博士論文

非小細胞肺癌におけるインテグリン α11 の発現と術後再発に関する解析

安藤　孝浩

博士論文

非小細胞肺癌におけるインテグリン α11 の発現と術後再発に関する解析

所属　内科学専攻

指導教官　長瀬　隆英

氏名　安藤　孝浩

目次

略語表 ・・・

結果

1. マイクロアレイ解析 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 33

2. 臨床検体の解析 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 36

3. The Cancer Genome Atlas database の解析・・・・・・・・・・・・・・・・ 50

4. 細胞株の機能解析 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 54

考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 65

結語 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 71

謝辞 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 72

参考文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 73

略語表

CAFs, cancer-associated stromal fibroblasts

CCK-8, Cell Counting Kit 8

CLDN10b, Claudin 10b

ECM, Extracellular matrix

EGFR, Epidermal growth factor receptor

EMT, Epithelial-mesenchymal transition

FAK, Focal adhesion kinase

FPKM, Fragments per kilobase of exon per million mapped fragments

ITGA2, Integrin α2

ITGA11, Integrin α11

ITGB4, Integrin β4

NSCLC, Non-small cell lung cancer

OS, Overall Survival

POLR2A, RNA polymerase II subunit A

PBS, Phosphate buffered saline

RFS, Recurrence-Free Survival

RTKs, Receptor tyrosine kinases

TCGA, the Cancer Genome Atlas.

TGF-β, Transforming growth factor beta

要旨

[Rationale] Integrins are transmembrane proteins that mediate cell adhesion to extracellular matrix. Integrin alpha 11 (ITGA11) is not expressed in normal alveolar epithelial cells and is a known receptor for collagen.

[Methods] We measured messenger RNA expression of integrins by quantitative RT-PCR in 80 samples collected from non-small cell lung cancer (NSCLC) patients who had undergone surgical resection. We analyzed clinical features, pathological stage, tumor size, vascular invasion, lymphatic invasion and postoperative recurrence-free survival. We also analyzed the relationship between the expression level of ITGA11 and overall survival with the Cancer Genome Atlas database. Cell proliferation, migration and invasion capacity were examined in cell lines after overexpression of ITGA11.

[Results] High expression of ITGA11 in NSCLC was associated with more advanced stage ($p = 0.031$), and expression of ITGA11 was not related to tumor size, vascular invasion or lymphatic invasion. High expression of ITGA11 was related to lower recurrence-free survival in all NSCLC patients ($p = 0.043$) and in stage I NSCLC patients ($p = 0.049$). This was consistent with *in silico* analyses of the Cancer Genome Atlas database. Overexpression of ITGA11 in human cell lines had little effect on cell proliferation but resulted in increased migration and invasion capacity.

[Conclusion] High expression of ITGA11 in NSCLC was associated with higher postoperative recurrence. Our findings in human cell lines suggest that ITGA11 plays a significant role in cancer migration and invasion, which may lead to higher recurrence rate.

序文

1. 肺癌診療の現状

肺癌は本邦ならびに世界的に癌死の原因で最も多く、世界における年間の発病者は約 209 万人、死亡者は約 176 万人と推定されている [1, 2]。肺癌は治療方針の違いから組織型により小細胞肺癌と非小細胞肺癌に分類され、非小細胞肺癌が全体の約 8 割を占める [3]。早期の非小細胞肺癌に対しては肺葉切除とリンパ節郭清による根治切除を行うが、診断時に 3 割以上の症例が切除不能である [4, 5]。切除不能例や再発例に対して放射線療法、化学療法などによる治療が行われているが治療成績は不良である [6]。

近年、特定の遺伝子の異常が一部の非小細胞肺癌の発症、増殖に関与することが明らかになり、EGFR 遺伝子変異、ALK 融合遺伝子、ROS1 融合遺伝子、BRAF 遺伝子変異など、多くのドライバー遺伝子の変異が発見された [7-10]。それぞれのキナーゼ阻害剤を投与することによって、切除不能・再発肺癌の生存期間は従来の殺細胞性抗がん剤による治療と比較して飛躍的に延長した [11-15]。これら遺伝子変異を有する肺癌は一部であるため [16]、残りの肺癌患者においては有効な治療は乏しいことが問題点であった。

一方、肺癌を含む癌細胞は、T 細胞や NK 細胞による免疫監視機構から逃れて増殖し、進展することが以前から知られていた。T 細胞上に発現する PD-1 や CTLA-4、腫瘍細胞上に発現する PD-L1 は免疫チェックポイント分子と呼ばれ、免疫応答を制御する作用を持つ [17, 18]。免疫チェックポイント分子を阻害する抗 PD-1/PD-L1 抗体や抗 CTLA-4 抗体が開発され、肺癌を含めて様々な癌腫に対する有効性が示された [19-22]。免疫チェックポイント阻害薬は有効な患者に対して長期の治療効果を示しており、現在の肺癌診療ガイドラインでドライバー遺伝子変異を持たない非小細胞肺癌の治療の重要な位置を占める [23]。しかし、免疫チェックポイント阻害剤の肺癌に対する奏効率は 20 から 30% 程度と高いとは言えない [20, 21]。分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬といった治療薬の進歩にも関わらず、肺癌の治療はいまだに十分とは言えず、肺癌の発症、進展に関わる分子生物学的な機序の解明が重要な課題である。

2. Integrin の機能

膜タンパクは細胞表面刺激による情報伝達や生理機能を制御しており、膜タンパクを介した腫瘍細胞と腫瘍内微小環境の複雑な相互作用により、癌の進展に関与する。Integrin は細胞と細胞、細胞と細胞外マトリックス間の相互作用を担う膜貫通型糖タンパクで、ヒトでは 18 種類の α サブユニットと 8 種類の β サブユニットの組み合わせからなる 24 種類の Integrin ヘテロダイマーが確認されている (図 1) [24,

25]。Integrin のリガンドとして、ラミニン、コラーゲン、フィブロネクチンといった細胞外マトリックスや VCAM-1 や MAdCAM-1 などの細胞表面蛋白があり、Integrin ヘテロダイマーはそれぞれに特異的なリガンドを認識し結合することが知られている [26]。Integrin サブユニットの発現は各組織によって異なっており、正常肺胞上皮細胞は Integrin α3β1、α6β1、α6β4 を発現してラミニンを主な構成成分とする基底膜に接着している [27, 28]。

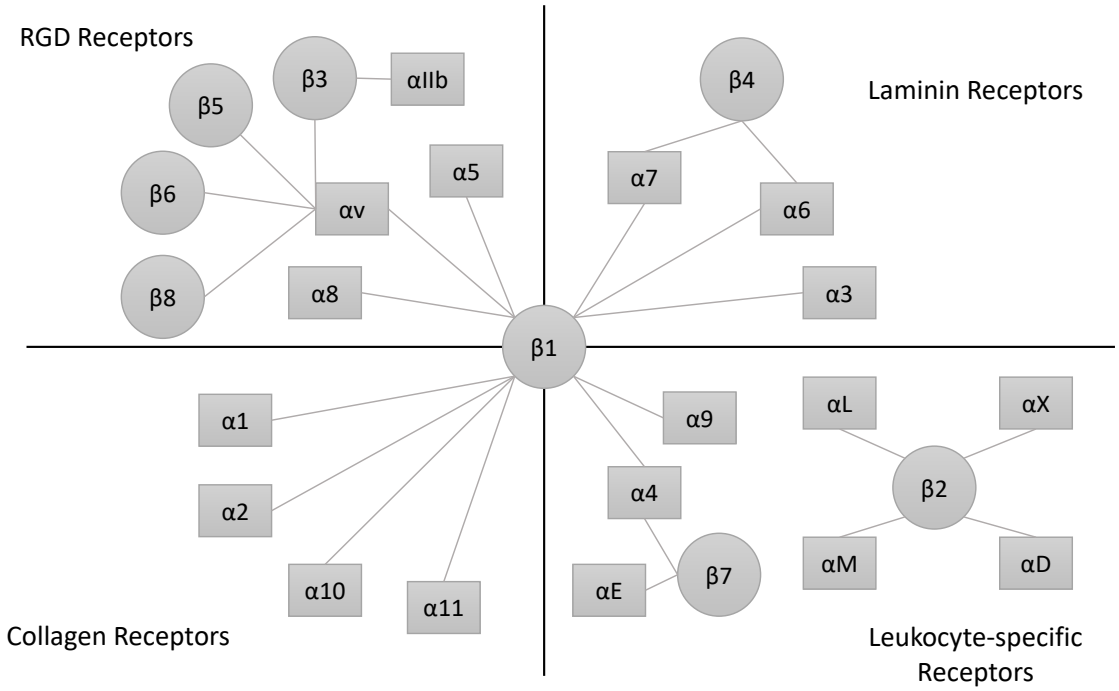

図 1. Integrin サブユニットとリガンド
形成する二量体によりラミニン受容体、コラーゲン受容体、RGD 受容体、白血球特異的受容体の 4 つのカテゴリーに分類される。Integrin α1, α2, α10, α11 は、Integrin β1 と二量体を形成してコラーゲン受容体として働く。[25]より改変。

Integrin は細胞質ドメインを介して Actin、Vinculin、Talin、Paxillin といった細胞骨格の構成成分に直接、あるいは間接的に連結しており、Integrin がリガンドに結合すると細胞膜を裏打ちする細胞骨格に影響を与える (図 2) [29, 30]。また、Integrin は自身にチロシンキナーゼ活性をもたないが、細胞外マトリックスへの接着によって Integrin β サブユニットの細胞質内ドメインに会合している focal adhesion kinase (FAK) および SRC キナーゼを活性化することにより、シグナル伝達のアダプタータンパクがリクルートされる [30, 31]。そして、p130Cas や Paxillin などのアダプタータンパクのチロシンリン酸化が起こり、PI3K/AKT 経路や GRB2/RAS から MAPK 経路などの活性化を引き起こす。それにより、Integrin は細胞接着分子として機能するだけでなく、細胞形態変化、運動、細胞増殖、細胞生存、分化などの機能を発現すると考えられている [29, 30]。

