

令和 2 年 5 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09614

研究課題名(和文) 肺腺がんの微小乳頭状構造のオルガノイド培養システムの確立

研究課題名(英文) Novel prognostic factor for lung adenocarcinoma

研究代表者

永野 達也 (Nagano, Tatsuya)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：80624684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：74名の患者のパラフィン包埋ブロックを用いて、スパイラルアレイブロックを作成した。まず、骨髄細胞に高発現しており、自然免疫で中心的な役割を果たしており、近年、癌における役割が注目されているCaspase recruitment domain-containing protein 9 (CARD9)に着目して、免疫染色を行ったところ、CARD9を高発現している症例は肺腺がん全体の32.4%に見られ、低発現しているものより有意に予後不良であった($P = 0.0402$)。また、単変量解析、多変量解析にてCARD9の高発現は肺腺がんの独立した予後不良因子であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在までに、非小細胞肺がん(NSCLC)の予後予測因子として、特定の臨床因子やTNM分類、病期などが確立されている。しかしながら、NSCLCの予後は、同じ病期の腫瘍を持つ患者の間でも大きく異なることがあり、実際、ステージIの患者の20%は手術後に再発を経験している。したがって、ステージIの患者に対するアジュバント治療の必要性が一部の患者にある可能性がある。CARD9は肺腺がんの新しい予後不良因子として、術後化学療法の適切な患者選択に活用されるのみならず、肺腺がんの新しい分子標的となりうる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：A spiral array block was created using paraffin-embedded blocks from 74 patients. First, immunostaining was focused on Caspase recruitment domain-containing protein 9 (CARD9), which is highly expressed in bone marrow cells and plays a central role in innate immunity. High-level CARD9 expression was found in 32.4% of all lung adenocarcinomas, with a significantly worse prognosis than low expression ($P = 0.0402$). Moreover, univariate analysis and multivariate analysis revealed that high expression of CARD9 was an independent poor prognostic factor for lung adenocarcinoma. The expression of CARD9 in lung adenocarcinoma cell lines such as A549, PC9 and H18 was knocked down with siRNA. It was found that knocked down of CARD9 diminished growth potential and increased apoptotic cells. Furthermore, when NF- κ B activation was evaluated by Western blotting, it was found that knockdown of CARD9 suppressed NF- κ B activation.

研究分野：肺がん

キーワード：非小細胞肺がん CARD9

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在までに、非小細胞肺癌 (NSCLC) の予後予測因子として、特定の臨床因子や TNM 分類、病期などが確立されている。しかしながら、予後は、同じ病期の腫瘍を持つ患者の間でも大きく異なることがあり、実際、ステージ I の患者の 20% は手術後に再発を経験している。したがって、ステージ I の患者に対するアジュバント治療の必要性が一部の患者にある可能性がある。実際、ステージ I の一部の患者は、ステージ II 以上の患者と同様にアジュバント化学療法を受けている。以上のように、NSCLC における患者の予後を予測する予後予測因子を特定することは重要である。

カスパーゼ動員ドメイン含有タンパク質 9 (CARD9) は、自然免疫の中心的なレギュレーターとして働く。マクロファージおよび樹状細胞を含む骨髄細胞は、CARD9 を高度に発現している。また、病原体は、自然免疫応答を調節し、適応免疫に影響を与える CARD9 シグナル伝達を活性化すると考えられている。最近の研究では、CARD9 が腫瘍の進行に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。ただし、NSCLC における CARD9 の役割についてはほとんど報告されておらず、NSCLC の予後予測因子として機能するかどうかはわかっていない。

2. 研究の目的

この研究の目的は、NSCLC における悪性度を規定する因子を探索すること、特に CARD9 に着目して、その発現の有病率と臨床的意義を明らかにすることである。

3. 研究の方法

1. 患者背景とスパイラルアレイの作製

肺癌のスパイラルアレイブロックは、2014 年 1 月から 2014 年 12 月まで神戸大学医学部附属病院で肺がんの手術を受け、腺がんと診断された 74 人の連続した患者の外科標本をもとに作成した。

2. 免疫組織化学

スパイラルアレイブロックの組織切片を脱パラフィンし、標準的な手順を使用して、CARD9 (1:200) に対する一次抗体 (ポリクローナル; Sigma-Aldrich) を用いて免疫染色をした。統計学的分析のために、染色標本を低免疫染色と高免疫染色の 2 つのグループに分類した (図 1)。

