い、2 つの代表的な腫瘍領域を選定した。標本内に非浸潤領域 (置換性増殖成分) および浸潤領域が含まれている場

合は両方の領域を選定した。標本内に非浸潤領域のみ、または浸潤領域のみ、が認められた場合には、2つの代表的な領域を選定した。最終的に TMA は 191 例の肺腺癌症例から作製することができた。

免疫染色は、TMA から得られた 3 μ m の厚さの切片を用いて行われた。切片を脱パラフィン後、10 mM のクエン酸バッファー (pH 6.0) 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。内因性ペルオキシダーゼのブロッキングを行う目的で、Dako REAL TM Peroxidase- Blocking Solution (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) と室温で 5 分反応させた。その後、400 倍希釈したウサギポリクローナル抗 OCIAD2 抗体 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, PA5-20835) を室温で 30 分間反応させた。2 次抗体 (EnVison+Dual Link; Agilent Technologies) と室温で 30 分間反応させた後、DAB (Agilent Technologies) で発色を行い、ヘマトキシリンで対比染色した。これらの免疫組織化学染色は自動免疫染色装置 HISTOSTAINER (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) を用いて行った。陽性コントロールとして腎尿細管を用いた。

iii) 免疫組織化学の評価方法

2 人の病理医（筆者および坂下信悟先生）が、それぞれ独立して、患者の臨床情報を見ずに全ての症例を評価した。OCIAD2 の発現は H-score を用いて

定量化された。H-score とは、陽性細胞の割合 (0-100 %) と陽性細胞の染色強度を掛け合わせたものである (20)。細胞質内に顆粒状の染色性が認められるものを陽性とし、染色強度については 0: 陰性、1+: 40 倍では陰性だが 400 倍では弱い陽性像がみられる、2+: 40 倍で陽性で、400 倍では細胞質内に部分的な陽性像がみられる、3+: 40 倍で陽性で、400 倍では細胞質内にびまん性に陽性像がみられる、と定義した (図 1)。従って H-score は 0 点から 300 点の範囲と設定された。2 人の病理医間で H-score の評価に乖離が生じた場合は、後に話し合いによって H-score を決定した。

iv) 統計解析

統計解析は GraphPad Prism 6 を用いて行い、統計学的有意差を $p < 0.05$ に設定した。ROC 曲線を描く際に OCIAD2 の H-score と全生存期間 (Overall survival; OS) を変数として用いた。OCIAD2 の H-score と臨床病理学的な特徴の相関の評価は、 χ^2 検定を用いて行った。OS および無病生存期間 (Disease free survival; DFS) と OCIAD2 の H-score は Kaplan-Meier 法を用いて解析し、log-rank テストで統計学的有意性の有無を評価した。H-score と *EGFR* 遺伝子変異、ALK (免疫組織化学での分析)、および野口分類との関連は unpaired t-test を用いて解析した。肺腺癌の様々な亜型と H-score との関連は one-way analysis of variance

(ANOVA)を用いて解析した。

2-2. 結果

i) OCIAD2 発現と臨床病理学的特徴

OCIAD2 の臨床病理学的意義を確かめるために、外科的切除された肺腺癌 191 例から TMA を作製し、免疫組織化学による検討を行った。図 2 は代表的な組織像である。図 2 に OCIAD2 蛋白発現が陰性症例（図 2A HE 染色、図 2B OCIAD2 免疫染色）と陽性症例（図 2C HE 染色、図 2D OCIAD2 免疫染色）を示した。OCIAD2 は肺腺癌細胞の胞体内に顆粒状の陽性像を示した（図 2D）。OCIAD2 の発現を H-score を用いて定量化し、高発現群と低発現群に分類した。ROC 曲線を用いてカットオフ値を決め、H-score 130 点以上を高発現群 (n=75)、H-score 130 点未満を低発現群 (n=116)とした。

まず、OCIAD2 の発現と様々な臨床病理学的特徴との関連を分析した。分析した因子は年齢、性別、喫煙歴、TTF-1 陽性の有無、胸膜浸潤、肺内転移、血管侵襲、リンパ管侵襲、T 因子、N 因子、病理学的な病期である（表 1）。OCIAD2 蛋白の発現は有意に血管侵襲 ($p=0.0018$)、リンパ管侵襲 ($p=0.049$)、T 因子 ($p=0.0024$)、病理学的な病期 ($p=0.0003$)と関連していた。

ii) OCIAD2 発現と肺腺癌の様々な亜型

野口分類に従って分類された直径 2 cm 以下の小型肺腺癌 (n=79) の中で、type D, E, F の小型肺腺癌 (浸潤性腺癌、n=26) は type A, B, C', C 小型肺腺癌 (これらは WHO 分類では上皮内腺癌 (非浸潤性)、微少浸潤性腺癌、および置換型腺癌に相当する。n=53) と比較して有意に OCIAD2 発現が高かった ($p=0.0007$) (図 3a)。

肺腺癌の組織学的亜型別について検討すると、上皮内腺癌 (n=16) は乳頭型腺癌 (n=30) ($p<0.05$)、腺房型腺癌 (n=23)、充実型腺癌 (n=39) ($p<0.05$)、浸潤性粘液性腺癌 (n=19) ($p<0.05$) と比較して有意に OCIAD2 発現が低かった (図 3b)。また微少浸潤性腺癌 (n=22) は乳頭型腺癌 (n=30) ($p<0.05$)、充実型腺癌 (n=39) ($p<0.05$) と比較して有意に OCIAD2 発現が低かった。さらに置換型腺癌は乳頭型腺癌 (n=30) ($p<0.05$)、充実型腺癌 (n=39) ($p<0.05$) と比較して有意に OCIAD2 発現が低かった。一方で置換型腺癌を除く浸潤性腺癌においては、OCIAD2 発現に有意差は認められなかった。OCIAD2 の H-score は上皮内腺癌、微少浸潤性腺癌、置換型腺癌の順に高くなっていった。浸潤性粘液性腺癌では、OCIAD2 発現の高い群 (n=10) は OCIAD2 発現の低い群 (n=9) と比較して有意に病期が進行していた ($p=0.0409$) (図 3c)。

次に、遺伝子異常と OCIAD2 蛋白発現との関連について検討した。*EGFR*

遺伝子変異検査の結果がある肺腺癌 (n=37) において、OCIAD2 発現と *EGFR* 遺伝子変異の状態との関連を検討した。全ての検討症例 (37 例) は末梢肺上皮細胞の分化マーカーである TTF-1 タンパク質陽性であり、その中で *EGFR* 遺伝子変異陽性の腺癌 (n=10) では、*EGFR* 野生型の腺癌 (n=27) と比較して有意に OCIAD2 の発現が高かった ($p=0.0403$) (図 3d)。ALK 遺伝子異常解析 (免疫組織化学による検討) を行った肺腺癌 (n=188) では、ALK タンパク質陽性の有無と OCIAD2 発現に有意差はみられなかった ($p=0.310$)。

iii) OCIAD2 発現と予後

OCIAD2 過剰発現の臨床病理学的な意義を調べるために、OCIAD2 の発現と予後との関連を分析した。全ての肺腺癌患者において (n=191)、OCIAD2 高発現群では、OCIAD2 低発現群と比較して有意に OS が悪かった ($p=0.0325$ 、ハザード比 1.63 (95 % 信頼区間: 1.05-2.68), 図 4a)。しかし、DFS は OCIAD2 高発現群と低発現群で有意差はみられなかった ($p=0.21$ 、ハザード比 1.38 (95 % 信頼区間: 0.83-2.35), 図 4b)。また、OCIAD2 発現と予後との関連について、肺腺癌を TTF-1 陽性の有無で分類して検討した。TTF-1 陽性の肺腺癌患者 (n=161) において、OCIAD2 高発現群は低発現群と比較し、有意に OS ($p=0.0152$ 、ハザード比 1.833 (95% 信頼区間: 1.14-3.25)) と DFS ($p=0.0496$ 、ハザード比 1.652 (95 % 信頼区間: 1.07-2.89)) が悪かった (図 4c, d)。

iv) 同一腫瘍内における OCIAD2 発現の heterogeneity

前述したように、OCIAD2 の発現レベルは組織型により異なり、特に置換型領域（非浸潤部）と非置換型領域（浸潤部）で異なっていた。腫瘍が置換型領域と非置換型領域を両方有している場合にはそれぞれの領域から TMA が作製された。このように置換型領域と非置換型領域の両方を有する肺腺癌例（計 34 例）において、OCIAD2 の発現を置換型領域と非置換型領域で比較した。図 5 は代表的な組織像である。OCIAD2 は浸潤部（非置換型領域）では陽性となる傾向(図 5a、下段)が、非浸潤部（置換型領域）では陰性となる傾向があった（図 5a、上段）。浸潤部での H-score は非浸潤部での H-score と比較して有意に高かった ($p < 0.0001$)。なお、全 34 例の組織像は図 6 に示す。

2-3. 考察

石山らは上皮内腺癌（野口分類 type A）を初期浸潤癌（野口分類 type C）と比較し、OCIAD2 の発現が type C で type A よりも高発現していることを発表した (7)。本研究では、OCIAD2 の発現が血管侵襲、リンパ管侵襲、T 因子、病理学的病期などの様々な臨床病理学的因子と関連していることを示した。これらの結果は石山らの報告と一致している。

また、本研究では肺腺癌の予後と OCIAD2 との関連を調べ、OCIAD2 が高発

現の群では予後が悪いという結果が得られた (図 4)。特に、TTF-1 陽性の肺腺癌においては、OCIAD2 高発現群では OCIAD2 低発現群に比べて DFS、OS が共に有意に悪かった。現在までに OCIAD2 の高発現が悪い予後と関連しているという報告は 3 つしかなく、卵巣粘液性腫瘍とグリオーマでの報告があるのみである (13-15)。一方で、OCIAD2 の低発現が悪い予後と関連しているという知見は肝細胞癌と肝芽腫の 2 つで報告されている (16, 17)。これらから、OCIAD2 の発現レベルと予後との関連は腫瘍の原発臓器によって異なる可能性が示唆される。

