

令和 6 年 4 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16135

研究課題名（和文）肺腺癌における予後予測バイオマーカーの探索

研究課題名（英文）Exploring prognostic and predictive biomarkers in lung adenocarcinoma.

研究代表者

安藤 孝浩（Ando, Takahiro）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30882542

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト肺腺癌検体を使用してNECTIN2遺伝子発現量を解析し、高発現群では術後再発が有意に多いことが示した。次に、H522、H1650の細胞株でNECTIN2ノックアウト（KO）を行い、KO株で細胞増殖能の低下とアポトーシスの増加、細胞遊走能の上昇が起こることを確認した。さらに、NECTIN2 KO株において、NECTIN2を再発現させることで細胞増殖能と遊走能が回復した。これにより、NECTIN2 高発現では肺腺癌の術後再発と関連し、細胞のアポトーシスと細胞遊走能に重要な役割を果たすと結論づけられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では手術検体を用いた検討により、NECTIN2高発現症例で術後再発が多くなることを発見した。さらに、TCGA database を用いた *in silico* による解析でもこの結果と一貫しており本研究の妥当性を示している。また、肺癌細胞株を用いた機能解析では NECTIN2 KO により細胞増殖能、細胞遊走能が低下し、アポトーシスが増加することが示された。以上より、NECTIN2 高発現では肺腺癌の術後再発と関連し、細胞のアポトーシスと細胞遊走能に重要な役割を果たすと考えた。肺腺癌における NECTIN2 の発現と機能について検討した報告は過去になく、本研究の結果は非常に意義深いと考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the function of NECTIN2 in LUAD using both TCGA dataset and clinical samples from 105 surgically resected LUAD patients. Additionally, we conducted functional assays using human lung adenocarcinoma cell lines to explore cell proliferation, apoptosis, migration, and invasion. Our analysis revealed a correlation between high NECTIN2 expression and reduced overall survival in LUAD patients according to the TCGA database. In clinical samples, high NECTIN2 expression was associated with lower recurrence-free survival in all patients and those in stage I. Functional studies demonstrated that NECTIN2 knockout promoted cell apoptosis and hindered cell proliferation and migration capabilities. However, NECTIN2 overexpression did not significantly alter cellular functions. In conclusion, High NECTIN2 expression in LUAD was found to be associated with postoperative recurrence, and was observed to play an important role in cell apoptosis and migration.

研究分野：肺癌

キーワード：肺腺癌 NECTIN2 術後再発 CRISPR/Cas9

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺癌は、癌関連死亡原因の第1位である。分子標的治療薬や免疫チェックポイント阻害薬などの治療法の著しい進歩にもかかわらず、肺癌の5年生存率は依然として低い。肺癌の分子メカニズムを解明し、新規の予後バイオマーカーを同定することは極めて重要である。

NECTIN は、上皮細胞間の細胞間接着を促進する免疫グロブリン様膜貫通タンパク質の一種である。NECTIN は細胞接着における役割に加えて、インテグリンや他の膜レセプターと相互作用し、細胞運動、増殖、分化、生存を含む様々な細胞機能を引き起こす。さらに、NECTIN2 は TIGIT や DNAM-1 のような免疫制御因子のリガンドとして機能する。これらの多面的な機能から、癌における NECTIN の異常発現は腫瘍の進行を促進すると予測される。以前の研究では、NECTIN4 が癌細胞における細胞増殖を亢進させ、腫瘍形成に重要な影響を及ぼすことが示された。さらに、NECTIN4 の高発現は膀胱癌、乳癌、肺癌および他の癌における予後不良と関連している。加えて、NECTIN4 を標的とする抗体薬物複合体 (ADC) は、複数の癌モデルにおいて有望な結果を示している。

NECTIN は様々な正常組織で発現しているが、NECTIN2 は肺癌を含むいくつかの癌種で過剰発現している。卵巣癌および胆嚢癌では、NECTIN2 の発現上昇は癌の進行や予後の悪化と関連している。しかし、肺癌における NECTIN2 の役割は依然として不明である。

2. 研究の目的

本研究では、肺腺癌 (LUAD) における NECTIN2 の発現上昇が予後に関連するか、またどのように癌進展に寄与するかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) TCGA データベースを用いた発現変動遺伝子解析および生存解析

The Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースから LUAD の RNA-sequencing (RNA-seq) データを入手し、R パッケージ DESeq2 (v1.38.2) を用いて、腫瘍組織と正常肺組織で発現変動遺伝子 (DEG) 解析を行った。スクリーニング基準は、 $|\log_2FC| > 1$ および $FDR < 0.001$ とした。また、NECTIN2 の発現レベルは、HTSeq pipeline から FPKM を用いて決定した。臨床情報が欠落している症例は除外し、計 500 例の LUAD を解析した。生存期間は、手術日から死亡日までの期間と定義した。

(2) 患者とサンプル

2006年1月から2016年12月の間に東京大学医学部附属病院で治癒切除を受けた LUAD 患者のうち、105 例の LUAD サンプルを無作為に選択した。無再発生存期間は、手術後から再発または死亡までの期間とした。このプロジェクトは東京大学医学部附属病院施設審査委員会の承認を得ており (承認番号: G1069)、本試験に登録されたすべての患者から、手術前に肺癌検体の使用について書面によるインフォームド・コンセントを得た。

(3) 肺腺癌サンプルの NECTIN2 発現

肺癌サンプルは RNA later (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) で処理し、RNA 抽出まで -20°C で保存した。1 μg の全 RNA を、SuperScript III を用いて cDNA に逆転写した。cDNA は、Thunderbird SYBR qPCR Mix と以下のプライマーセットを用いて増幅した: NECTIN2 (F, TCGAGGAACCCAGCCCTGATA; R, CTCAGGGTGGCATCAGTACG) および POLR2A (F, GAAGGCCAAGCAGGACGTAA; R, GCAGAGGAGCCAGTCTTGTC)。

(4) CRISPR を介した NECTIN2 ノックアウト

CRISPR/Cas9 ベクターを用いて NECTIN2 遺伝子のノックアウトを行った。適切な sgRNA 候補を選択するために、CRISPR デザインツール (CHOPCHOP: "https://chopchop.cbu.uib.no/") を採用した。NECTIN2 を標的とするためにデザインした sgRNA 配列は GGTCCGTCGAGGGATGACCTGG であった。この sgRNA を Cas9 SmartNuclease All-in-one Vector (System Biosciences, California, USA) にクローニングし、Cas9 と sgRNA をコードするインサートを CSII-CMV-MCS-IRES2-Bsd ベクターにライゲーションした。構築したプラスミドを含むレンチウイルスを H522 または H1650 細胞に感染させ、遺伝子ノックアウトシングルクローン細胞を摘出し、ノックアウト細胞株を樹立した。

(5) NECTIN2 ノックアウト細胞株における NECTIN2 発現回復実験

NECTIN2 ノックアウト細胞株において NECTIN2 機能を回復させるために、我々は Twist Bioscience

(California, USA)から、sgRNAによる認識を回避するように設計したNECTIN2-Rescue DNAを導入した。NECTIN2-Rescue DNAをCSII-CMV-MCS-IRES2-Hygベクターに挿入し、構築したプラスミドを含むレンチウイルスをNECTIN2ノックアウト細胞株に感染させた。

(6) 作成したWild Type、NECTIN2ノックアウト株、NECTIN2 KO rescue株について、それぞれ細胞増殖アッセイ、細胞遊走アッセイ、細胞浸潤アッセイ、Ki-67染色、アポトーシスおよびネクロトーシスアッセイによる機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) TCGAデータベースによる発現変動遺伝子解析と生存解析

TCGAデータベースを用いて肺腺癌と隣接肺組織を比較し、 $|\log_2 FC| > 1$ 、 $FDR < 0.001$ のスクリーニング基準に基づいて、2914個の発現上昇遺伝子と2834個の発現低下遺伝子からなる合計5748個のDEGを同定した。Gene Ontologyを用いて膜タンパク質に関連する152の遺伝子を同定し、そのうち発現が亢進していた遺伝子の中で、NECTIN2がその一つであることが確認され、この遺伝子をさらに検証していく方針とした。

TCGA-LUADからNECTIN2の発現レベルを評価した。患者はNECTIN2発現レベルに基づいて高発現群と低発現群に分類した。FPKMの最適カットオフ値は52.6と算出され、その結果、126例が高発現群に、374例が低発現群に分類された。Kaplan-Meier解析の結果、NECTIN2の高発現は全生存期間の短縮と有意に関連していた ($P = 0.001$ 、図1A)。