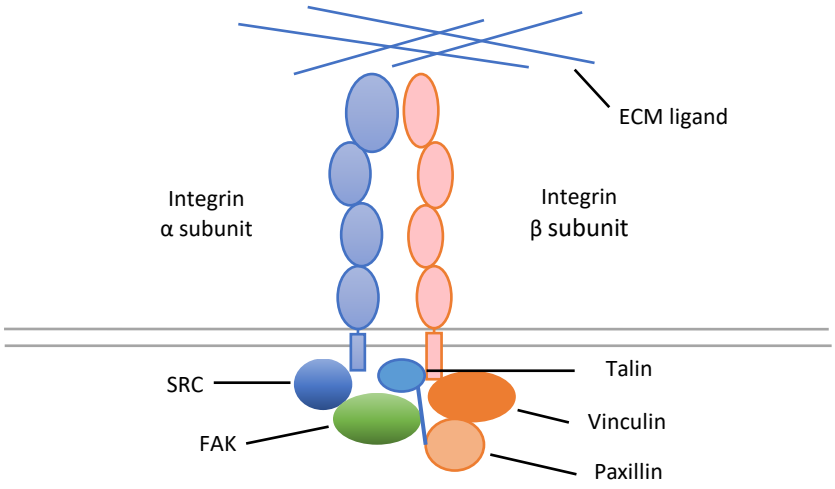

図 2. Integrin の構造と細胞内タンパク

3. 上皮間葉転換の分子メカニズム

癌の転移は重要な予後因子のひとつであり、転移の第一段階として原発巣からの細胞の浸潤がおこる [32]。上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition; EMT) は、上皮細胞が細胞極性、細胞間接着といった性質を失って間葉系細胞の特性を獲得する現象であり、がんの浸潤に関わると考えられている [33-35]。 EMT が起こると E-cadherin や Claudin-1 などの上皮系細胞マーカーの発現が低下し、N-cadherin や Vimentin などの間葉系細胞マーカーの発現が上昇する [34-36]。EMT を起こした細胞は遊走能や浸潤能を上昇させ [36]、抗がん剤への抵抗性を亢進させることが知られている [37]。

上皮間葉転換 (EMT) を誘導するメカニズムとして、Transforming growth factor beta (TGF-β) シグナル、受容体型チロシンキナーゼ (Receptor tyrosine kinases; RTKs) を介したシグナル、Wnt シグナル、Notch シグナル、Hedgehog シグナルなどが知られており、特に TGF-β シグナルが主要な EMT 誘導因子だとされている [34-36]。TGF-β が細胞表面のセリンスレオニンキナーゼ型受容体 type I/II に結合すると受容体が活性化して、細胞質内のシグナル伝達タンパクである Smad2 および Smad3 がリン酸化を受ける (図 3) [34-36]。リン酸化 Smad は Co-Smad である Smad4 と複合体を形成して核内に移行する。そして転写が開始され、EMT 誘導転写因子である、SNAI1 (Snail) や SNAI2 (Slug)、ZEB1 や ZEB2 などの発現が促進する。その結果、E-cadherin などの

上皮系遺伝子群の転写が抑制され、間葉系遺伝子群の発現を活性化することで EMT が進行すると考えられている。また、TGF-β は PI3K/AKT や MAPK など Smad を介さないシグナル経路も活性化することが知られており、この経路によっても EMT が誘導される [36]。

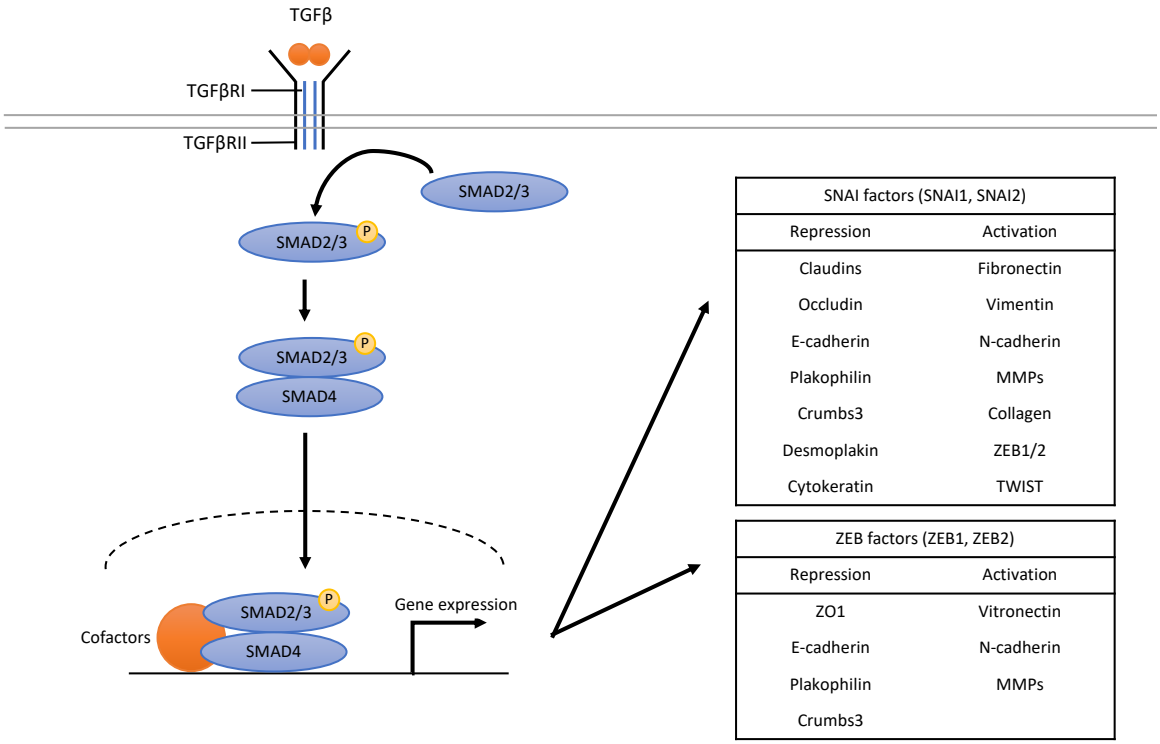

図 3. TGF-β signaling と EMT の誘導
TGF-β は Type I 受容体 (TGFβRI)と Type II 受容体 (TGFβRII) の 4 量体からなる受容体と結合してシグナル伝達を起こす。主要なシグナル伝達経路は Smad によるもので、細胞の機能調整に関わる。

さらに、TGF-β は Integrin の発現も調整することが報告されており細胞接着能や遊走能にも影響を与える一方で、いくつかの Integrin は TGF-β の活性化にも影響する [38, 39]。乳癌細胞において、Integrin β1 を抑制すると代償的に Integrin β3 が増加と TGF-β の活性化が起こり、EMT が誘導されたと報告されている [40]。また、フィブロネクチンをリガンドとする Integrin αvβ6 は TGF-β の活性を調整することが知られており、TGF-β と Integrin にはクロストークがみられる [38, 41]。

4. Integrin と癌の関係

Integrin の発現は正常細胞と腫瘍細胞で異なっており、接着能の変化や細胞内シグナルを介して悪性化に関与すると考えられる。フィブロネクチン受容体である Integrin α5 は正常肺組織に発現しないが、一部の肺癌細胞で発現している [42, 43]. また、ラミニン受容体である Integrin α7 は通常のメラノサイトに発現しておらず、悪性黒色腫に発現していたことから発見された [44]。さらに、癌の種類によって発現する Integrin は異なっており、特定の種類の Integrin の発現や発現量の増加が腫瘍の進展や転移に関連することが報告されてきた (表 1) [42, 45, 46]。肺癌については、リンパ節転移陰性の非小細胞肺癌症例において、Integrin α5 の高発現は生存期間を短縮と相関した [42]。また非小細胞肺癌において、Integrin αvβ6 が発現している症例は予後が悪く、予後予測因子になりうるとされている [46]。

表 1. Integrin と癌の関係

	Integrins 発現	予後
肺癌	α5β1 αvβ6	リンパ節陰性症例で予後悪化と関連 [42] 高発現症例で予後悪化と関連し、しばしば脳転移症例で発現 [46]
乳癌	α6β4 αvβ3	腫瘍浸潤、悪性化に関連し、予後の悪化と関連 [47, 48] 骨転移症例で発現増加 [49, 50]
悪性黒色腫	α5β1 α6β1 αvβ3	腫瘍の進展と関連 [51] 転移病変で発現上昇 [52] 腫瘍の進展と関連 [53]
卵巣癌	α4β1 α5β1	腹膜転移増加と関連 [54] 発現により腫瘍の進展と関連 [55]
前立腺癌	αvβ3	骨転移と関連 [56]
膵癌	αvβ3	リンパ節転移と腫瘍の増大と関連 [57]
大腸癌	αvβ6	腫瘍の浸潤と予後悪化と関連 [58]

[59]より改変。

5. Integrin α11 について

Integrin α11 (ITGA11) は β1 と二量体を形成してコラーゲン受容体として働く。Integrin α11 は主に embryonic fibroblast や myofibroblast で発現することが知られている [60-62]。間葉系細胞において、TGF-β によって ITGA11 の発現が調節されることが知られており [63]、他の報告では ITGA11 の発現がコラーゲン基質上で間葉系細胞の分化に関連するとされている [64]。また、ITGA11 の mRNA 発現量が EMT を起こした癌細胞で多くなっているという報告があり [65]、ITGA11 が TGF-β シグナルと関連して EMT 誘導に影響している可能性がある。肺癌において腫瘍関連線維芽細胞 (cancer-associated stromal fibroblasts; CAFs) における ITGA11 の発現は肺癌の予後を悪化させると報告されているが [66]、肺癌細胞そのものにおける ITGA11 の発現が与える影響については報告がない。本研究では、肺癌における ITGA11 の発現が予後に関連するか、またどのように肺癌進展に影響するかを調べることを目的とした。