石山らは OCIAD2 mRNA の発現を *in situ* hybridization を用いて外科的切除された肺腺癌で調べ、OCIAD2 mRNA 高発現は良い予後と相関すると報告した。この報告は本研究の結果と逆の結果となっている。この矛盾した結果にはいくつかの要因が考えられる。第一に、石山らが検討した肺腺癌例は 56 例であり本研究 (191 例) と比較して少ないことが挙げられる。第二に、本研究では OCIAD2 蛋白の発現を免疫組織化学により検討したのに対し、石山らは *in situ* hybridization を用いて OCIAD2 mRNA の発現を調べたことが挙げられる。OCIAD2 蛋白が転写後に修飾された可能性はある。第三に、本研究では乳頭型、腺房型、充実型、微少浸潤型、浸潤性粘液性腺癌などを含む様々な肺腺癌の組織型について分析したのに対し、石山ら検討した肺腺癌は全ての症例が置換

型成分を有する腺癌だったことが挙げられる。言い換えると、石山らは野口分類で type D, E, F と分類される小型の浸潤性肺腺癌の分析や 2 cm 以上の肺腺癌の分析を行っていなかった。

興味深いことに、浸潤領域と非浸潤領域を両方有する肺腺癌では、OCIAD2 の発現が不均一であった (図 5, 6)。OCIAD2 の発現は浸潤部で陽性、非浸潤部で陰性となる傾向がみられた。さらに、置換型腺癌を除く浸潤性腺癌では、OCIAD2 の発現は上皮内腺癌および微少浸潤性腺癌と比較して高かった (図 3)。これらの結果については 2 つの可能性が考えられる。一つは、OCIAD2 の過剰発現は肺腺癌の多段階発癌の過程において OCIAD2 の遺伝子変化が原因で起こるのではなく、むしろ腫瘍細胞の置かれた環境による発現の変化を見ているという可能性、もう一つは、置換型腺癌からほかの浸潤癌の形態に悪性化する際に、OCIAD2 遺伝子そのものに異常が生じているという可能性である。将来の研究で、OCIAD2 の過剰発現の原因について、分子生物学的検討で明らかにしていく必要がある。

EGFR 遺伝子変異を有する肺腺癌では *EGFR* 野生型と比較して OCIAD2 の発現が高かったという結果は大変興味深い。最近 Shinha らは、HEK293 細胞株において OCIAD2 は transcription 3 (STAT3) の活性化 (リン酸化促進) に関与していると報告した (9)。STAT3 は細胞質内に存在する転写因子で、肺腺癌の約

50%、非小細胞肺癌の約 22-65%で常に活性化 (リン酸化)されている(21) (22)。

STAT3 は EGFR の下流に位置しており (23)、*EGFR* 遺伝子変異によって生じるがん効果に重要なメディエーターと考えられている (24) (25) (26)。また、肺腺癌の細胞株において、STAT3 は *EGFR* 遺伝子変異によって活性化され、STAT3 が肺腺癌の腫瘍形成に寄与している可能性も報告されている (27)。本研究で得られた OCIAD2 発現が *EGFR* 遺伝子変異を有する肺腺癌で高いという結果から、OCIAD2 が肺腺癌において STAT3 の活性化と関連している可能性も考えられ、今後の研究で解明していきたい。また、浸潤性粘液性腺癌において、OCIAD2 高発現群では低発現群と比較して有意に病期が進行していたという結果 (図 3c) も得られた。以上の結果をまとめると、OCIAD2 の機能が遺伝子異常や肺癌の組織亜型によって異なる可能性が考えられる。

本研究では、肺腺癌において OCIAD2 の発現が悪い予後と関連し、OCIAD2 の発現が上皮内腺癌から浸潤性腺癌に悪性化する過程で増加していくことが示された。OCIAD2 の発現は予後と関連しており、肺腺癌において OCIAD2 は有用なバイオマーカーである可能性が示唆された。

以上、第 2 章の内容は Pathology international 誌に発表した (28)。

3. 肺腺癌細胞株を用いた OCIAD2 の機能解析

3-1. 材料と方法

i) 細胞株と培養条件

A549 ヒト肺腺癌細胞株は RIKEN Cell Bank (茨城、日本) で購入した。

A549 は 10 % のウシ胎仔血清 (fetal bovine serum, FBS) を加えた DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific) で維持された。A549 は *KRAS* 遺伝子変異陽性 (G12S) である(29)。PL16T は異型腺腫様過形成の不死化細胞株であり、当研究室で樹立された (30)。PL16T は 2% FBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 0.5ng/ml human-EGF (Toyobo, Tokyo, Japan), 5μg/ml human-insulin (Wako), 72ng/ml hydrocortisone (Wako), 40μg/ml human-transferrin (Sigma-Aldrich), および 20ng/ml sodium selenate (Sigma-Aldrich) を加えた MCDB153HAA (Wako, Osaka, Japan) で維持された。

NCI-H1975 (*EGFR* 遺伝子変異陽性、L858R/T790M double mutation), NCI-H1650 (*EGFR* 遺伝子変異陽性、exon 19 deletion) および HCC827 (*EGFR* 遺伝子変異陽性、exon 19 deletion および *EGFR* amplification あり) (31)は the American Type Culture Collection から購入し、10 % の FBS を加えた RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific) で維持された。全ての細胞株は 37 °C の 5 % CO₂ インキュベーターで培養された。

ii) siRNA transfection

OCIAD2 に特異的な siRNA または scrambled RNA (Stealth RNAi Negative Control Medium GC Duplex; Thermo Fisher Scientific) と核酸導入試薬 (lipofectamine RNAiMAX; Thermo Fisher Scientific) を OptiMEM/ reduced serum medium (Thermo Fisher Scientific) において室温で 15 分間インキュベートした。siRNA は 3 種類購入し、OCIAD2 をノックダウンするのに最適な siRNA を後述する qRT-PCR および western blot で検討した。検討に用いた siRNA は以下の 3 種類 (Invitrogen, USA) である。

① 5'-GCGUCUGCUCGUGGAAACCAAGAU-3'

② 5'-CCAGGGACUAGUCUACCAAGGUUAU-3',

③ 5'-UCAUACAUAGGAGUAUGCCAGAGUA-3'

細胞密度 6.0×10^4 / mL の A549 または PL16T に siRNA を加えた。最終的な siRNA の濃度は A549 では 10 nM、PL16T では 5 nM とした。細胞は室温 37°C、5 % CO₂ のインキュベーターで指定された時間まで (24 時間、48 時間、または 72 時間) 培養した。

iii) Quantitative real time reverse transcription PCR (qRT-PCR)

siRNA が OCIAD2 ノックダウンに有効に働いているか確かめる目的、お

よび A549, NCI-H1975, NCI-H1650, HCC827, PL16T の OCIAD2 mRNA 発現量を確かめる目的で qRT-PCR を行った。RNeasy Mini Plus Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて total RNA を抽出し、Agilent 2100 Bioanalyzer (Thermo Fisher Scientific) で RNA の質を評価した。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて cDNA を合成し、SYBR® Premix EX Taq™ (Perfect Real Time, Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて qPCR を GeneAmp® 7300 sequence detection system (Thermo Fisher Scientific)で行った。OCIAD2 プライマーの配列は OCIAD2-forward: 5'-TCAGCGTCTGCTCGTGGAA-3', OCIAD2-reverse: 5'-TGAGATCTCTGCTCTGTGGATGTG-3' (Takara bio, Shiga, Japan)とした。内在性コントロールとして 18S ribosomal RNA を用いた。プライマーの配列は forward; 5'-ACTCAACACGGGAAACCTCA-3', reverse; 5'-AACCAGACAAATCGCTCCAC-3' (reverse primer)である。

iv) 細胞増殖アッセイ (Cell proliferation assay)

siRNA トランスフェクション後、細胞を 96 well のプレートに蒔き、指定の時間まで培養した。それぞれのグループに対し、8 個の複製を用意した。Cell Counting Kit-8 (DOJINDO, Kumamoto, Japan) を用いて製造者のプロトコールに従い、WST-8 細胞増殖アッセイを行った。

v) Western blotting

Western blottingは当研究室で以前報告したプロトコールを用いて行った(32)。1次抗体は抗OCIAD2抗体 (1: 1000, Thermo Fisher Scientific, PA5-20835), 抗beta-actin (ACTB) 抗体 (1:5000, Thermo Fisher Scientific), anti-caspase 3 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology), および抗poly ADP ribose polymerase (PARP) 抗体 (1:500, Cell Signaling Technology) を用いた。免疫反応性は horseradish peroxidase (Thermo Fisher Scientific) と結合した特異的な2次抗体で検出した。アポトーシス検出の陽性コントロールとして、カンプトテシン(Sigma-Aldrich) で処理したA549の細胞溶解液を用い、カンプトテシンの最終濃度は10 μ M とした。陰性コントロールにはカンプトテシンで処理されていないA549の細胞溶解液を用いた。

vi) 蛍光免疫染色 (Immunofluorescence (IF))

A549 細胞にsiRNAトランスフェクションを行い48時間培養した後、12-well plates with coated cover slips (Iwaki Biosciences, Tokyo, Japan) に蒔き、10 % 中性緩衝ホルマリン液で15分間室温にて固定した。PBSでよく洗浄した後、ブロッキングバッファーでブロッキングした。その後1次抗体として抗OCIAD2抗体 (1: 200, rabbit polyclonal, Thermo Fisher Scientific, PA5-20835) または抗voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC1) 抗体 (1:100, mouse monoclonal, Abcam, ab14734)) を用い、室温で1時間反応させた。PBSでよく洗浄