LUAD患者の予後はリンパ節転移の有無によって異なるため、同じ方法でステージIのLUAD患者268人(高発現61人、低発現207人)の全生存期間も解析した。TCGAデータベースのステージI患者においても、NECTIN2の高発現は全生存期間の短縮と有意に関連していた ($P = 0.022$ 、図1B)。

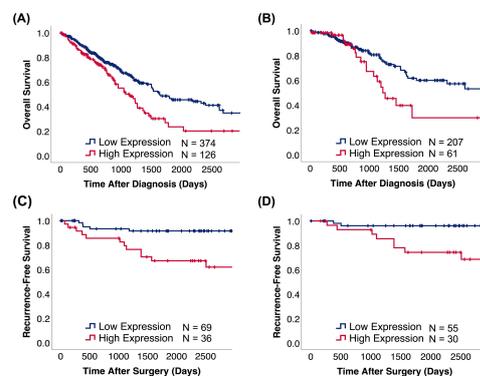


図1. TCGA database、肺癌切除検体の生存曲線

(2) 肺腺癌切除検体を用いた検討

肺腺癌患者105例の患者においてNECTIN2のmRNA発現を調べたが、NECTIN2の発現と腫瘍の病期、腫瘍の大きさ、脈管侵襲、リンパ管侵襲との間に有意な相関は認められなかった。さらにNECTIN2の発現レベルと無再発生存率との関係をKaplan-Meier法で解析した。 ΔCt の最適カットオフ値は、受信者動作特性曲線解析により-2.95と算出され、このカットオフ値により、36例をNECTIN2高発現、69例をNECTIN2低発現と分類したが、両群間に有意な特性差は認められなかった。Kaplan-Meier解析は、NECTIN2の高発現で無再発生存の低下と有意に関連することを示した ($P < 0.001$ 、図1C)。同じ方法でI期のLUAD患者85人(高発現30人、低発現55人)の無再発生存率を調べた。I期の患者においても、NECTIN2の高発現が無再発生存率の低下と有意に関連していた ($P = 0.001$ 、図1D)。

(3) NECTIN2ノックアウトにおける細胞増殖能の影響

H522またはH1650細胞においてCRISPR/Cas9を用いてNECTIN2をノックアウトした。その後、レンチウイルスベクターを用いてNECTIN2ノックアウト細胞にNECTIN2 Rescue-DNAを導入し、NECTIN2の発現を回復させた。NECTIN2ノックアウト細胞、NECTIN2レスキュー細胞、およびNECTIN2過剰発現細胞をウェスタンブロッティングにより確認した。3つの遺伝子型において形態学的変化は観察されなかった。

細胞増殖について、Cell Counting Kit-8アッセイと単純細胞計数法を用いて調べた。NECTIN2ノックアウト細胞の細胞数はWild Typeに比べて減少したが、NECTIN2をレスキューした細胞では細胞増殖能が回復した。6ウェルプレートでの単純細胞計数の結果は、CCK-8アッセイから得られた結果と同様であった。

(4) NECTIN2ノックアウトとKi-67染色およびアポトーシスアッセイ

Wild Type、NECTIN2ノックアウトおよびNECTIN2レスキュー細胞における細胞増殖マーカーとしてのKi-67の発現を調べたが、Ki-67陽性細胞数は3つの遺伝子型間で有意差はなかった(図2A, B)。

次に、NECTIN2発現とアポトーシスおよびネクロトーシスの関係を解析した。NECTIN2 KO細胞におけるアポトーシス細胞の割合はWild Typeに比べて増加したが、NECTIN2 KOレスキュー細胞における割合はNECTIN2 KO細胞に比べて減少し、Wild Typeと同じレベルになった(図2C)。NECTIN2 KO細胞におけるネクロトーシスの割合はWild Typeと同様であった(図2D)。