方法

1. マイクロアレイ解析

肺癌遺伝子の発現を評価するために、公開されているマイクロアレイデータを統計プラットフォーム R3.02 (https://www.r-project.org/) および生物データ解析パッケージ Bioconductor (https://www.r-project.org/) を用いて評価をした。Affymetrix GeneChipR Human Genome U133 Plus 2.0 Array (NCBI の gene expression omunibus プラットフォーム ID: GPL570) から解析されたデータを用いた。腺癌 40 例は dataset record GSE10245 に含まれるものを用いた [67]。正常対照群として 30 サンプルは GSE16538 (肺サルコイドーシスの study) から 6 サンプル、GSE24206 (間質性肺炎の study) から 6 サンプル、GSE8581 (COPD の study) から 18 サンプルを用いた [68-70]。Gene Ontology を用いて細胞接着に関連する膜タンパクに関連し、肺腺癌で高発現する 377 遺伝子について検討した。

2. 臨床検体の解析

2-1. 対象症例と肺癌手術検体

2007 年 3 月から 2010 年 12 月までに東京大学医学部附属病院呼吸器外科で手術を行い、非小細胞性肺癌と診断された 80 症例の切除検体から採取したサンプルを

解析に用いた。研究計画については東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会に「ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査」を申請し(受付番号:1069)、承認を受けており、全患者より術前にインフォームドコンセントを書面で得た。RNA 抽出用の臨床検体は、検体採取後一部を切り分けて、1.5 mL エッペンドルフチューブに RNA later (Ambion USA) 500 μL とともに入れ 4 °C で一晩保管し、抽出までの間 -20 °C で保存した。

臨床検体からの total RNA を以下のようにして抽出した。肺癌組織をオートクレーブ滅菌したハサミで細切してから、RNAiso Plus (Takara Bio, Shiga, Japan) 1 mL とともにセラミックビーズ入りチューブ (CK Mix, Bertin instruments, France) に加え、装置破砕装置 Precellys 24 (Bertin instruments, France) で破砕、懸濁した。遠心後の上清にクロロホルム 200 μL (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan) を加え懸濁、遠心ののち水相を回収し、イソプロパノール 500 μL (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.) をグリコーゲン 40 μg (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.) とともに加えて沈殿物を 80% エタノール (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.) で洗浄し回収した。回収した RNA は DEPC 処理水に溶解し、-80 °C で保管した。

2-2. 遺伝子発現の定量法

マイクロアレイ解析から目的遺伝子として設定した、Integrin α11 (ITGA11)、Integrin α2 (ITGA2)、Integrin β4 (ITGB4)、Claudin 10b (CLDN10b) について定量的

reverse transcription (RT)-PCR 法によって定量を行った。臨床検体から抽出した total RNA 1 μg を DNase で室温 15 分間処理後に 25 mM EDTA 1 μL を加え、65 °C 15 分間の heat activation を行った。次に Random Hexamer 0.5 μL (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA)、20 mM dNTP 0.5 μL、DEPC 処理水 1 μL を加えて全量 13 μL とし、65 °C で 5 分間、氷上で 1 分間 incubate した。これに、SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて cDNA を合成した。cDNA を合成した後、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo, Osaka, Japan)を用いて Applied Biosystems 7500 リアルタイム PCR システムによりリアルタイム PCR を行った。リアルタイム PCR に用いたプライマーを表 3 に示す。RNA polymerase II subunit A (POLR2A) をサンプル間の cDNA 量の変動を補正するための内在性コントロールとして用いた。リアルタイム PCR 後の遺伝子発現量の定量方法としては、ターゲット遺伝子と PORL2A の Ct 値の差分である ΔCt 値を比較する相対定量法を用いた [71]。

標的遺伝子や POLR2A に対する最適化したプライマー設計は、プライマー解析ソフトウェア (OLIGO; Molecular Biology Insights, Inc. version 6.71) を用いてデザインし、primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) を用いて他に相同性のある配列が存在しないことを確認した。PCR で得られた産物については、アガロースゲル電気泳動により、各ターゲットを目的として作成したプライマーに対する特異的な PCR 産物であることを確認した。

表 2. リアルタイム PCR に用いたプライマー

Gene		Primer (5’ to 3’)
ITGA11	Forward primer	CCTGTGGCCAGGGTTCAC
	Reverse primer	CCCACGACCAGCCACTTATT
	Product	137 base pairs
ITGA2	Forward primer	CCTGTGGCCAGGGTTCAC
	Reverse primer	CCCACGACCAGCCACTTATT
	Product	135 base pairs
ITGB4	Forward primer	CCGGGAGAGGGAGGAAGA
	Reverse primer	GTTTGCCAAGGTCCCAGAGA
	Product	104 base pairs
CLDN10b	Forward primer	GTCATCACAACCGCCACCTA
	Reverse primer	ATATAACCGTCCAGCGCCAG
	Product	113 base pairs
POLR2A	Forward primer	GAAGGCCAAGCAGGACGTAA
	Reverse primer	GCAGAGGAGCCAGTCTTGTC
	Product	147 base pairs

2-3. 臨床データの収集

全症例において、診療記録をもとに臨床病理学的データを抽出した。診断は病理学的所見に基づき、TNM 分類第 7 版によって病期を決定した [72]。本研究では肺癌再発をエンドポイントとした。無再発症例において、肺癌以外による死亡は打ち切りとして扱った。以下の患者パラメーターを記録し解析に用いた: 年齢、性別、喫煙歴、病理病期、血管浸潤、リンパ管浸潤、EGFR 遺伝子変異。無再発生存期間 (Recurrence-Free Survival; RFS) は肺切除の日から画像的に再発が認められた日までの期間と定義した。

3. The Cancer Genome Atlas database の解析

The Cancer Genome Atlas (TCGA) database (https://cancergenome.nih.gov/) から、肺腺癌 (LUAD) と 肺扁平上皮癌 (LUSC) の RNA シークエンスデータを入手した。Integrin α11 の発現量は fragments per kilobase of exon per million mapped fragments (FPKM) で得られた (GDC.h38 GENCODE v22, data status as of June 1, 2016) 。臨床経過の不明な症例を除外して、994 例の NSCLC 症例を対象とした。患者の遺伝子発現量に加えて、臨床病期を解析に加えた。全生存期間 (Overall Survival; OS) は診断から死亡までの期間とした。

4. 細胞株の機能解析

4-1. 細胞株

ヒト肺癌細胞株 Calu1、H23、H441 細胞は American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, USA) と Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japan) から、Lenti-X 293t 細胞は Takara Bio USA, Inc. (Mountain View, California, USA) から得た。培地はすべて譲渡元が推奨する培地を用い、CO_2 incubator で 37°C で培養を行った。各細胞株の ITGA11 発現の違いをリアルタイム PCR によって調べた。リアルタイム PCR は 2-2. と同様に cDNA を合成した後、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いて triplicate で行った。リアルタイム PCR の結果から Calu1 細胞は ITGA11 高発現、H23 細胞と H441 細胞は ITGA11 低発現であることが判明した (表 4)。

表 3. 各肺癌細胞株と ITGA11 遺伝子発現量

	ITGA11 Ct 値	POLR2A Ct 値	ΔCt 値
Calu1	19.2	19.3	-0.1
H23	32.1	16.7	15.4
H441	30.4	21.1	9.3

4-2.ヒト ITGA11 cDNA のクローニング

Calu1 細胞から total RNA を RNAiso Plus (Takara Bio)を用いてプロトコールに従って抽出した。抽出した 1 μg の RNA から、SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific)、ITGA11 Forward primer (ATGGACCTGCCCAGGG)、ITGA11 Reverse primer (AGCCCACTCCAGCACTTTG) を用いて cDNA を合成し、pGEM-T Easy vector (Promega) に TA クローニングした。その後 DH5α Competent E.Coli (Takara Bio) を以下のように形質転換した。DH5α 20 μL に約 2 ng のライゲーション反応産物を加え、30 分氷上で incubate した後、42 °C 45 秒のヒートショックを行い、その後 2 分間氷上に置いた。50 μg/mL のアンピシリン入り LB 固形培地にまき、37°C で一晩培養した。コロニーをピックアップし、LB 液体培地で 37 °C で一晩培養した後、PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega) を用いて、付属のプロトコールに従い精製した。得られたプラスミドを BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて付属のプロトコールに従い、サイクルシークエンス反応を行った。NucleoSeq Columns (Takara Bio) を用いて付属のプロトコールに従い、反応物を精製後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer により塩基配列を解析し、正しい塩基配列であることを確認した。

表 4. サイクルシークエンス反応に用いたプライマー

Gene		Primer (5’ to 3’)
pGEM	Forward primer	CTGCAAGGCGATTAAGTTGG
	Reverse primer	GCCAAGCTATTTAGGTGAC
ITGA11	シークエンス用 primer 1	ATGGACCTGCCCAGGG
	シークエンス用 primer 2	TTGTGCAGTATGGCGAAGAT
	シークエンス用 primer 3	TTCCTCTCCGCGAGTCCTAC
	シークエンス用 primer 4	GCTACCGGCCTCCAGTATTT
	シークエンス用 primer 5	TGTTGGATGCCCGGAGTGAC

4-3. 強制発現ベクターの作成

細胞株への強制発現には cDNA 発現用レンチウイルスベクタープラスミド (CSII-CMV-MCS-IRES2-Bsd, Riken BRC, Ibaraki, Japan)を用いた。このベクターは multiple cloning site に NheI 認識配列と EcoRI 認識配列を持つ。TA クローニングした pGEM-ITGA11 プラスミドをテンプレートとして、NheI 認識配列と足場を付けた NheI-ITGA11 Forward primer (tatgctagcATGGACCTGCCCAG) と、EcoRI 認識配列 (tctgaattcCTCCAGCACTTTGG) をつけた EcoRI-ITGA11 Reverse primer を用いて、NheI-ITGA11-EcoRI を PCR で増幅した。