した後、2次抗体としてAlexa Fluor 568標識抗ウサギIgG抗体および Alexa Fluor 488標識抗マウスIgG抗体 (Thermo Fisher Scientific) と室温で1時間反応させた。スライドをfluorescent mounting medium containing 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (VECTASHIELD, Vector laboratories, Inc., Burlingame, CA)で封入した。標本は蛍光顕微鏡 (Biorevo BZ 9000, KEYENCE, Osaka, Japan) を用いて分析した。

vii) 電子顕微鏡

A549を用いてsiRNAトランスフェクションを行い、48時間または72時間培養した後、トルエン抵抗性プラスチックを用いて作られた6 wellのプレート (Wako, Osaka, Japan) に蒔いた。0.1 Mリン酸バッファ(PB) (pH7.4) を用いた2.5 %のグルタルアルデヒド、4℃で前固定した。PBで3回よく洗浄した後、1 %の四酸化オスミウムを用いて4℃で1時間30分、後固定した。その後エタノールで脱水 (50 %エタノール室温15分、70 %エタノール室温15分、80 %エタノール室温15分、95 %エタノール室温15分、100 %エタノール室温10分・3回)した後、プロピレンオキシドを室温で20分間置換し、プロピレンオキシドおよびエポンをデシケータ内に3時間以上静置してエポン樹脂に浸透し、脱気しながらエポンを包埋した。その後、加温重合 (37 °C 12時間、45 °C 12時間、60 °C 24時間、60 °C 20時間) した。超薄切切片を作製し、5 % 酢酸ウラン染色およびReynolds法(33)を用いた鉛染色による二重染色を行った。その後、切片を透過型電子顕微

鏡 (JEM-1400, JEOL, Japan) で観察した。ミトコンドリアの数は10個の異なる細胞で計測し、クリステの数は異なる細胞の10個のミトコンドリアで計測した。

viii) 統計学的解析

統計解析はGraphPad Prism 6を用いて行い、統計学的有意差を $p < 0.05$ に設定した。細胞増殖アッセイ、1細胞当たりのミトコンドリアの数および1ミトコンドリア当たりのクリステの数はunpaired t-testを用いて解析した。

3-2. 結果

i) si RNAのOCIAD2ノックダウン効果

qRT-PCRの結果、コントロールでのOCIAD2のmRNA発現量を1とした時、各siRNAでのOCIAD2 mRNA発現量は①0.00485, ②0.0138, ③0.0943といずれにおいてもOCIAD2 mRNAの発現は抑制されていた (図7a)。また、western blottingでも検証したところ、コントロールと比較していずれのsiRNAもOCIAD2蛋白発現が抑制されていた (図7b)。これらの結果から、siOCIAD2①が最もOCIAD2のノックダウン効果があると考えられ、今後の実験にはsiOCIAD2①を用いる方針とした。

ii) 複数の肺腺癌細胞株でのOCIAD2発現

qRT-PCRの結果、A549でのOCIAD2 mRNA発現量を1としたとき、各肺腺

癌細胞株でのOCIAD2 mRNA発現量はH1975:1.81, H1650: 0.80, HCC827: 4.28, PL16T: 1.00だった。Western blottingでは、A549とH1650がほぼ同程度の蛋白発現量で、H1975, HCC827, およびPL16TはA549と比較してOCIAD2の蛋白発現量が高かった。OCIAD2 mRNAの発現量はA549とPL16Tはほぼ同程度であったが、OCIAD2蛋白発現量はPL16Tの方がA549よりも高かった。その他の細胞株(H1975, H1650, HCC827)では、OCIAD2 mRNAとOCIAD2蛋白発現量は同じ傾向がみられた。

iii) 細胞増殖アッセイ

A549 では、siOCIAD2 をトランスフェクションしてから 72 時間後において、コントロールと比較して細胞数は有意に減少していた ($p<0.001$ 、図 9a)。PL16T では、siOCIAD2 をトランスフェクションしてから 24 時間後 ($p=0.047$) および 48 時間後 ($p=0.00055$) に細胞数は有意に減少していた。HCC827 では、siOCIAD2 をトランスフェクションしてから 24 時間後 ($p<0.001$) および 48 時間後 ($p<0.001$) に細胞数は有意に増加していた。

iv) アポトーシスアッセイ

A549, PL16T において、OCIAD2 はアポトーシスを抑制することによっ

て腫瘍細胞の増殖に寄与していると仮説を立て、A549 細胞株で OCIAD2 のノックダウンを行い、アポトーシス効果があるかを調べた。siOCIAD2 をトランスフェクションしてから 72 時間後、cleaved PARP と cleaved caspase-3 が誘導された (図 10)。

v) 蛍光免疫染色を用いた A549 細胞株における OCIAD2 の局在解析

COMPARTMENTS データベース (34)での予備検索の結果、OCIAD2 はミトコンドリアに局在していると考えられていた。さらに、HeLa 細胞では OCIAD2 はミトコンドリアに局在しているという報告されていた (35)。また、第 2 章で行った免疫組織化学の結果、OCIAD2 は肺腺癌において腫瘍細胞の胞体内に顆粒状に陽性となった。これらから、OCIAD2 はミトコンドリアに局在し、ミトコンドリアの機能と関連しているという仮説を立てた。まず、肺腺癌における OCIAD2 の局在を確認するため、A549 細胞株を用いて蛍光免疫染色を行った。また、OCIAD2 ノックダウンにより OCIAD2 の局在が変化するかを確かめるため、A549 細胞株に siOCIAD2 をトランスフェクションしてから 48 時間後の細胞も用いて蛍光免疫染色を行った。コントロールとして scrambled RNA を、ミトコンドリアマーカーとして VDAC1 を用いた。A549 細胞に scrambled RNA をトランスフェクションしたもの (コントロール群) では、OCIAD2 の局在と

VDAC1 の局在は merge し、OCIAD2 はミトコンドリアに局在していると考えられた (図 11a)。OCIAD2 および VDAC1(ミトコンドリア) の大部分は核周囲の細胞質に存在しており、特に核周囲の 1 部分に集中して認められた (図 11a, 矢印)。A549 に siOCIAD2 をトランスフェクションした群では、OCIAD2 および VDAC1 のシグナル強度は共に減少していた (図 11b)。さらに、OCIAD2 と VDAC1 は細胞質内に散らばるように存在した。

vi) 電子顕微鏡を用いた siOCIAD2 トランスフェクション後の A549 細胞におけるミトコンドリアの変化の観察

蛍光免疫染色の結果から、OCIAD2 ノックダウンによりミトコンドリアの数が減少し、ミトコンドリアの細胞質内における分布が変化すると仮説を立てた。OCIAD2 ノックダウンによるミトコンドリアの形態変化をさらに詳細に分析するために、電子顕微鏡を用いて siOCIAD2 をトランスフェクションしてから 48 時間後および 72 時間後の A549 細胞株を観察した。

Scrambled RNA をトランスフェクションした A549 細胞株 (コントロール群) では、48 時間後および 72 時間後いずれにおいても、ミトコンドリアは核周囲の細胞質に局在しており、特に 1 カ所に集中して認められた (図 12a)。一方で、siOCIAD2 をトランスフェクションした A549 細胞株では、48 時間後におい

て、ミトコンドリアは核周囲の細胞質に比較的均一に分布していた。つまり、一カ所に集中して存在はしていなかった（図 12b）。ミトコンドリアのクリステは不明瞭となっていた。72 時間後では、ミトコンドリアは細胞質内に散在性に存在しており、クリステは著明に不明瞭となっていた（図 12b 下段）。また、1 細胞当たりのミトコンドリアの数（図 12c）および 1 ミトコンドリア当たりのクリステの数（図 12d）は、siOCIAD2 をトランスフェクションした A549 細胞では、コントロール群（scrambled RNA をトランスフェクションした A549 細胞）と比較し 48 時間後（ $p<0.0001$ ）および 72 時間後（ $p<0.0001$ ）いずれにおいても、有意に減少していた。

3-3. 考察

OCIAD2 の機能解析を *in vitro* で行った。第 2 章では、OCIAD2 の発現は mRNA と蛋白で乖離がある可能性が考えられ、本章では様々な肺腺癌細胞株における OCIAD2 の mRNA 発現量および蛋白発現を調べた。OCIAD2 mRNA の発現量は A549 と PL16T はほぼ同程度であったが、OCIAD2 蛋白発現量は PL16T の方が A549 よりも高く、PL16T においては OCIAD2 mRNA と OCIAD2 蛋白の発現の仕方に乖離があった。ただし、その他の細胞株（H1975, H1650, HCC827）では、OCIAD2 mRNA と OCIAD2 蛋白発現量は同じ傾向がみられ、肺腺癌の種

類によって、mRNA と蛋白の発現が異なる可能性が考えられた。また、*EGFR* 遺伝子変異および *EGFR* amplification を有する細胞株である HCC827 では、*EGFR* 遺伝子変異を有さない A549 (*KRAS* 遺伝子変異陽性) と比較して OCIAD2 mRNA 発現量は約 4 倍高く、*EGFR* 遺伝子変異と OCIAD2 発現に相関がある可能性が示唆された。第 2 章における検討では *EGFR* 遺伝子変異を有する肺腺癌で OCIAD2 蛋白発現 (H-score) が有意に高かったが、*in vitro* でも同様の結果が得られた。第 2 章で述べたように、OCIAD2 は *EGFR* の下流にある STAT3 の活性化に重要であるという報告があり (9)、OCIAD2 の発現と *EGFR* 遺伝子変異には関連がある可能性が本章の実験からも示唆された。

細胞増殖アッセイによる検討では、OCIAD2 ノックダウンにより A549 および PL16T では細胞増殖が有意に抑制された。Sinha らは HEK293 細胞株において OCIAD2 は細胞増殖には関与していないと報告した (9)が、本実験より A549、PL16T において OCIAD2 は腫瘍細胞の生存に関与している可能性が示唆された。一方で、HCC827 では OCIAD2 ノックダウンにより細胞増殖がむしろ増加した。この理由については現時点では不明であるが、*EGFR* 遺伝子変異を有する腺癌では OCIAD2 の機能が *EGFR* 野生型の腺癌と異なる可能性がある。