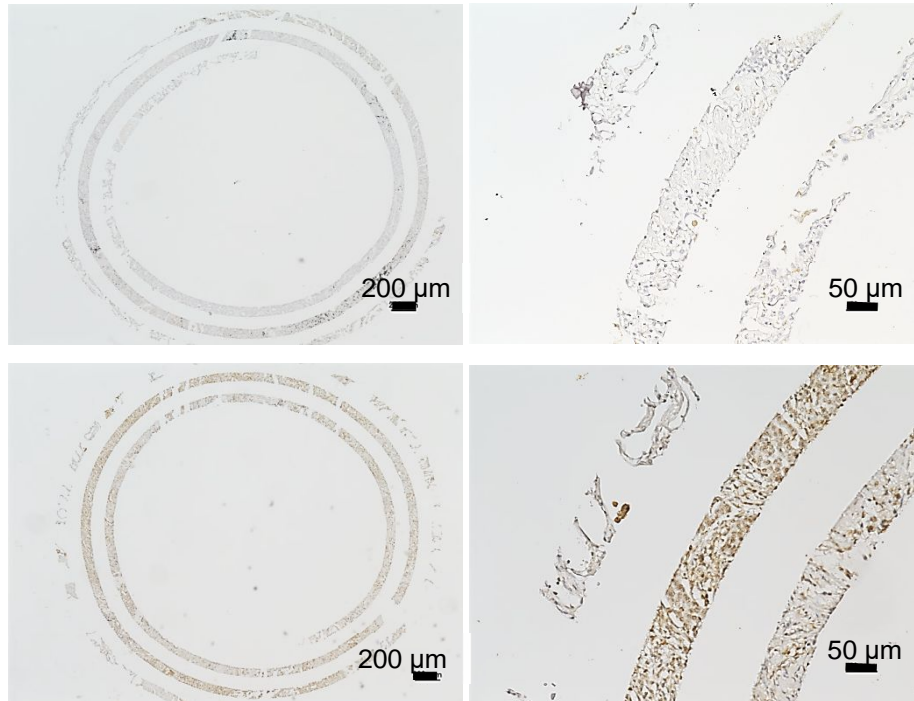


図 1 スパイラルアレイの免疫染色ブロック 上段が CARD9 低発現、下段が CARD9 高発現

3. 細胞培養と siRNA 干渉

肺腺がん細胞株 A549 および PC9、ヒト大細胞肺癌細胞株 H460、ヒト肺扁平上皮がん細胞株 H520、およびヒト小細胞肺癌細胞株 DMS53 および DMS114 は、ATCC から購入した。肺腺がん細胞株 I118 は、理研セルバンクから購入した。腫瘍細胞は、CARD9 siRNA または Silencer® Select Negative Control No. 1 siRNA で CARD9 をノックダウンした。

4. リアルタイム PCR 分析

製造元のプロトコルに従って、上記の細胞株 (A549、PC9、I118、H460、H520、DMS53 および DMS114) から RNA を単離した。PrimeScript RT Reagent Kit を使用して、抽出および精製した RNA を cDNA に逆転写し、リアルタイム PCR を行った。相対 mRNA レベルは、GAPDH mRNA を内部コントロールとして使用する Ct メソッドで計算した。この調査で使用したプライマーは、CARD9 の場合は 5' -CCCTCAGCATCACACCTTAC-3' と 5' -GCACACCCACTTTCGTTTG-3'、GAPDH の場合は 5' -

CCACTCCTCCACCTTTGAC-3' と 5' -ACCCTGTTGCTGTAGCCA-3' であった。

5. 細胞増殖アッセイ

A549、PC9 および I118 細胞の対数増殖期にある細胞を、96 ウェルプレートに 5×10^3 細胞/ウェルの密度で播種し、5%CO₂ インキュベーターで 24 時間前培養した。細胞を CARD9 siRNA でトランスフェクトして CARD9 をノックダウンし、37 °C、5%CO₂ で 0、24、48 時間培養しました。合計 10 μ L の Cell Counting Kit-8 溶液を各ウェルに加え、細胞をさらに 30 分間インキュベートした。吸光度は、分光光度計を使用して 450 nm で測定した。