この PCR 産物と CSII-CMV-MCS-IRES2-Bsd ベクターを制限酵素 NheI と EcoRI で切断後、ligation し、CSII-CMV-ITGA11-IRES2-Bsd ベクターを得た (図 5)。得られた CSII-CMV-ITGA11-IRES2-Bsd ベクターを FLAG タグを含む EcoRI-FLAG-XhoINotI 配列 (5'-AATTCGATTACAAGGACGACGATGACAAGTAGCTCGAGGC-3') と混和し、制限酵素 NheI と XhoI で切断、ligation して FLAG タグ配列を組み込んだ。

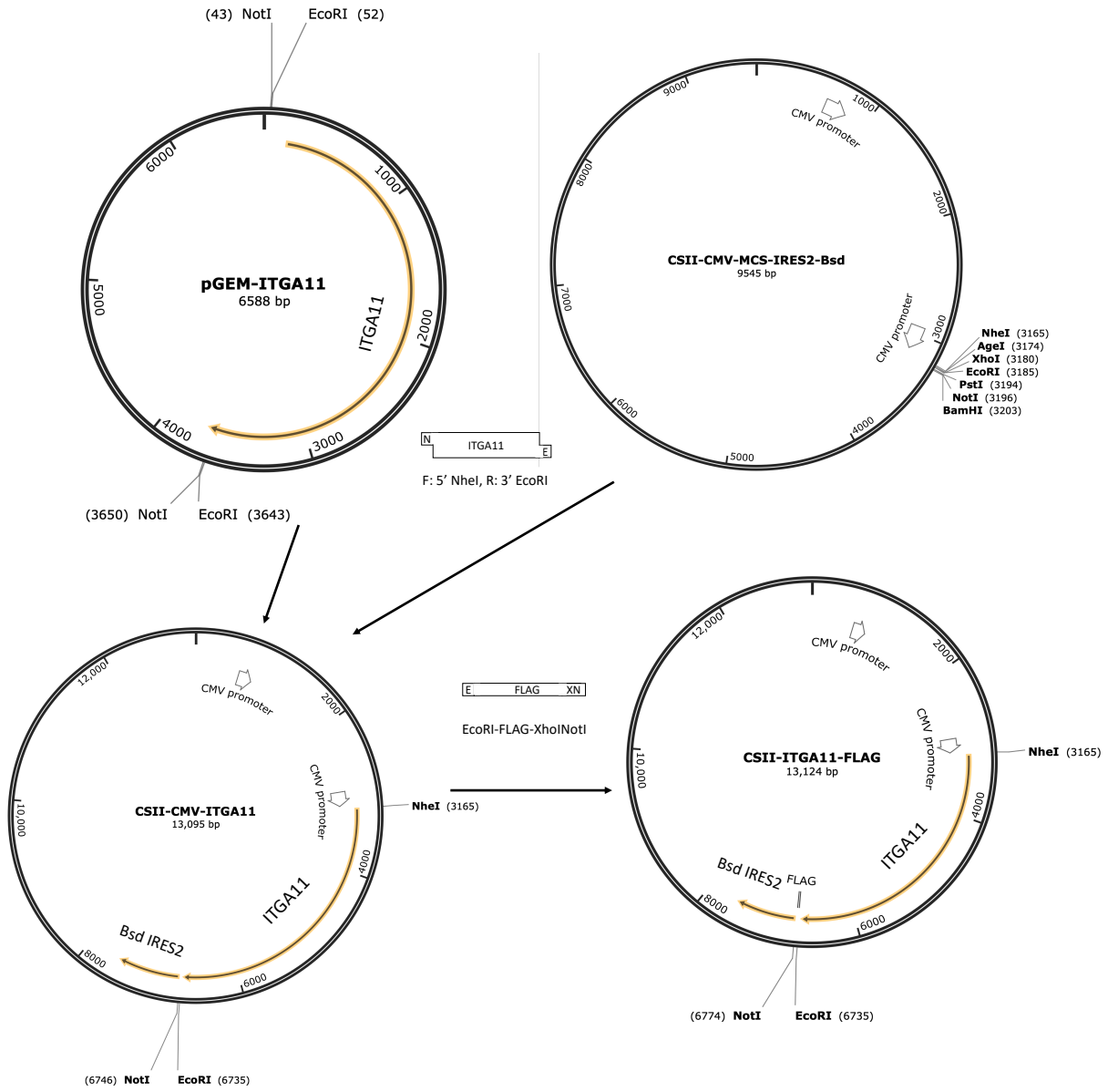

図 4. 強制発現ベクターの作成
IRES2: Encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry site,
Bsd: Blasticidin resistance gene,
CMV: Human cytomegalovirus immediate early promoter.

上記と同様に One Shot Stbl3 Chemically Competent E.Coli (Invitrogen) を形質転換した後、50 μg/mL のアンピシリン入り LB 固形培地にまき、37 °C で一晩培養した。コロニーをピックアップし、アンピシリン入り LB 液体培地で 37 °C で一晩培養した後、Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega) を用いて、ミディプレップを行い、ITGA11 のレンチウイルス発現ベクターを得た。得られたプラスミドを BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてサイクルシークエンス反応を同様に行い、正しい塩基配列であることを確認した。コントロールとしては、CSII-CMV-MCS-IRES2-Bsd (Blank) ベクターと CSII-CMV-GFP-IRES2-Bsd (GFP) ベクターを使用した。

4-4.レンチウイルス感染

得られたレンチウイルスベクターとパッケージングプラスミド (pCMV-VSV-G-RSV-Rev 及び pCAG-HIVgp, Riken BRC) を Lenti-X 293t 細胞に HilyMax (Dojindo, Tokyo, Japan) を用い、プロトコールに従ってリポフェクションを行った。16 時間培養後に forskolin 7.5 μg (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.) を添加した培地に交換し 48 時間培養した。このレンチウイルスを含む培養上清を採取し、肺癌細胞 H23 および H441 細胞に感染させ、24 時間後より Blasticidin (Kaken Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) によって薬剤選択を行った。コントロールである Blank ベクター、GFP 発現ベクターについても同様に感染、薬剤選択を行った。Total RNA を RNAiso Plus (Takara

Bio) を用いて抽出し、ITGA11 強制発現を行った細胞とコントロールの細胞で、ITGA11 発現の違いをリアルタイム PCR によって調べた。リアルタイム PCR は 3. と同様に cDNA を合成した後、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いて triplicate で行った。

4-5. コーティングコートプレートの作成

ITGA11 を強制発現させた肺癌細胞株およびコントロールの細胞株に対して、コラーゲンコートプレート上もしくは通常のプレート上で機能解析を行った。コラーゲンコートプレートは以下のようにして作成した。コラーゲン type I (Corning, New York, USA) を推奨濃度に従い 8 μg/cm^2 の濃度になるように Phosphate buffered saline (PBS, Thermo Fisher Scientific) で希釈して各プレートに加えた。37 °C、4 時間 incubate し、その後上清を取り除き、PBS で 2 回洗浄して、4 °C で保管した。

4-6. 細胞の形態観察

6-well コラーゲンコートプレート、および通常の 6-well プレート上に、ITGA11 強制発現、およびコントロールとして Blank vector をトランスフェクションした H23 細胞をそれぞれ 1×10^5 cells/well ずつ triplicate で播種した。0.5%FBS を含む培養液に変更して CO_2 incubator で 37 °C、24 時間飢餓状態にした後、プレートを蛍光顕微鏡 BZ-X710 (KEYENCE, Osaka, Japan) に設置して細胞を撮影した。撮影写真をも

とに、ImageJ version 1.47 (NIH, Bethesda, MD; http://imagej.nih.gov/ij) を使用して各条件の細胞面積を 50 個測定し平均値を計算した。

4-7. 上皮間葉転換 (EMT) 関連遺伝子発現の解析

ITGA11 強制発現、およびコントロールとして Blank vector をトランスフェクションした H23 細胞、GFP 強制発現させた H441 細胞を、それぞれ 6-well コラーゲンコートプレート、および通常の 6-well プレート上に 1 x 10^5 cells/well ずつ triplicate で播種した。CO_2 incubator で 37 °C、48 時間培養し、ITGA11 強制発現を行った H23、H441 細胞とコントロールの H23、H441 細胞で TGF-β シグナル関連遺伝子である TGF-β1、Snail、ZEB1、および EMT 関連遺伝子である E-cadherin、Vimentin について、発現の違いをリアルタイム PCR によって調べた。リアルタイム PCR は 2-2. と同様に cDNA を合成した後、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いて triplicate で行った。リアルタイム PCR に用いたプライマーを表 6 に示す。POLR2A をサンプル間の cDNA 量の変動を補正するための内在性コントロールとして用いた。

表 5.リアルタイム PCR に用いた上皮間葉転換関連遺伝子のプライマー

Gene		Primer (5’ to 3’)
TGF-β1	Forward primer	TTTTGATGTCACCGGAGTTG
	Reverse primer	GGCGCTAAGGCGAAAG
	Product	72 base pairs
SNAI1	Forward primer	ACTATGCCGCGCTCTTTCC
	Reverse primer	TGGGGTTGAGGATCTCCG
	Product	160 base pairs
ZEB1	Forward primer	TACAAACATCACCTAAAAGAGCAC
	Reverse primer	GTCGCCCATTCACAGGTATC
	Product	154 base pairs
E-cadherin	Forward primer	CACAGCAGAACTAACACACGG
	Reverse primer	CACACACGCTGACCTCTAAG
	Product	182 base pairs
Vimentin	Forward primer	AGTACCGGAGACAGGTGCAG
	Reverse primer	GCTTCAACGGCAAAGTTCTC
	Product	112 base pairs

4-8. 細胞増殖アッセイ

ITGA11 強制発現、およびコントロールとして GFP 強制発現させた H23、H441 細胞を、それぞれ 6-well コラーゲンコートプレート、および通常の 6-well プレート上に 1 x 10^5 cells/well ずつ triplicate で播種した。1、2、3、4 日後に Automated Cell Counter TC10 (BIORAD, California, USA) を用いて細胞数を測定した。また、ITGA11 強制発現、およびコントロールとして GFP 強制発現させた、H23、H441 細胞をそれぞれ 96-well コラーゲンコートプレート、および通常の 96-well プレート上に 5 x 10^3 cells/well ずつ quadruplicate で播種し、1、2、3、4 日後に Cell counting kit-8 (Dojindo) を 10 μL/well を添加し、1 時間後に microplate reader ARVOX (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) を用いて吸光度を測定した。