アポトーシスアッセイによる検討では、OCIAD2 ノックダウンにより

A549 では cleaved PARP および cleaved caspase-3 が誘導され、OCIAD2 はアポトーシスを抑制していると考えられた。現在、アポトーシスの経路は主として外因性経路、内因性経路、およびパーフォリン/グランザイム経路の3つが考えられており (36)、これらの経路は最終的に caspase-3 を活性化し、アポトーシスを起こす。内因性経路では多くの場合はミトコンドリアがアポトーシスシグナルの集約される場となり、ミトコンドリアの膜透過性が亢進することにより、シトクロム c や Smac などのアポトーシス誘導蛋白が細胞質に漏出し、ATP、Apaf-1 と共同で caspase-9、caspase-3 を活性化し、アポトーシスが実行される。カスパーゼは核ラミン (37)、PARP などの DNA 修復酵素 (38)、actin (39)、fodrin (40)、gelsolin (41) などの細胞骨格蛋白といった数多くの細胞内蛋白を開裂 (cleave) することによって細胞死を引き起こす。ただし、ミトコンドリアを介さないアポトーシス経路もある。本実験では OCIAD2 がアポトーシスの抑制に関与しているということは caspase-3 および PARP の開裂がみられたことで判定しており、ミトコンドリアを介する経路であるかは検証していない。将来 OCIAD2 がアポトーシスのどの経路と関連しているのかを詳しく検討し、ミトコンドリアの機能と関連しているのかを確かめる必要がある。

蛍光免疫染色による検討では、OCIAD2 がミトコンドリアに局在していることが確認された。OCIAD2 は細胞質内の核周囲に存在し、一点に集中して分

布していた。電子顕微鏡による検討では、OCIAD2 ノックダウンにより、ミトコンドリアは細胞質内に散らばるように分布した。また、OCIAD2 ノックダウンによりミトコンドリアの形態学的な変化が起こり、ミトコンドリアの数やクリステの数は著明に減少した。Embryonic stem (ES) 細胞では、ミトコンドリアは核周囲に存在し、幹細胞においてミトコンドリアが核周囲に存在している細胞の割合が自己複製能や多分化能といった stemness の指標となりうるという報告がある(42)。また、A549 細胞では、lung cancer stem cells と考えられる細胞はミトコンドリアが核周囲に分布しており (43)、ミトコンドリアの分布は微小管や中間径フィラメントといった細胞骨格に強く影響を受けることから (44)、癌細胞においても核周囲に分布するミトコンドリアの割合が stemness の指標となる可能性があると報告されている (43)。本研究では OCIAD2 ノックダウンをしていない状態では核周囲の細胞質にミトコンドリアの分布が多くみられたのに対して OCIAD2 ノックダウンによりミトコンドリアが細胞質内に散らばるように分布したということから、既に報告されている内容と合わせて、OCIAD2 が癌の stemness に密接に関連している可能性も考えられた。

本研究では、A549 細胞において、OCIAD2 が細胞増殖、アポトーシスの抑制、ミトコンドリアの分布やミトコンドリアの細胞形態の維持に関与していることが示された。

4. 全体の結語および今後の課題

肺腺癌における OCIAD2 の意義を検討するため、2 つの解析を行った。

解析 1 (第 2 章) では、肺腺癌において OCIAD2 の高発現が悪い予後と関連することが示された。特に TTF-1 陽性の肺腺癌においてその傾向が強く、組織学的な検討において OCIAD2 の発現が上皮内腺癌から浸潤性腺癌に悪性化する過程で増加していくことが示され、肺腺癌において重要な蛋白であると考えられた。

一方、解析 2 (第 3 章) では OCIAD2 のノックダウンによる検討により、OCIAD2 が肺腺癌細胞株において細胞増殖、アポトーシスの抑制、ミトコンドリアの分布やミトコンドリアの細胞形態の維持に関与していることが示された。

今後の課題としては、OCIAD2 が *EGFR* 遺伝子変異とどのように関連しているのかを解明すること、より多くの肺腺癌細胞株で機能解析の検討を行うこと、OCIAD2 がミトコンドリアの機能と関連しているのか（アポトーシスの経路や stemness の検討）をより詳細に検討することなどが挙げられる。

5. 参考文献

1. Cheng TY, Cramb SM, Baade PD, Youlden DR, Nwogu C, Reid ME. The International Epidemiology of Lung Cancer: Latest Trends, Disparities, and Tumor Characteristics. *J Thorac Oncol*. 2016;11(10):1653-71.
2. International Agency for Research on Cancer, Travis WD, Brambilla E, Burke A, Marx A, Nicholson AG. WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. 4th Edition. ed: IARC; 2015. p412 .
3. Noguchi M, Morikawa A, Kawasaki M, Matsuno Y, Yamada T, Hirohashi S, et al. Small adenocarcinoma of the lung. Histologic characteristics and prognosis. *Cancer*. 1995;75(12):2844-52.
4. Kadota K, Villena-Vargas J, Yoshizawa A, Motoi N, Sima CS, Riely GJ, et al. Prognostic significance of adenocarcinoma in situ, minimally invasive adenocarcinoma, and nonmucinous lepidic predominant invasive adenocarcinoma of the lung in patients with stage I disease. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(4):448-60.
5. Maeshima AM, Tochigi N, Yoshida A, Asamura H, Tsuta K, Tsuda H. Histological scoring for small lung adenocarcinomas 2 cm or less in diameter: a reliable prognostic indicator. *J Thorac Oncol*. 2010;5(3):333-9.
6. Noguchi M. Stepwise progression of pulmonary adenocarcinoma--clinical and molecular implications. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29(1):15-21.
7. Ishiyama T, Kano J, Anami Y, Onuki T, Iijima T, Morisita Y, 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):50-7.
8. Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, 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):16899-903.
9. Sinha S, Bheemsetty VA, Inamdar MS. A double helical motif in OCIAD2 is essential for its localization, interactions and STAT3 activation. *Sci Rep*. 2018;8(1):7362.
10. Luo LY, Soosaipillai A, Diamandis EP. 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):401-6.
11. Sengupta S, Michener CM, Escobar P, Belinson J, Ganapathi R. Ovarian cancer immuno-reactive antigen domain containing 1 (OCIAD1), a key player in ovarian cancer cell adhesion. *Gynecol Oncol*. 2008;109(2):226-33.
12. Wang C, Michener CM, Belinson JL, Vaziri S, Ganapathi R, Sengupta S. 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):1709-18.
13. Nagata C, Kobayashi H, Sakata A, Satomi K, Minami Y, Morishita Y, et al. Increased expression of OCIA domain containing 2 during stepwise progression of ovarian mucinous tumor. *Pathol Int.* 2012;62(7):471-6.
14. Nikas JB. A mathematical model for short-term vs. long-term survival in patients with glioma. *Am J Cancer Res.* 2014;4(6):862-73.
15. Nikas JB. Independent validation of a mathematical genomic model for survival of glioma patients. *Am J Cancer Res.* 2016;6(6):1408-19.
16. Honda S, Minato M, Suzuki H, Fujiyoshi M, Miyagi H, Haruta M, et al. Clinical prognostic value of DNA methylation in hepatoblastoma: Four novel tumor suppressor candidates. *Cancer Sci.* 2016;107(6):812-9.
17. Zhang R, Zhao C, Xiong Z, Zhou X. Pathway bridge based multiobjective optimization approach for lurking pathway prediction. *Biomed Res Int.* 2014;351095.
18. Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. Eighth edition. ed. Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.; 2017.
19. Minami Y, Matsuno Y, Iijima T, Morishita Y, Onizuka M, Sakakibara Y, et al. Prognostication of small-sized primary pulmonary adenocarcinomas by histopathological and karyometric analysis. *Lung Cancer.* 2005;48(3):339-48.
20. Budwit-Novotny DA, McCarty KS, Cox EB, Soper JT, Mutch DG, Creasman WT, et al. Immunohistochemical analyses of estrogen receptor in endometrial adenocarcinoma using a monoclonal antibody. *Cancer Res.* 1986;46(10):5419-25.
21. Gao SP, Mark KG, Leslie K, Pao W, Motoi N, Gerald WL, et al. Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas. *J Clin Invest.* 2007;117(12):3846-56.
22. Zimmer S, Kahl P, Buhl TM, Steiner S, Wardelmann E, Merkelbach-Bruse S, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer influence downstream Akt, MAPK and Stat3 signaling. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009;135(5):723-30.
23. Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science.* 1994;264(5155):95-8.
24. Harada D, Takigawa N, Kiura K. The Role of STAT3 in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel).* 2014;6(2):708-22.
25. Shao H, Cheng HY, Cook RG, Tweardy DJ. Identification and characterization of

signal transducer and activator of transcription 3 recruitment sites within the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* 2003;63(14):3923-30.

26. Jiang R, Jin Z, Liu Z, Sun L, Wang L, Li K. Correlation of activated STAT3 expression with clinicopathologic features in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Mol Diagn Ther.* 2011;15(6):347-52.

27. Greulich H, Chen TH, Feng W, Janne PA, Alvarez JV, Zappaterra M, et al. Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and -resistant EGFR mutants. *PLoS Med.* 2005;2(11):e313.

28. Sakashita M, Sakashita S, Murata Y, Shiba-Ishii A, Kim Y, Matsuoka R, et al. High expression of ovarian cancer immunoreactive antigen domain containing 2 (OCIAD2) is associated with poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Pathol Int.* 2018;68(11):596-604.

29. Singh A, Greninger P, Rhodes D, Koopman L, Violette S, Bardeesy N, et al. A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival. *Cancer Cell.* 2009;15(6):489-500.

30. Shimada A, Kano J, Ishiyama T, Okubo C, Iijima T, Morishita Y, 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(10):668-75.

31. Yang CH, Chou HC, Fu YN, Yeh CL, Cheng HW, Chang IC, et al. EGFR over-expression in non-small cell lung cancers harboring EGFR mutations is associated with marked down-regulation of CD82. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(7):1540-9.

32. Sato T, Shiba-Ishii A, Kim Y, Dai T, Husni RE, Hong J, et al. miR-3941: A novel microRNA that controls IGBP1 expression and is associated with malignant progression of lung adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 2017;108(3):536-42.

33. REYNOLDS ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.* 1963;17:208-12.

34. Binder JX, Pletscher-Frankild S, Tsafou K, Stolte C, O'Donoghue SI, Schneider R, et al. COMPARTMENTS: unification and visualization of protein subcellular localization evidence. *Database (Oxford).* 2014;2014:bau012.