6. 免疫細胞化学

PC9 細胞に CARD9 siRNA または Silencer®Select Negative Control No. 1 siRNA をトランスフェクトし、37 °C で培養した。5%CO₂ で 48 時間。アポトーシスマーカーのウサギ mAb (1:400)、切断されたカスパーゼ-3 (Asp175) (5A1E) を免疫染色に使用し、HE 染色と並行して細胞アポトーシスの変化を調べた。

7. ウェスタンブロット分析

以前のプロトコルに従い、 α -アクチン (#4967)、NF- κ Bp65 (#8242) およびホスホ-NF- κ Bp65 (#3033) を使用した。

8. 統計分析

すべての統計分析は、EZR バージョン 1.37 とグラフィカル R バージョン 3.4.1 のユーザーインターフェイスで行った。2つのグループ間の違いは、ピアソン χ^2 検定またはフィッシャー正確検定で分析した。単変量解析では、すべての累積生存は Kaplan-Meier 法で推定され、差はロジランク検定で行った。多変量回帰分析は、コックス比例ハザードモデルに従って行った。すべての P 値は両側であり、P < 0.05 は有意であると見なした。

4. 研究成果

1. 患者背景

患者の年齢の中央値は 71.5 歳 (49~85 歳の範囲) で、41 人は男性であり、33 人は女性であった。病理学的データに関して、26 人の腫瘍は T1 であり、36 は T2 であり、1 は T3 であった。59 人の患者はリンパ節転移が陰性であったが、8 人は N1 で 7 人は N2 であった。

2. CARD9 の発現と臨床病理学的因子との関係

CARD9 は、腺がん細胞の細胞質で発現し、免疫組織化学により検出された。肺腺がんでは、CARD9 の高発現が腫瘍の 32.4% で見られ、67.6% が低発現であった。CARD9 の低発現は CARD9 の高発現と比較して有意に予後良好であった (P = 0.0402; 図 2)。

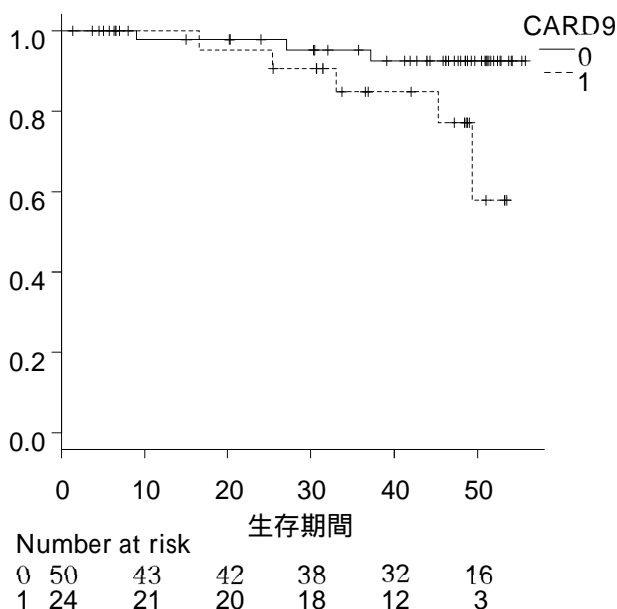


図 2 生存曲線 CARD9 の低発現は CARD9 の高発現と比較して有意に予後良好であった

単変量および多変量分析の結果、CARD9 の高発現は、独立した予後不良因子であった。

3. 肺がん細胞に対する CARD9 の効果

肺がん細胞株に対する CARD9 の効果を確認するために、さまざまな肺がん細胞株 (A549、PC9、I118、H460、H520、DMS53 および DMS114) での CARD9 の mRNA 発現をリアルタイム PCR で分析したところ、すべての肺がん細胞株で CARD9 の発現が見られた。

4. 肺腺がん細胞の増殖

A549、PC9、および I118 細胞に CARD9 siRNA をトランスフェクトし、mRNA の発現を 24 時間後に分析した。これらすべての細胞株において、CARD9 の mRNA 発現は、対照細胞と比較して大幅に

減少した。次に、これらの細胞株の細胞増殖を MTT アッセイにより分析した。細胞増殖能力は、コントロール細胞と比較して、すべての CARD9 ノックダウン細胞で大幅に減少した（図 3）。