4-9. Wound Healing Assay

細胞の遊走能を評価するために wound healing assay を行った。ITGA11 強制発現、およびコントロールとして GFP 強制発現した H23 および H441 細胞を用意し、それぞれ、細胞濃度を H23 は 5 x 10^6 /ml、H441 は 7.5 x 10^6 /ml に調整した。2-well culture inserts (ibidi, Martinsried, Germany) を、24 well コラーゲンコートプレート、および通常の 24 well プレートの各 well に接着させ、culture inserts 内に調整した細胞を 70 μL ずつ播種した。この際、同条件のものを 3 well 以上作成した。CO_2 incubator で 37 °C、24 時間培養後、オートクレーブ滅菌したピンセットで culture inserts を取り除

き、それぞれのプレートに 10%FBS 入り培地を 2ml ずつ加えた。24 well plate を蛍光顕微鏡 BZ-X710 (KEYENCE) に設置して撮影位置を決定し、H23 については 0、6 時間後、H441 については 0、8 時間後に撮影した。撮影写真をもとに、ImageJ version 1.47 (NIH, Bethesda, MD; http://imagej.nih.gov/ij) を使用して Gap Area を計算し、Gap Area の変化率 (Gap closure rate) を測定した。

4-10. Invasion Assay

細胞浸潤能を測定するために、96-well Cultrex Cell Invasion Assay (Trevigen, Gaithersburg, Maryland, USA) を用いた。ITGA11 強制発現、もしくはコントロールとして Blank vector をトランスフェクションした H23 細胞を用意した。0.5%FBS を含む培養液に変更して 24 時間飢餓状態とした。Cell Invasion Chamber のメンブレン上に、プロトコールに従って 2 mg/ml に調整した I 型コラーゲン 100 μL を CO_2 incubator で 37 °C、一晩 incubation した。I 型コラーゲン含有液を PBS で wash し、用意した細胞を 0.5%FBS を含む培養液で 1 x 10^6 /ml に調整し、各 well の Cell Invasion Chamber に 50 μL ずつ播種した。Bottom Chamber に 10%FBS を含む培養液を 200 μL ずつ加えて、37°C、48 時間 incubation した。Cell Invasion Chamber から浸潤した細胞を付属の washing buffer で洗浄し、Calcein AM を添加した Cell dissociation solution に反応させて 1 時間後に microplate reader ARVOX (Perkin Elmer) を用いて吸光度を確認した。I 型

コラーゲンフィルターを浸潤した細胞数とプラスチックフィルターを遊走した細胞数の比 (Invasion ratio) を測定した。

5. 統計解析

統計解析は全て、SPSS software (SPSS, Illinois, USA)を用いて行った。連続変数の二群間比較は対応なしの両側 t 検定で、カテゴリー変数には $\chi 2$ 検定を用いた。多群間比較は分散分析後に Tukey 検定で評価した。肺腺癌症例における ITGA11 の高発現群と低発現群の適切なカットオフ値は、Area Under Curve (AUC) analysis を用いて評価した。RFS、OS の解析は Kaplan-Meier 法を用い、群間の比較は Log rank test を用いた。有意差は P 値 < 0.05 とした。細胞株の実験は少なくとも 3 回以上の独立した実験を行い、データはその結果の平均値 ± 標準誤差もしくは、中央値、Interquartile Range (IQR) で示した。

結果

1. マイクロアレイの解析

Bioconductor を用いて一定の発現量があり、肺腺癌で高発現、かつ正常肺組織で低発現であった 39 遺伝子を heatmap 上に抽出した (図 4)。表 2 に 39 遺伝子を示す。正常肺組織において高発現症例がなく、肺腺癌と正常肺組織との発現が大きく異なる遺伝子として Integrin が多いことに注目し、その中でも過去の報告がなかった ITGA11 を標的遺伝子として発現を解析することとした。また、既報はあるが肺腺癌と正常肺組織との発現が大きく異なっており、重要な膜タンパク遺伝子と考えられた ITGA2、ITGB4、CLDN10b についても発現量の定量を行った。

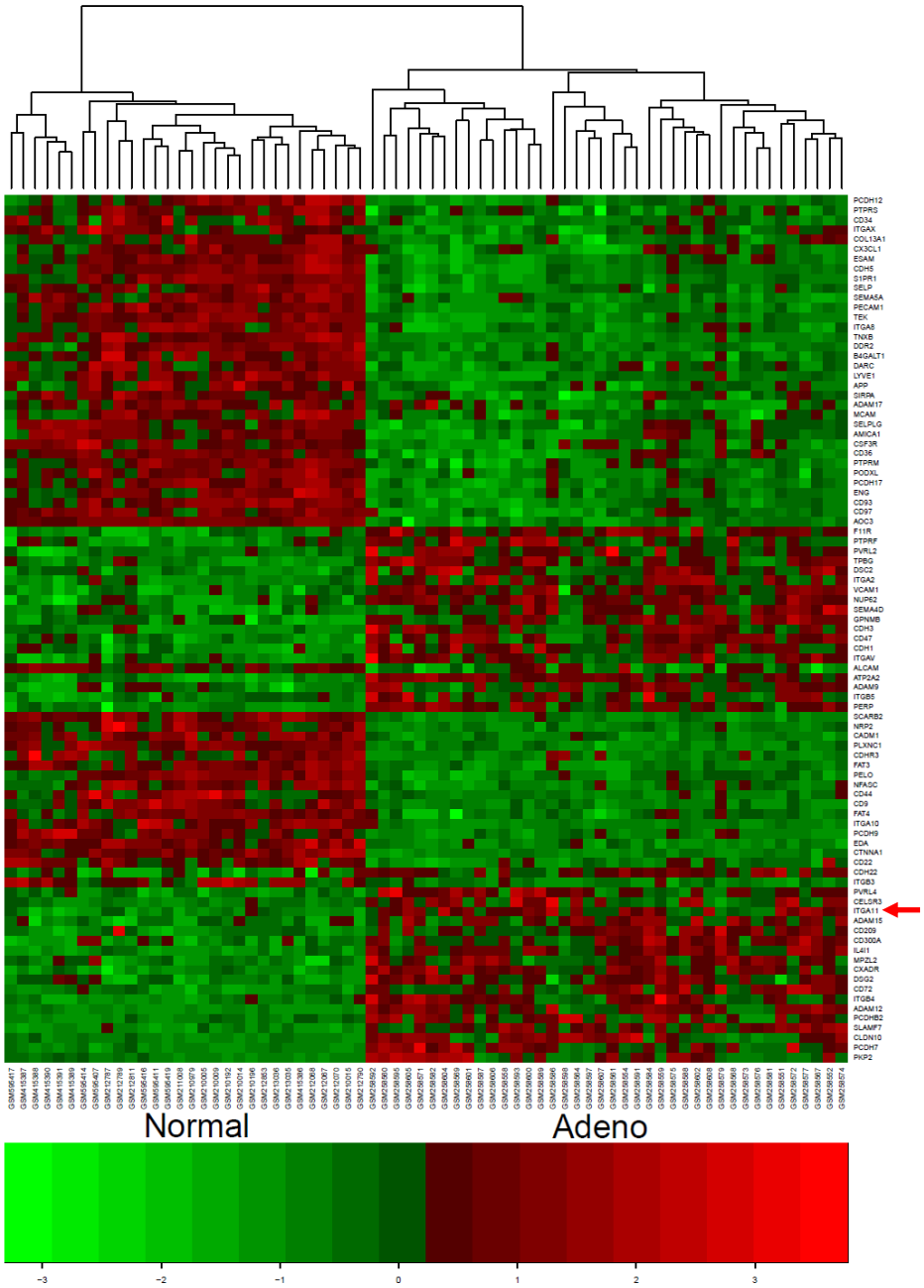

図 5. 膜表面タンパク遺伝子のマイクロアレイ解析結果
肺腺癌 40 例 (GSE10245) と正常肺組織 30 例 (GSE16538, GSE24206, GSE8581)のデータセットの発現プロフィールを用いてヒートマップを作成した。Adeno = 肺腺癌症例、Normal = 正常肺組織症例。Affymetrix GeneChipR Human Genome U133 Plus 2.0 Array より引用。

表 6. 正常肺組織で低発現かつ肺腺癌で高発現であった膜タンパク遺伝子

ADAM9	CD300A	DSG2	ITGB4	PTPRF
ADAM12	CDH1	F11R	ITGB5	PVRL2
ADAM15	CDH3	GPNMB	MPZL2	PVRL4
ALCAM	CDH22	IL4I1	NUP62	SEMA4D
ATP2A2	CELSR3	ITGA2	PCDHB2	SLAMF7
CD47	CLDN10	ITGA11	PCDH7	TPBG
CD72	CXADR	ITGAV	PERP	VCAM1
CD209	DSC2	ITGB3	PKP2	

2. 臨床検体の解析

2-1. 対象症例の患者背景

解析した 80 例の臨床病理学的特徴を表 7 に示す。年齢の中央値は 68 歳 (範囲は 36-83 歳)で、36 人 (45%) が女性、37 人 (46%) が非喫煙者であった。組織分類では 73 人 (91%) が Adenocarcinoma で、7 人 (9%) が Squamous cell carcinoma であった。病理病期は I 期と II 期が多く、それぞれ 57 人 (71%) と 15 人 (19%) であった。術後化学療法は 16 人 (20%) に対して行っていた。血管浸潤は 24 人 (30%)、リンパ管浸潤は 15 人 (19%) に認められた。EGFR 遺伝子変異は 29 人 (36%) に認め、EGFR 遺伝子野生型が 16 人 (20%)、EGFR 遺伝子変異不明が 35 人 (44%) であった。