35. Han J, Jung S, Jang J, Kam TI, Choi H, Kim BJ, et al. OCIAD2 activates γ -secretase to enhance amyloid β production by interacting with nicastrin. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(13):2561-76.

36. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.

37. Lazebnik YA, Takahashi A, Moir RD, Goldman RD, Poirier GG, Kaufmann SH, et al. Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during

apoptotic execution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(20):9042-6.

38. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*. 1994;371(6495):346-7.

39. Mashima T, Naito M, Fujita N, Noguchi K, Tsuruo T. Identification of actin as a substrate of ICE and an ICE-like protease and involvement of an ICE-like protease but not ICE in VP-16-induced U937 apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;217(3):1185-92.

40. Cryns VL, Bergeron L, Zhu H, Li H, Yuan J. Specific cleavage of alpha-fodrin during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by an interleukin-1beta-converting enzyme/Ced-3 protease distinct from the poly(ADP-ribose) polymerase protease. *J Biol Chem*. 1996;271(49):31277-82.

41. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, et al. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*. 1997;278(5336):294-8.

42. Lonergan T, Bavister B, Brenner C. Mitochondria in stem cells. *Mitochondrion*. 2007;7(5):289-96.

43. Ye XQ, Li Q, Wang GH, Sun FF, Huang GJ, Bian XW, et al. Mitochondrial and energy metabolism-related properties as novel indicators of lung cancer stem cells. *Int J Cancer*. 2011;129(4):820-31.

44. Chen H, Vermulst M, Wang YE, Chomyn A, Prolla TA, McCaffery JM, et al. Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell*. 2010;141(2):280-9.

6. 謝辞

本研究を遂行するにあたって、ご指導いただきました筑波大学医学医療系診断病理学教室野口雅之教授に心から感謝いたします。また、研究に関してご指導をいただきました研究室の皆様に深く感謝いたします。筑波大学付属病院病理部の古屋周一郎主任技師、村田佳彦主任技師には技術面で多大なご協力をいただきました。心から感謝いたします。電子顕微鏡の観察については、筑波大学医学医療系医学電子顕微鏡室秦泉寺裕子様、水戸済生会総合病院大谷明夫病理部長に多大なご協力、ご助言をいただき、心から感謝いたします。