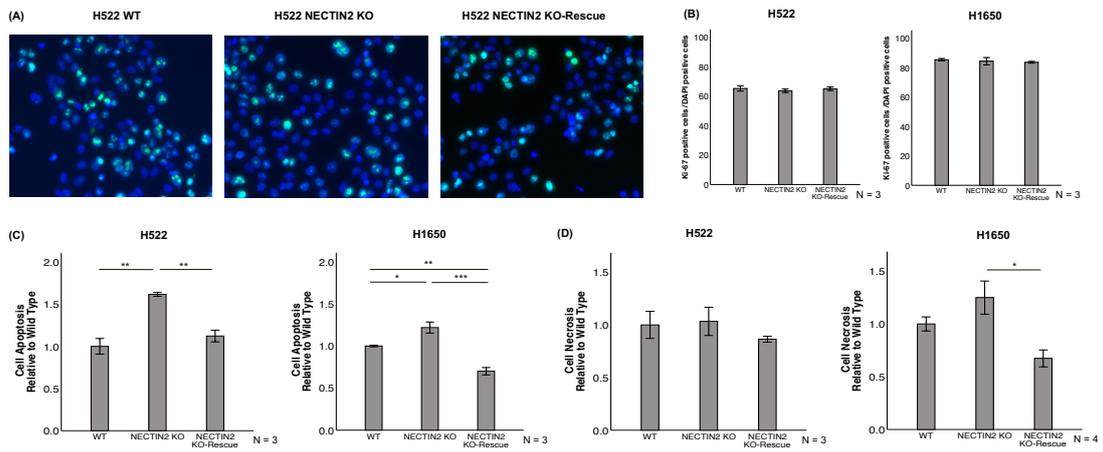


図 2. Ki-67 染色とアポトーシス・ネクロシスアッセイ

(5) NECTIN2 ノックアウトにおける細胞遊走能の影響

H522 および H1650 細胞の遊走能を評価した。NECTIN2 KO 細胞のギャップ率は、Wild Type または NECTIN2 レスキュー細胞と比較して有意に低かった (図 3A, B)。続いて、H522 および H1650 細胞を用いて細胞浸潤アッセイを行った。H522 細胞の浸潤率は 3 つの遺伝子型間で同等であったが、H1650 の NECTIN2 KO 細胞は Wild Type あるいは NECTIN2 KO レスキュー細胞と比較して有意に低い浸潤能を示した (図 3C)。

(6) 結論

肺腺癌における NECTIN2 の高発現は、術後再発と関連していた。ヒト肺腺癌細胞株における本研究の知見は、NECTIN2 が細胞のアポトーシスと遊走能に重要な役割を果たしていることを示唆しており、NECTIN2 が肺腺癌の治療標的となりうると思われる。

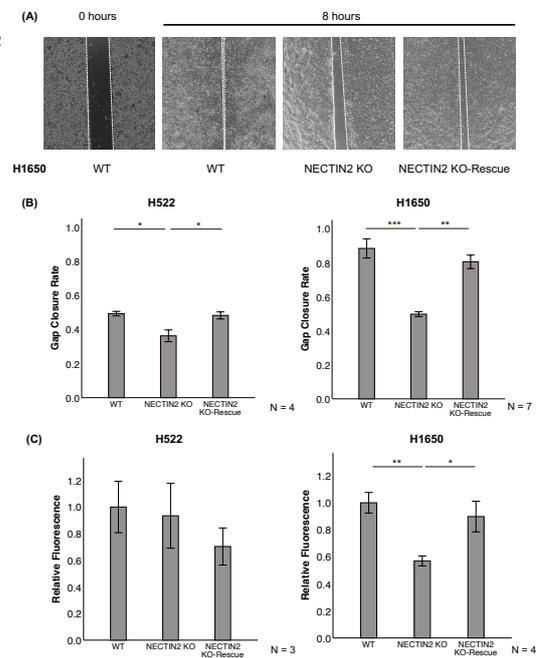


図 3. 細胞遊走能と細胞浸潤能

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takahiro Ando, Mirei Ka, Yuriko Sugiura, Masakatsu Tokunaga, Natsuki Nakagawa, Takahiro Iida, Yoko Matsumoto, Kousuke Watanabe, Masanori Kawakami, Masaaki Sato, Hidenori Kage	4. 巻 62(4)
2. 論文標題 NECTIN2 is a prognostic biomarker and potential therapeutic target in lung adenocarcinoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 582-588
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.resinv.2024.04.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安藤孝浩
2. 発表標題 肺腺癌におけるPVRL2の発現と術後再発に関する解析
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------