表 7. 非小細胞肺癌 80 例の臨床病理学的特徴

		N = 80	%
年齢 (median, years)		68 (36-83)	
性別（女性）		36	(45)
Never smoker		37	(46)
組織分類	Adenocarcinoma	73	(91)
	Squamous Carcinoma	7	(9)
Stage	I	57	(71)
	II	15	(19)
	III / IV	8	(10)
術後化学療法	なし	64	(80)
	あり	16	(20)
血管浸潤	陰性	56	(70)
	陽性	24	(30)
リンパ管浸潤	陰性	65	(81)
	陽性	15	(19)
EGFR 遺伝子変異	Wild type	16	(20)
	Mutated	29	(36)
	Unknown	35	(44)

2-2. 各膜タンパクの発現と病理病期の関係

対象となった非小細胞肺癌患者の病理病期により I 期、II 期、III 期＋IV 期に症例を分類し、ITGA11、ITGA2、ITGB4、CLDN10b の mRNA 発現量の関係を調べた。発現量と病期の影響を分析するために分散分析をおこなったところ、ITGA2、ITGB4、CLDN10b については、それぞれの発現量と病理病期との間に統計学的な有意差は認められなかった (図 6)。一方、ITGA11 については病期による影響は有意であった ($F(2, 79) = 4.341$, $P = 0.016$)。Tukey を用いた多重比較では、I 期と II 期および II 期と III/IV 期の間で発現量の差は認めなかったが (それぞれ、I 期 vs. II 期: $P = 0.934$、II 期 vs. III/IV 期: $P = 0.129$)、I 期に比べて III/IV 期で統計学的に有意に ITGA11 の発現量が高かった ($P = 0.031$)。

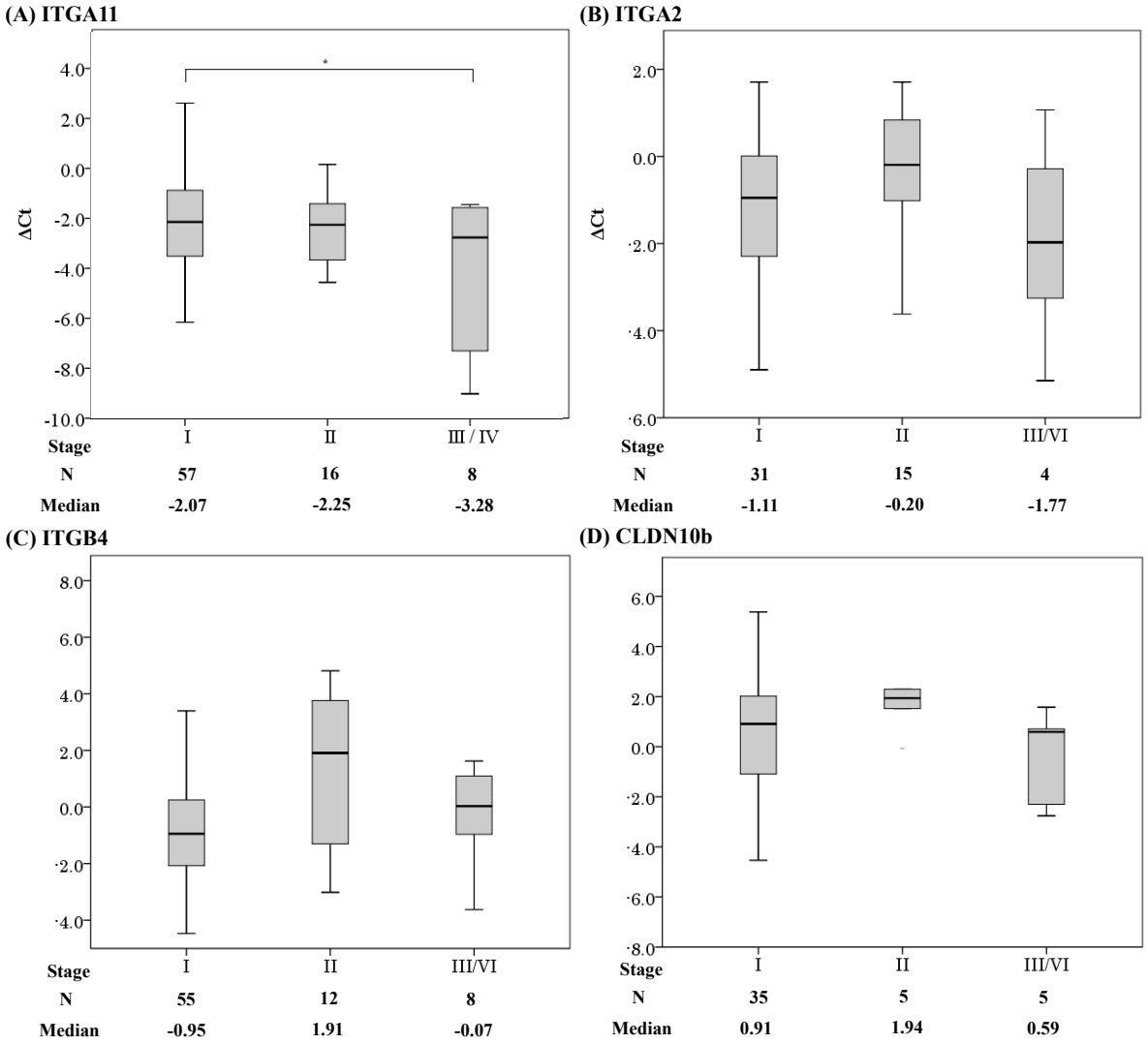

図 6. 各膜タンパクの発現量と病理病期について

(A) Integrin α11 (ITGA11)、(B) Integrin α2 (ITGA2)、(C) Integrin β4 (ITGB4)、Claudin 10b (CLDN10b) の遺伝子発現量と病理病期の関係。非小細胞肺癌の病理病期が進行するほど、ITGA11 の発現量が高い傾向であった。データ数と中央値を下に示した。BOX は Interquartile Range (IQR) 、Whisker は 75 パーセンタイル + 1.5 * IQR もしくは、25 パーセンタイル - 1.5 * IQR を表す。*P < 0.05。

2-3. Integrin α11 の発現と病理学的特徴の関係

次に、ITGA11 発現量と血管浸潤およびリンパ管浸潤の有無、腫瘍径の関係性について検討した。図 7 に示すように、ITGA11 の発現量と血管浸潤、リンパ管浸潤について統計学的な差は認めなかった (それぞれ、血管浸潤: P = 0.062、リンパ管浸潤: P = 0.084)。また、ITGA11 発現量と腫瘍径についても相関関係は認めなかった (Correlation coefficient = 0.009)。さらに、ITGA11 発現量と EGFR 遺伝子変異の有無についても調べたが、統計学的に明らかな関係性は認められなかった (P = 0.563)。

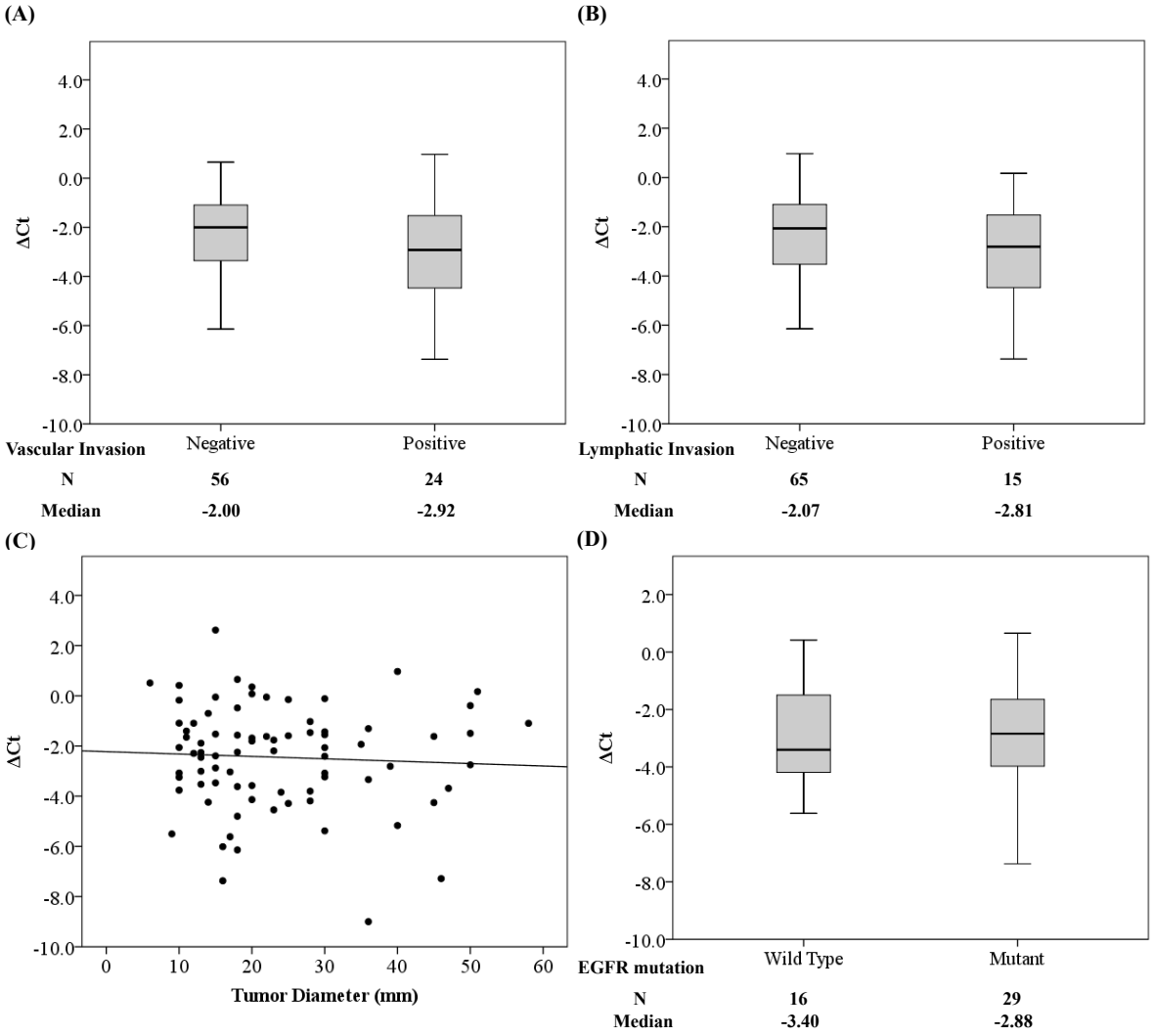

図 7. Integrin α11 の発現量と臨床病理的特徴
(A) 血管浸潤、(B) リンパ管浸潤、(C) 腫瘍径、(D) EGFR 遺伝子変異と ITGA11 遺伝子発現量の関係。データ数と中央値を下に示した。BOX は Interquartile Range (IQR) 、Whisker は 75 パーセンタイル + 1.5 * IQR もしくは、25 パーセンタイル - 1.5 * IQR を表す。ITGA11 発現量と各項目について有意な関係は認めなかった。