その他、様々な形でご指導・ご協力いただいた多くの方々に感謝いたします。

7. 図

図 1. OCIAD2 の H score 染色強度 0: 陰性。

1+: 40 倍では陰性だが 400 倍では弱い陽性像がみられる。

2+: 40 倍で陽性で、400 倍では細胞質内に部分的な陽性像がみられる。

3+: 40 倍で陽性で、400 倍では細胞質内にびまん性に陽性像がみられる。

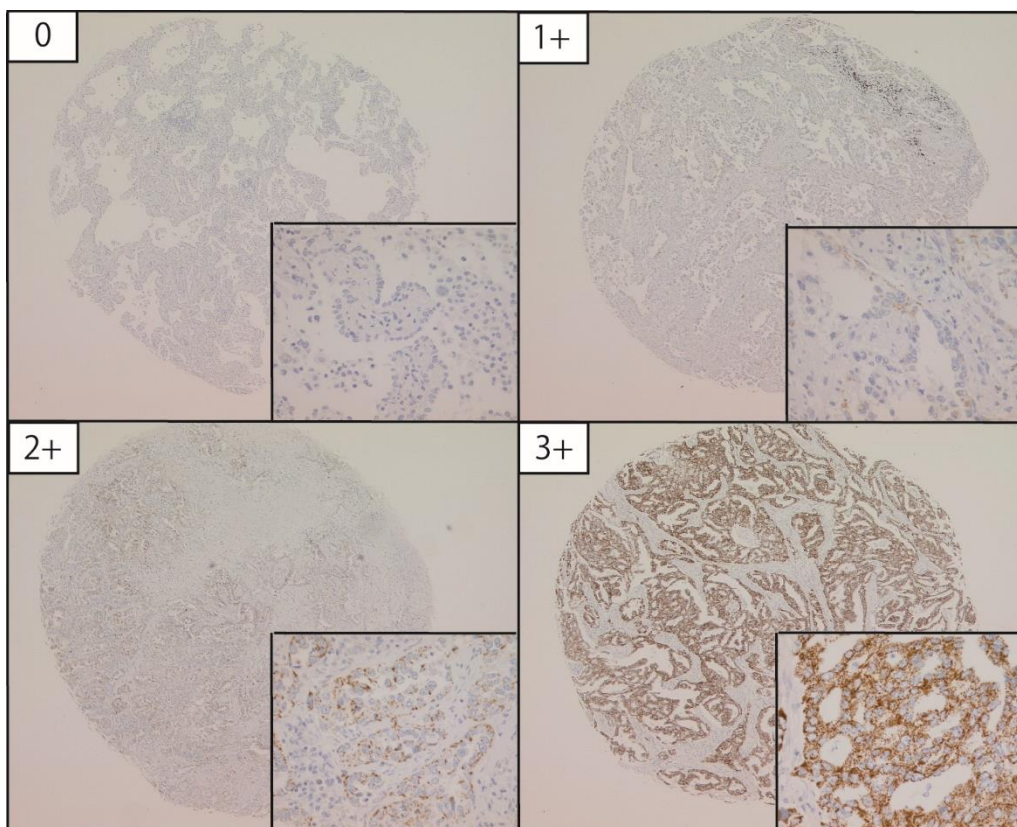


図 2. OCIAD2 免疫組織化学の代表的な組織像

A (HE 染色)、B (OCIAD2 免疫組織化学) : OCIAD2 免疫染色が陰性の肺腺癌症例。

C (HE 染色)、D (OCIAD2 免疫組織化学) : OCIAD2 免疫染色が陽性の肺腺癌症例。

OCIAD2 は細胞質内に顆粒状の陽性像を示した。

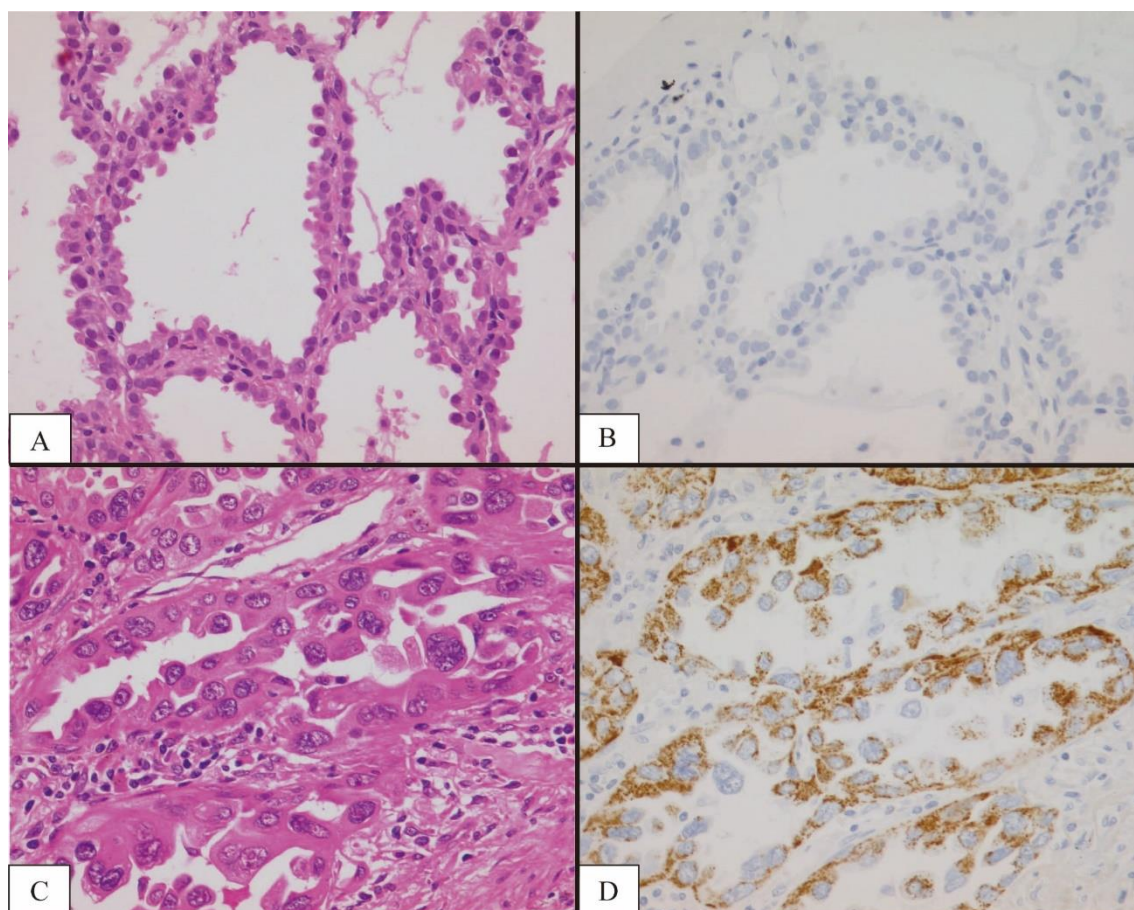


図 3. OCIAD2 発現と肺腺癌の様々な亜型

a. 直径 2 cm 以下の小型肺腺癌 における野口分類と OCIAD2 発現の検討

(t 検定): type D, E, F は type A, B, C', C と比較して有意に H score が高い。

b. 肺腺癌の様々な亜型における OCIAD2 発現の検討 (ANOVA): OCIAD2 の発現

は AIS、MIA、置換型腺癌、置換型を除く浸潤性腺癌の順に高くなっていく。

c. 浸潤性粘液性腺癌における OCIAD2 発現と病期の検討 (t 検定):OCIAD2

高発現群は低発現群と比較し、有意に病期が進行している。

d. *EGFR* 遺伝子変異と OCIAD2 発現の検討 (t 検定):*EGFR* 遺伝子変異陽性例で

は野生型と比較し、OCIAD2 発現が有意に高い。

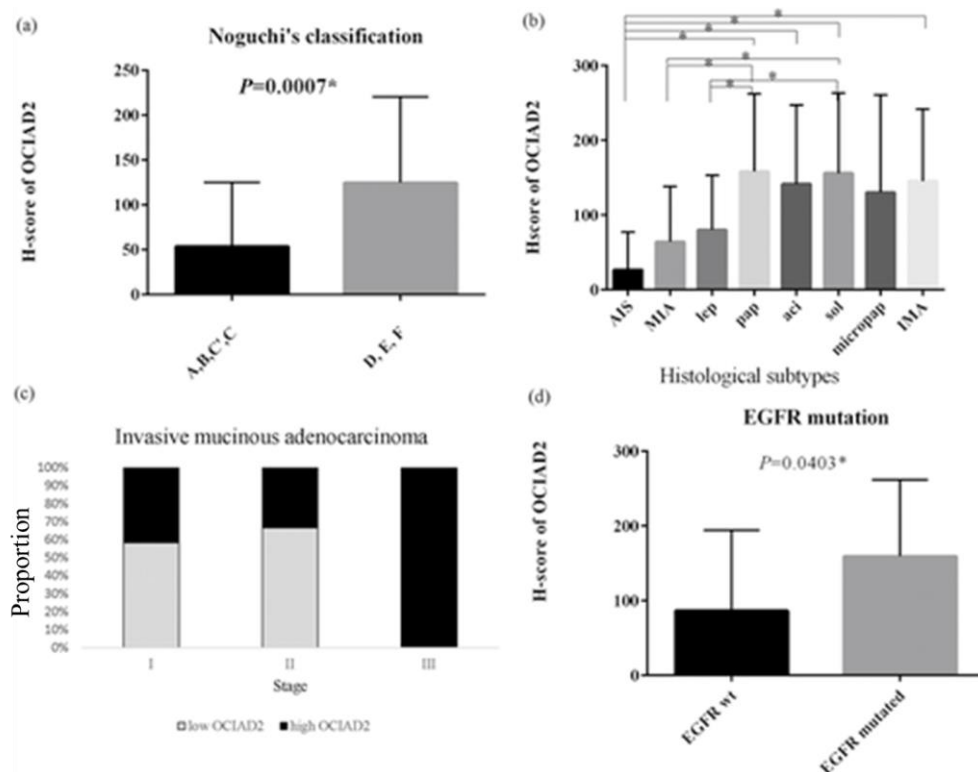
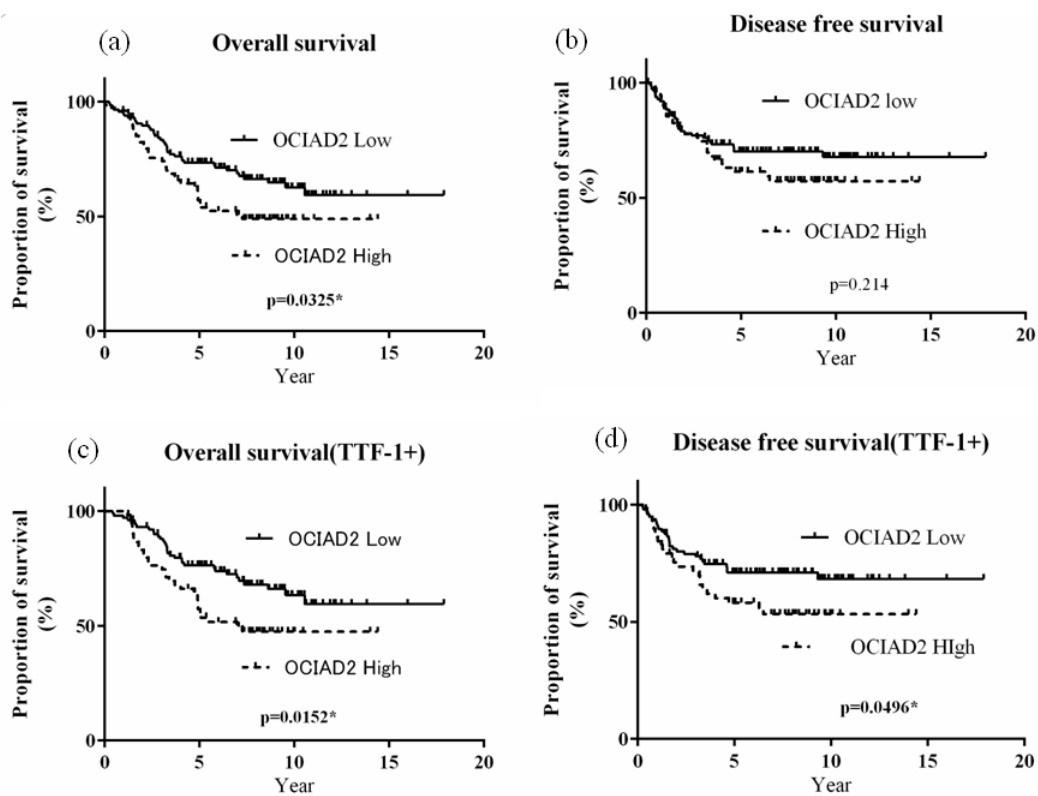


図 4. OCIAD2 発現と予後

- a) 全例における Overall survival
- b) 全例における Disease free survival
- c) TTF-1 陽性例における Overall survival
- d) TTF-1 陽性例における Disease free survival