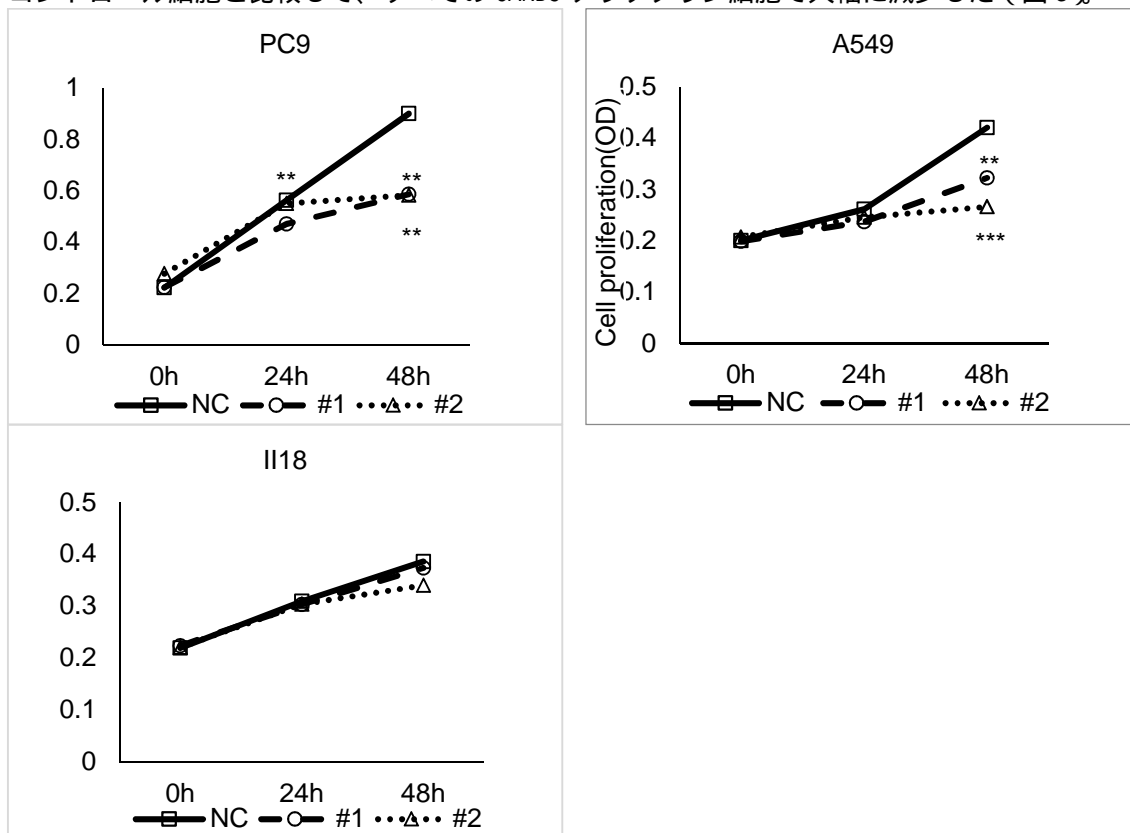


図 3 細胞増殖抑制試験 CARD9 のノックダウンにより細胞増殖は抑制される

5. 肺腺がん細胞における CARD9 によるアポトーシスの変化

PC9 細胞を CARD9 siRNA でトランスフェクトし、切断されたカスパーゼ 3 で免疫染色した。コントロール細胞と比較して、CARD9 ノックダウン PC9 細胞ではアポトーシスが促進された。

6. 肺腺がん細胞の NF- κ B 経路に対する CARD9 の効果

ウエスタンブロットアッセイを実施して、NF- κ B 経路の発現を決定した。CARD9 siRNA でトランスフェクトされた PC9 細胞では、p-NF- κ B はネガティブコントロール siRNA と比較して NF- κ B と比較してダウンレギュレートされていた。これは、CARD9 が肺腺がん細胞株の NF- κ B 経路を促進することを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	西村 善博 (Nishimura Yoshihiro) (20291453)	神戸大学・医学部附属病院・教授 (14501)	
研究分担者	立原 素子 (Tachihara Motoko) (40448626)	神戸大学・医学研究科・講師 (14501)	
研究分担者	田村 大介 (Tamura Daisuke) (80646597)	神戸大学・医学研究科・医学研究員 (14501)	