2-4. Integrin α11 発現と Recurrence-free Survival の関係

Integrin α11 発現量と RFS の関係について、Kaplan-Meier 法を用いて検討することとした。ITGA11 発現レベルと観察期間内の再発の有無に関して ROC 曲線を用いて計算し ΔCt 値を -1.6 で高発現群と低発現に割り付けることとした (図 8, area under the curve 0.67; specificity 0.90, sensitivity 0.29)。高発現群 54 例、低発現群 26 例に割り付け、両群で臨床病理学的特徴に有意な差を認めなかった (表 8)。高発現群と低発現群で EGFR 遺伝子変異の頻度についても有意差を認めなかった (22/33 vs. 6/12, P =0.606)。

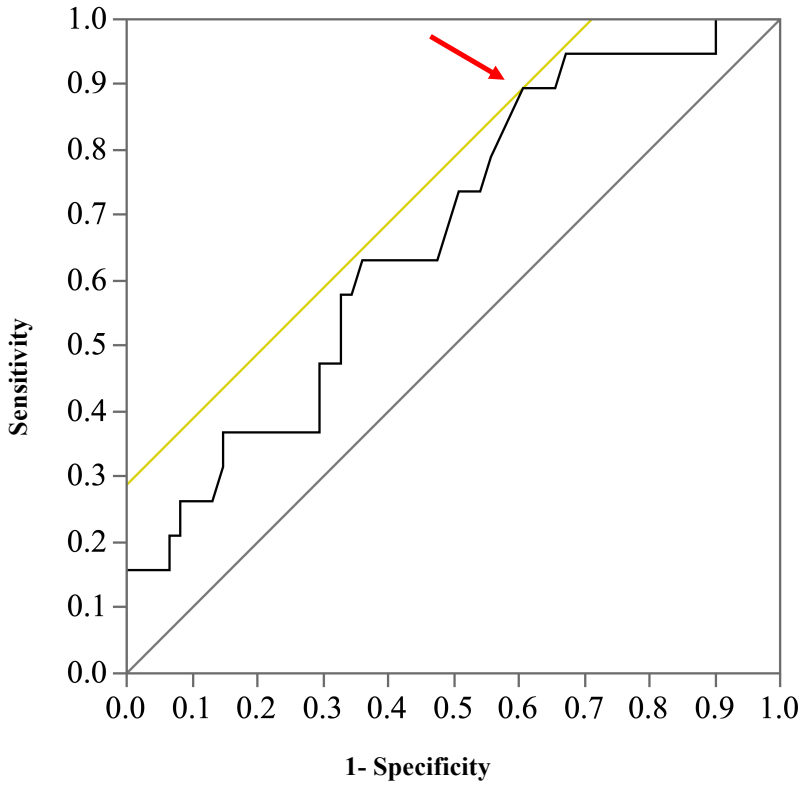

図 8. ROC 曲線

Integrin α11 発現量の適切なカットオフ値は ΔCt = -1.6 と計算された (赤矢印)。Area under the curve 0.67、specificity 0.90、 sensitivity 0.29。

表 8. ROC 曲線で分類した Integrin α11 高発現群と低発現群の臨床病理学的特徴

		高発現群	低発現群	P 値
		N = 54 (%)	N = 26 (%)	
年齢 (median, years)		68 (38-82)	69 (36-83)	0.572
性別（女性）		26 (48)	10 (38)	0.413
Never smoker		25 (46)	12 (46)	0.991
組織分類	Adenocarcinoma	51 (94)	22 (85)	0.160
	Squamous Carcinoma	3 (6)	4 (15)	
Stage	I	37 (69)	20 (77)	0.387
	II	10 (18)	5 (19)	
	III / IV	7 (13)	1 (4)	
術後化学療法	なし	42 (78)	22 (85)	0.474
	あり	12 (22)	4 (15)	
血管浸潤	陰性	36 (67)	20 (77)	0.342
	陽性	18 (33)	6 (23)	
リンパ管浸潤	陰性	43 (80)	22 (85)	0.588
	陽性	11 (20)	4 (15)	

Kaplan-Meier 法による解析を行ったところ、ITGA11 高発現群は低発現群に比べて統計学的に有意に短い RFS を認めた (図 9A、Log Rank test, P = 0.043)。さらに、I 期非小細胞肺癌 57 例について ITGA11 発現量と RFS の関係について検討するため、先程計算した ΔCt のカットオフ値 -1.6 を用いて、高発現群 37 例、低発現群 20 例に割り付けた。Kaplan-Meier 法による解析を行ったところ、I 期症例においても同様に、ITGA11 高発現群は低発現群に比べて統計学的に有意に短い RFS を認めた (図 9B、Log Rank test, P = 0.049)。

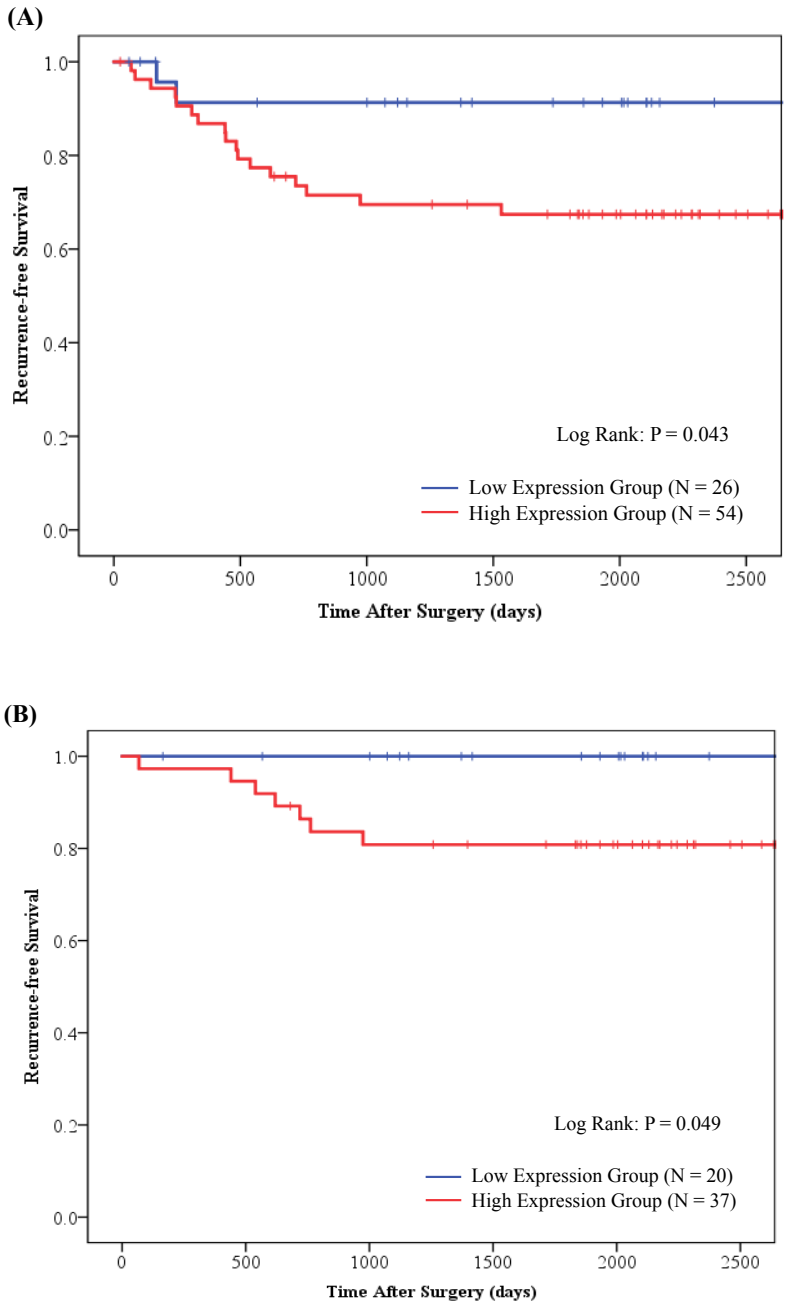

図 9. ROC 曲線から分類した Integrin α11 の発現量と Recurrence-free Survival の関係
(A) 全症例 (N = 80)、(B) I 期症例 (N = 57)。全症例、I 期症例でともに ITGA11 高発現群は低発現群に比べて統計学的に有意に短い RFS を認めた。

また、ITGA11 の発現量の中央値を用いて高発現群と低発現群に分類した。両群で臨床病理学的特徴に有意な差を認めなかった (表 9)。EGFR 遺伝子変異を検索した症例について、高発現群と低発現群で変異の頻度に有意差を認めなかった (19/28 vs. 10/17, P =0.539)。Kaplan-Meier 法による解析を行ったところ、ITGA11 高発現群と低発現群で RFS に統計学的な有意差を認めなかった (図 10A、Log Rank test, P = 0.280)。一方、I 期症例において ITGA11 高発現群は低発現群に比べて統計学的に有意に短い RFS を認めた (図 10B、Log Rank test, P = 0.047)。