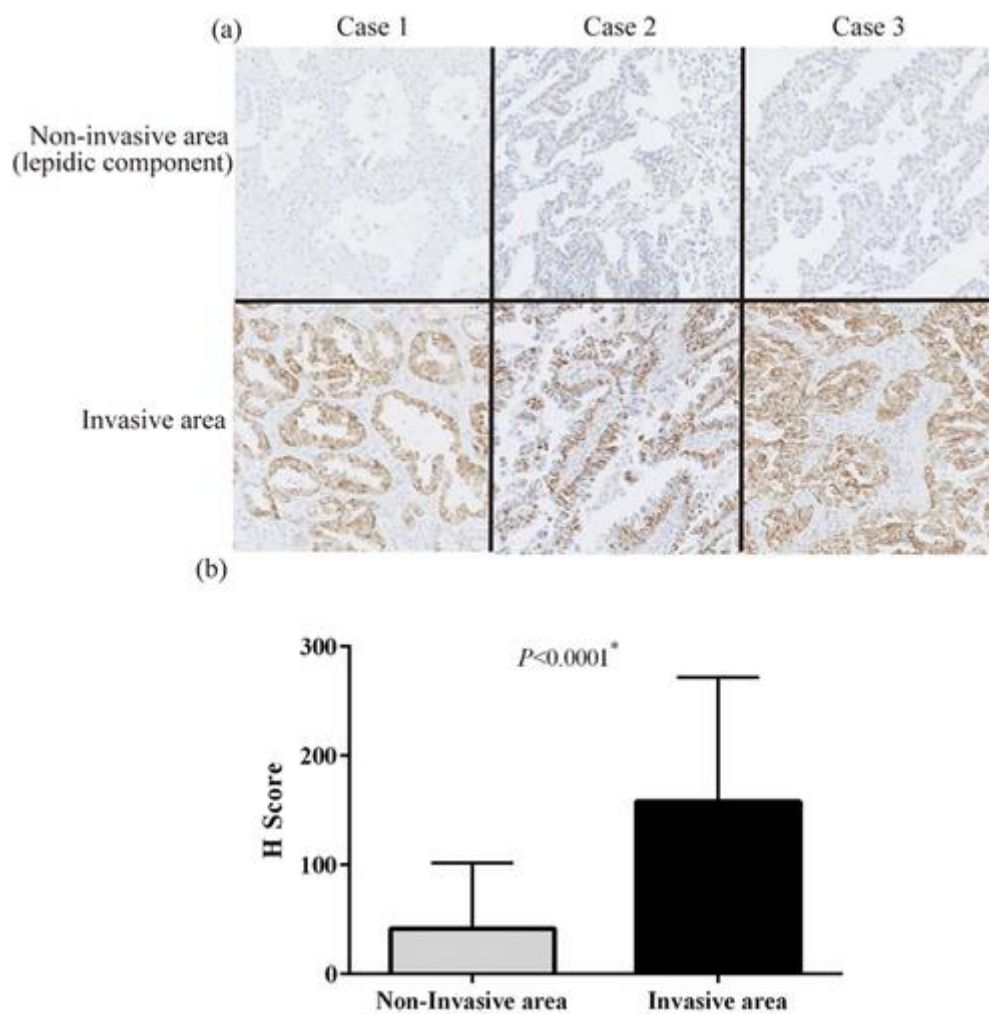


OCIAD2 高発現群は低発現群と比較して予後が悪い。

図 5. 同一腫瘍内における OCIAD2 発現の heterogeneity

a) 非浸潤部 (上段)と浸潤部 (下段)の H-score に乖離がみられた症例 (代表例)。

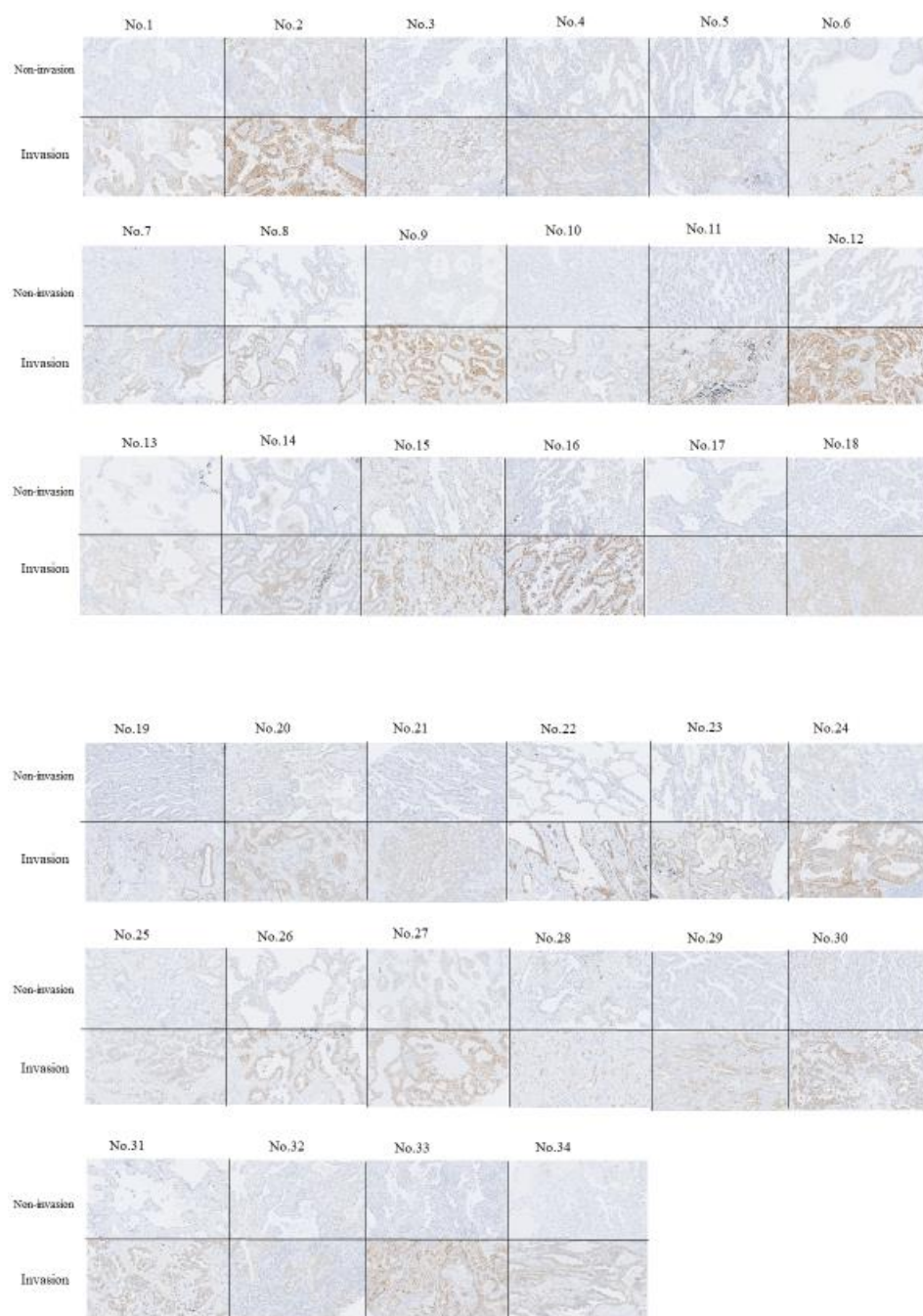
b) 非浸潤部と浸潤部の H-score (t-検定)。



同一腫瘍内においても OCIAD2 の発現に差がみられる。浸潤部では非浸潤部と比較し、OCIAD2 の発現が高い。

図 6. 同一腫瘍内における OCIAD2 発現の heterogeneity がみられた

34 例の組織像 (heterogeneity を示したすべての腫瘍の図)



No.9, No.16, No.12 がそれぞれ図 5a の Case 1, Case 2, Case 3 に相当する。

図 7.siRNA による OCIAD2 ノックダウン効果の検証

a) qRT-PCR

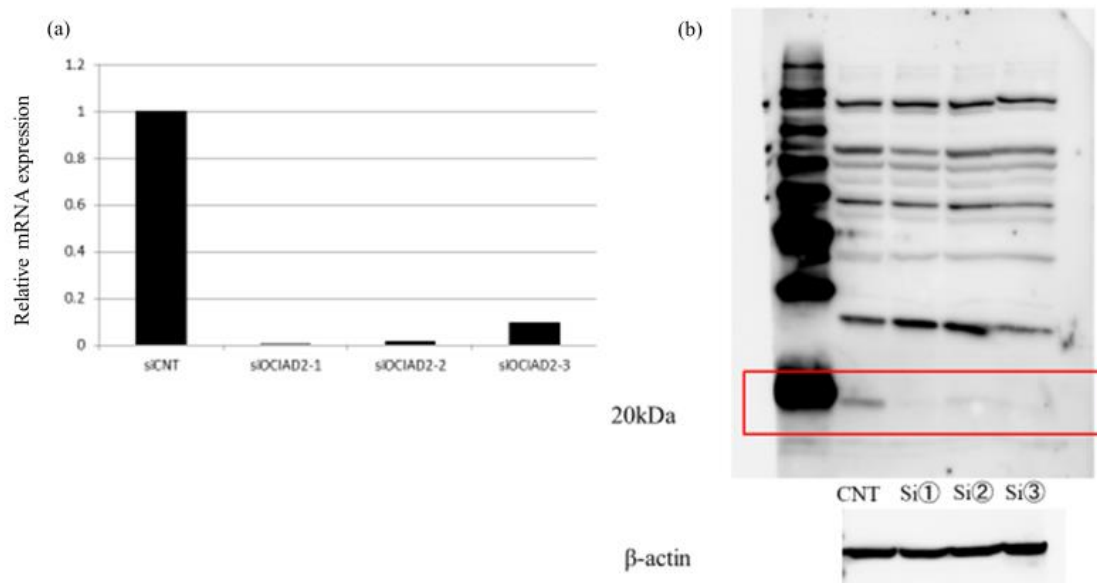
Control での mRNA を 1 としたとき、OCIAD2 mRNA の発現量は

siOCIAD2①:0.00485, ②:0.0138, ③:0.0943 であり、いずれも OCIAD2 の mRNA

発現を抑制した。siOCIAD2①が最も OCIAD2 の mRNA 発現を抑制した。

b) Western blotting (OCIAD2)

c) siOCIAD2①、②、③はいずれも OCIAD2 の蛋白発現を抑制した。



CNT:control, si①:siOCIAD2①, si②:siOCIAD2②, si③:siOCIAD2③

図 8. 複数の肺腺癌細胞株での OCIAD2 発現

a) qRT-PCR

A549 の mRNA 発現を 1 としたとき、OCIAD2 mRNA 発現量は H1975: 1.81, H1650: 0.80, HCC827:4.28, PL16T:1.00 だった。

b) Western blotting

OCIAD2 蛋白発現量は A549 と H1650 がほぼ同程度で、H1975, HCC827, PL16T は A549 と比較して高かった。

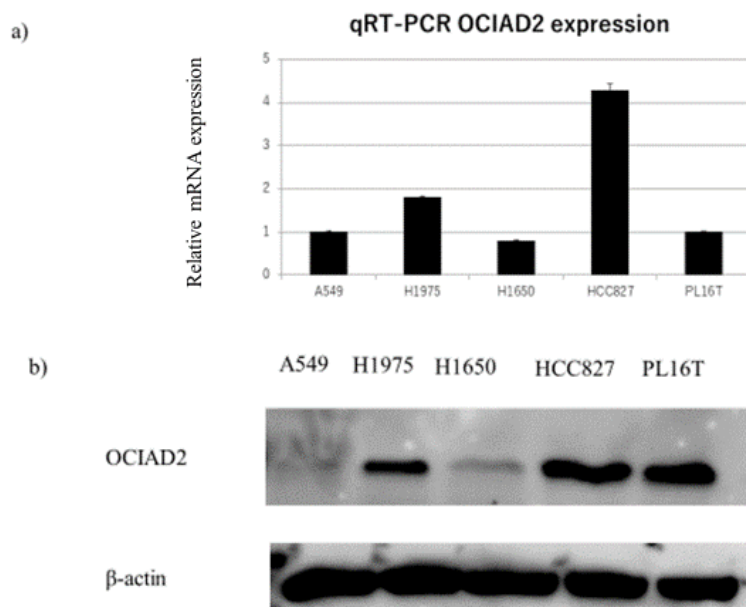
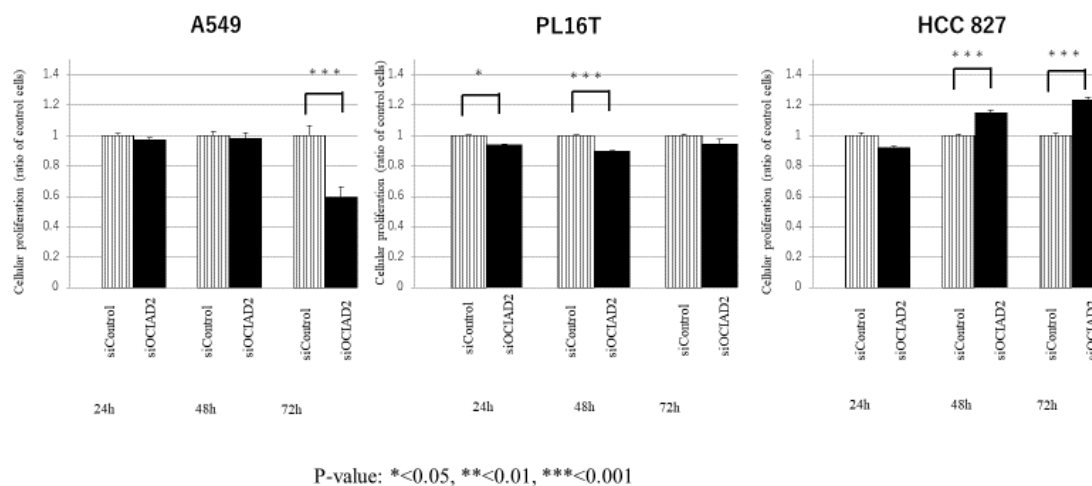


図 9. 細胞増殖アッセイ



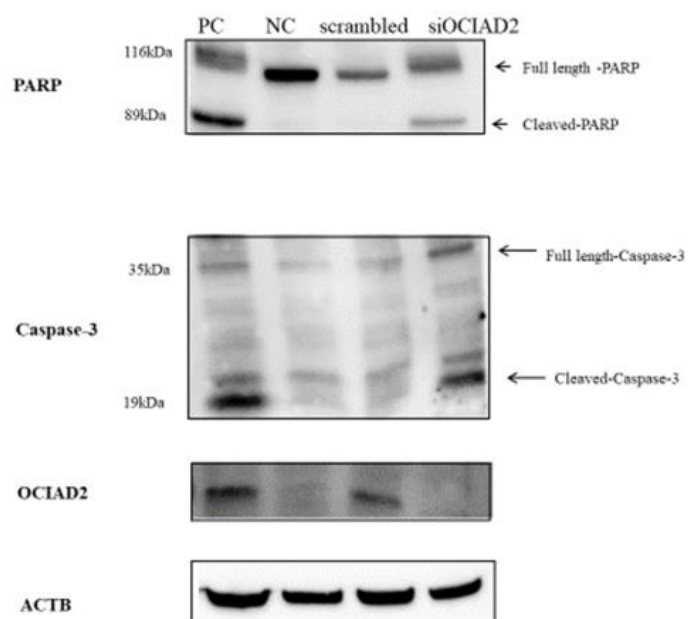
A549 では siOCIAD2 をトランスフェクションしてから 72 時間後にコントロールと比較して有意に細胞数が減少した(p<0.001)。

PL16T では siOCIAD2 をトランスフェクションしてから 24 時間後 (p=0.047)および 48 時間後 (p<0.001)にコントロール比較して有意に細胞数が減少した。

HCC827 では siOCIAD2 をトランスフェクションしてから 48 時間後 (p<0.001)および 48 時間後 (p<0.001)にコントロール比較して有意に細胞数が増加した。

図 10. アポトーシスアッセイ

A549 細胞株において、siOCIAD2 をトランスフェクションしてから 72 時間後に cleaved PARP および cleaved caspase-3 が誘導された。



PC: positive control, : カンプトテシンで処理した A549 の細胞溶解液

NC: negative control (アポトーシスが起こらないもの) :
カンプトテシンで処理されていない A549 の細胞溶解液

図 11. 蛍光免疫染色を用いた A549 細胞株における OCIAD2 の局在解析

a) コントロール

OCIAD2 と VDAC1 の局在は merge した。OCIAD2 および VDAC1 の大部分は核周囲の細胞質に存在しており、特に核周囲の 1 部分に集中して認められた。

b) OCIAD2 をノックダウンした細胞

OCIAD2 および VDAC1 のシグナル強度は共に減少した。OCIAD2 と VDAC1 は細胞質内に散らばるように存在した。

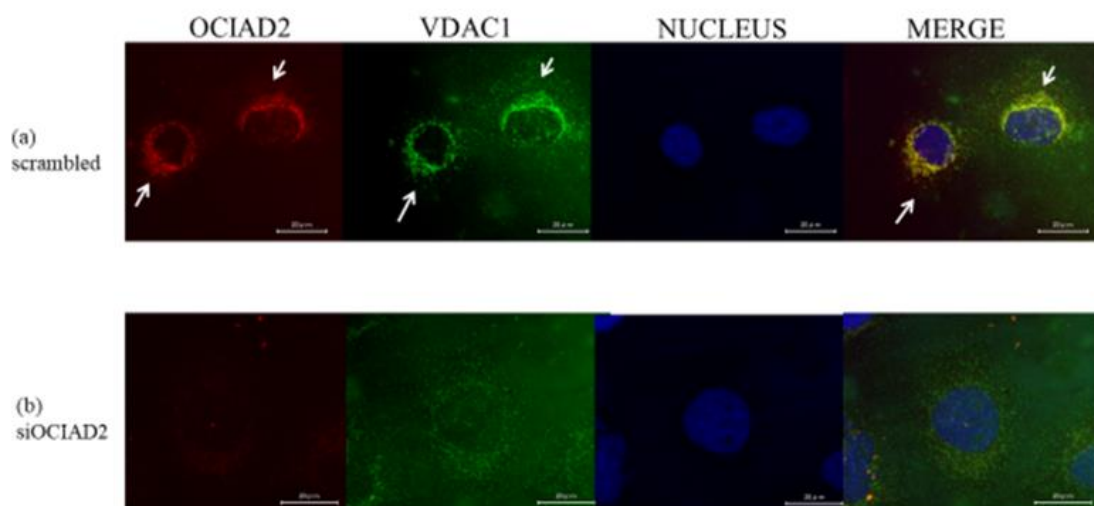


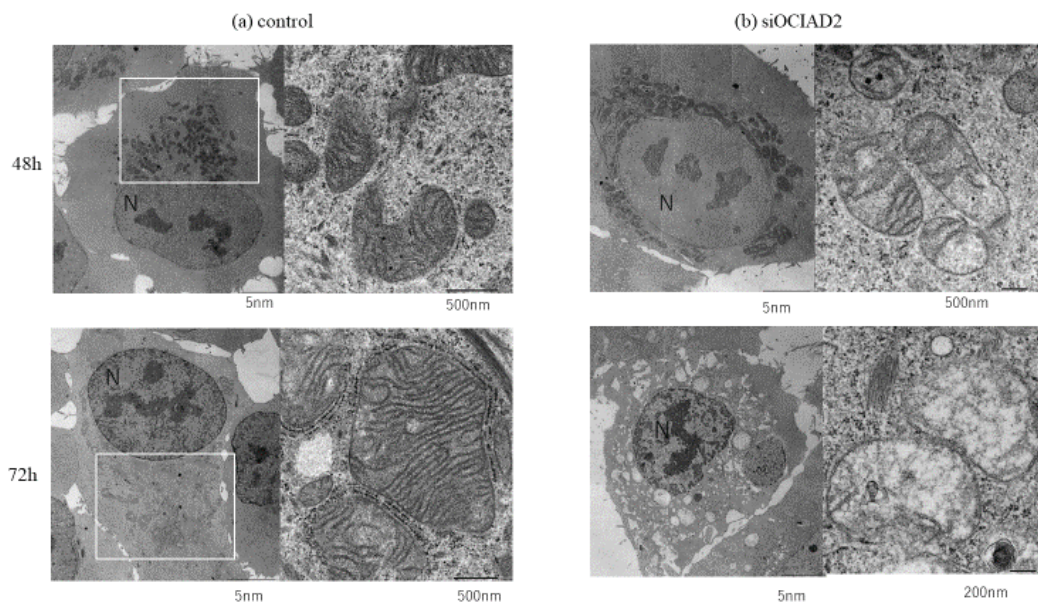
図 12. 電子顕微鏡を用いた siOCIAD2 トランスフェクション後の A549 細胞におけるミトコンドリアの変化の観察

a) コントロール(scrambled RNA トランスフェクション群)

48 時間後および 72 時間後いずれにおいても、ミトコンドリアは核周囲の細胞質に局在しており、特に 1 か所に集中して認められた。

b) OCIAD2 をノックダウンした細胞

48 時間後、ミトコンドリアは核周囲の細胞質に比較的均一に分布し(1 か所に集中していない)、ミトコンドリアのクリステは不明瞭だった。72 時間後、ミトコンドリアは細胞質内に散在性に存在し、クリステは著明に不明瞭だった。

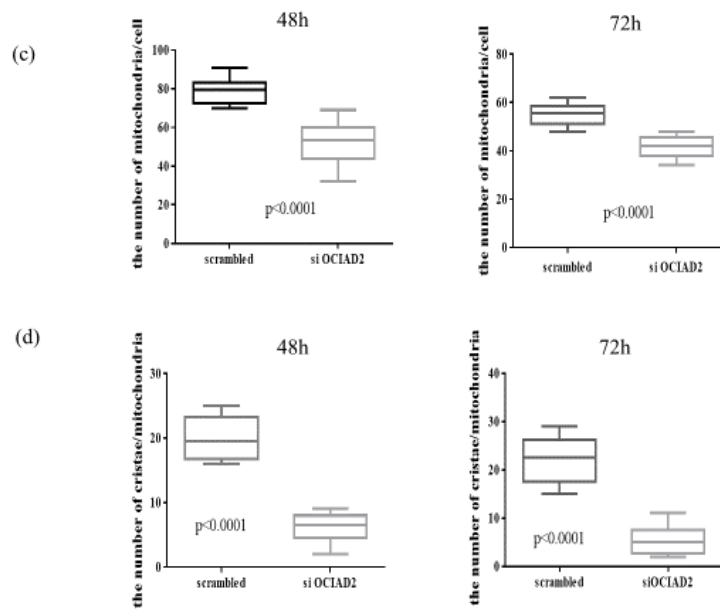


c) 一細胞当たりのミトコンドリア数

OCIAD2 をノックダウンした細胞ではコントロールと比較して、48 時間後および 72 時間後に有意に減少した ($p<0.0001$)。

d) 一ミトコンドリア当たりのクリステ数

OCIAD2 をノックダウンした細胞ではコントロールと比較して、48 時間後および 72 時間後に有意に減少した ($p<0.0001$)。



8. 表

表 1. 肺腺癌患者における OCIAD2 発現と臨床病理学的な特徴との関連

Characteristic	Total n=191	OCIAD2 Low n=116	OCIAD2 High n=75	P-value
Age	66.45	65.75	67.32	0.50
Sex				0.051
Male	113	62	51	
Female	78	54	24	
Smoking				0.07
Non-smoker	74	51	23	
Smoker	117	65	52	
TTF-1				0.27
Positive	161	101	60	
Negative	30	15	15	
Pleural invasion				0.45
pI0	123	79	44	
pI1	35	19	16	
pI2	17	8	9	
pI3	16	10	6	
Pulmonary metastasis				0.22
pm0	179	111	68	
pm1	12	5	7	
Vascular invasion				0.0018*
v0	106	75	31	
v1	85	41	44	
Lymphatic permeation				0.049*
ly0	114	76	38	
ly1	77	40	37	
T factor (primary tumor)				0.0024*
Tis	17	16	1	

T1mi	21	18	3	
T1a	6	4	2	
T1b	38	23	15	
T1c	14	9	5	
T2a	51	26	25	
T2b	12	5	7	
T3	18	8	10	
T4	14	7	7	
N factor (regional lymph nodes)				0.112
N0	97	62	35	
N1	23	9	14	
N2	25	14	11	
N3	1	0	1	
NX	45	31	14	
Pathological stage				0.0003*
0	17	16	1	
I	80	55	25	
II	62	30	32	
III	18	8	10	
IV	14	7	7	
pl: pleural invasion, pm: pulmonary metastasis, v: vascular invasion, ly: lymphatic permeation				
*p<0.05				