表 9. 中央値で分類した Integrin α11 高発現群と低発現群の臨床病理学的特徴

		高発現群	低発現群	P 値
		N =40 (%)	N = 40 (%)	
年齢 (median, years)		68 (45-82)	68 (36-83)	0.852
性別（女性）		22 (55)	14 (35)	0.072
Never smoker		21 (53)	16 (40)	0.262
組織分類	Adenocarcinoma	38 (95)	35 (87)	0.235
	Squamous Carcinoma	2 (5)	5 (13)	
Stage	I	27 (68)	30 (75)	0.696
	II	8 (20)	7 (18)	
	III / IV	5 (12)	3 (7)	
術後化学療法	なし	32 (80)	32 (80)	1.000
	あり	8 (20)	8 (20)	
血管浸潤	陰性	26 (65)	30 (75)	0.329
	陽性	14 (35)	10 (25)	
リンパ管浸潤	陰性	31 (78)	34 (85)	0.390
	陽性	9 (22)	6 (15)	

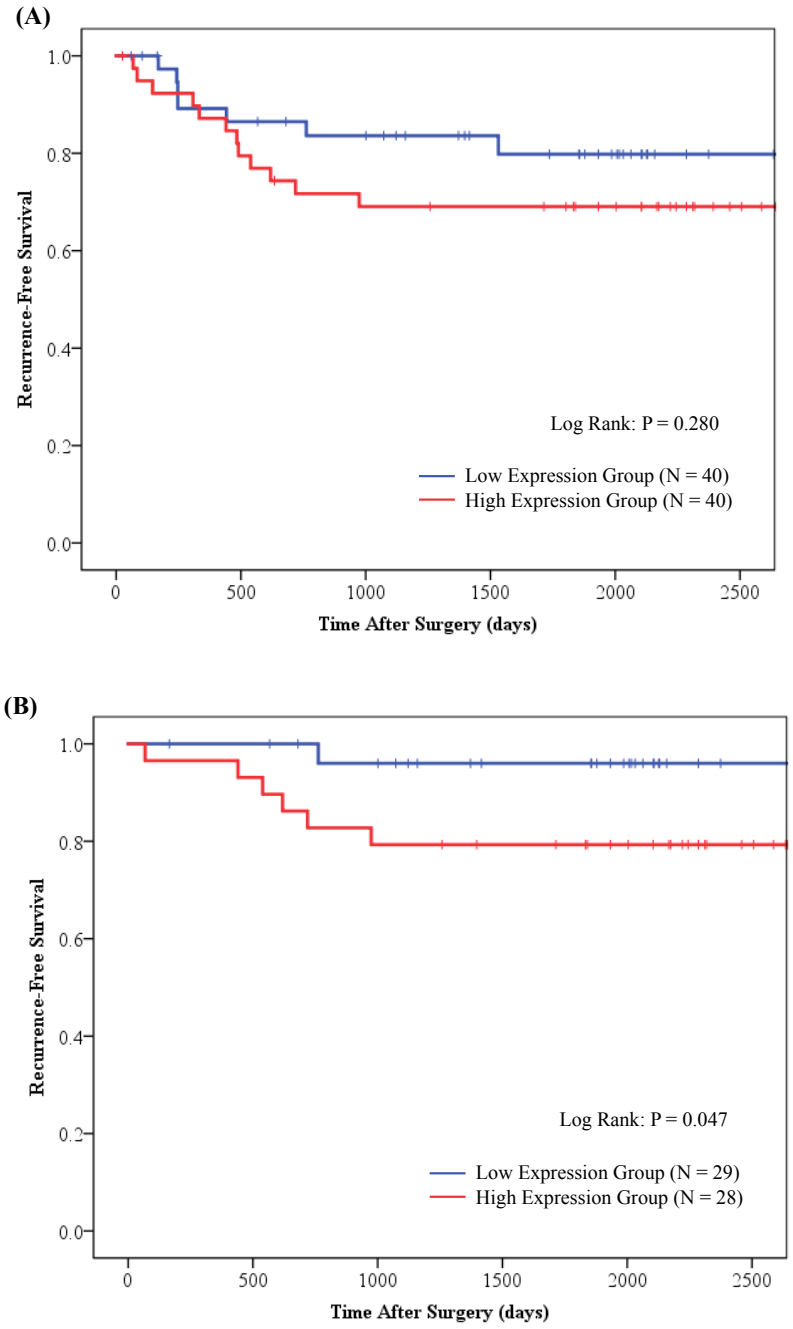

図 10. 中央値で分類した Integrin α11 の発現量と Recurrence-free Survival の関係
(A) 全症例 (N = 80)、(B) I 期症例 (N = 57)。I 期症例において ITGA11 高発現群は低発現群に比べて統計学的に有意に短い RFS を認めた。

3. The Cancer Genome Atlas database の解析

TCGA database を使用して *in silico* における ITGA11 の発現量と OS の関係ついて非小細胞肺癌 944 例について検討した。1-4 と同様に ITGA11 発現レベルと観察期間内の死亡の有無に関して ROC 曲線を書き、カットオフ値を FPKM 値 -1.895 と計算した。FPKM 値 -1.895 以上の高発現群 550 例、FPKM 値 -1.895 より低い低発現群 444 例に割り付けた。Kaplan-Meier 法による解析を行ったところ、ITGA11 高発現群は低発現群に比べて統計学的に有意に短い OS を認めた (図 11A、Log Rank test, P = 0.011)。I 期非小細胞肺癌 510 例を、高発現群 280 例、低発現群 230 例に割り付け、Kaplan-Meier 法による解析を行ったところ、ITGA11 高発現群は低発現群に比べて統計学的に有意に短い OS を認めた (図 11B、Log Rank test, P = 0.035)。

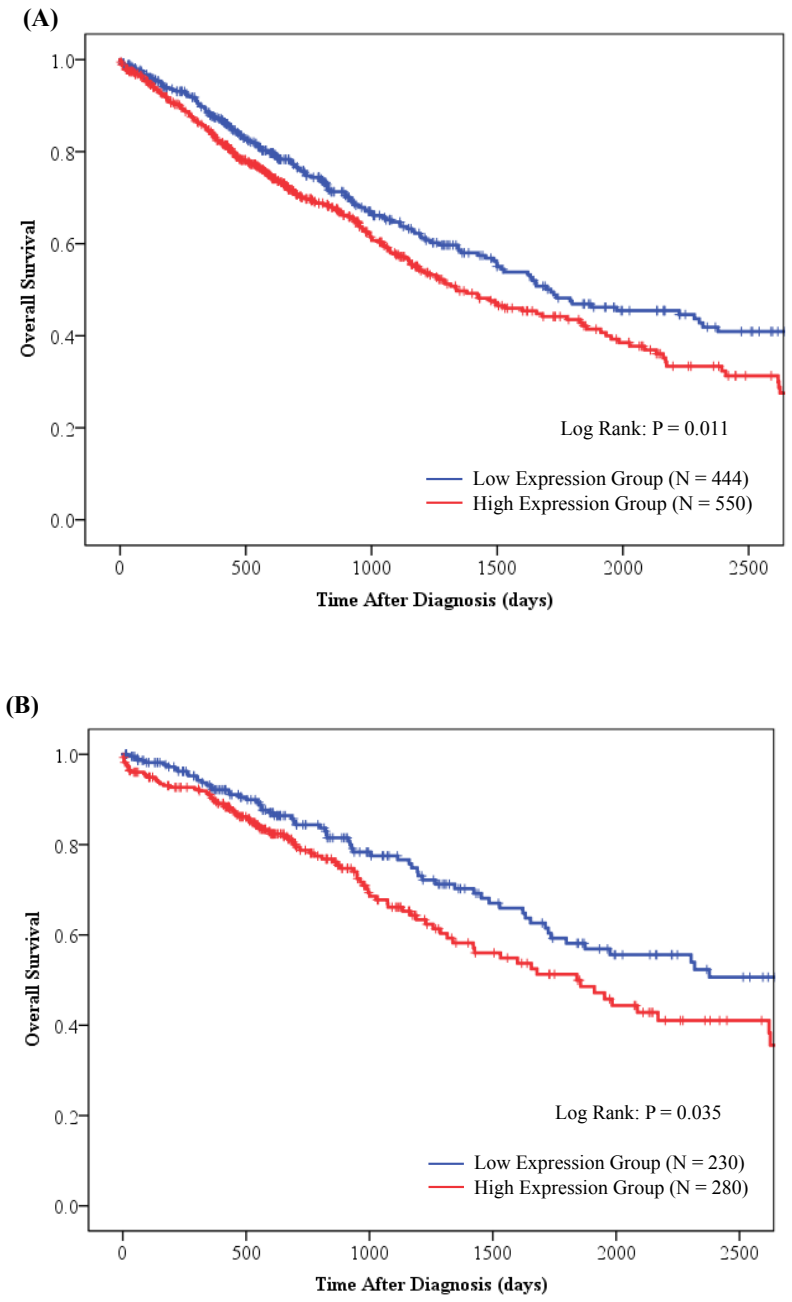

図 11. The Cancer Genome Atlas database における Integrin α11 の発現量と Overall Survival (A) 全症例 (N = 994)、(B) I 期症例 (N = 510)。全症例、I 期症例でともに ITGA11 高発現群は低発現群に比べて統計学的に有意に短い OS を認めた。

次に FPKM 値の中央値を用いて、発現量により高発現群 472 例と低発現群 472 例に割り付けた。Kaplan-Meier 法による解析を行ったところ、ITGA11 高発現群は低発現群に比べて統計学的に有意に短い OS を認めた (図 12A、Log Rank test, P = 0.032)。I 期非小細胞肺癌 510 例を、高発現群 255 例、低発現群 255 例に割り付け、Kaplan-Meier 法による解析を行ったところ、ITGA11 高発現群は低発現群に比べて OS が短い傾向であったが、統計学的な有意差を認めなかった (図 12B、Log Rank test, P = 0.085)。

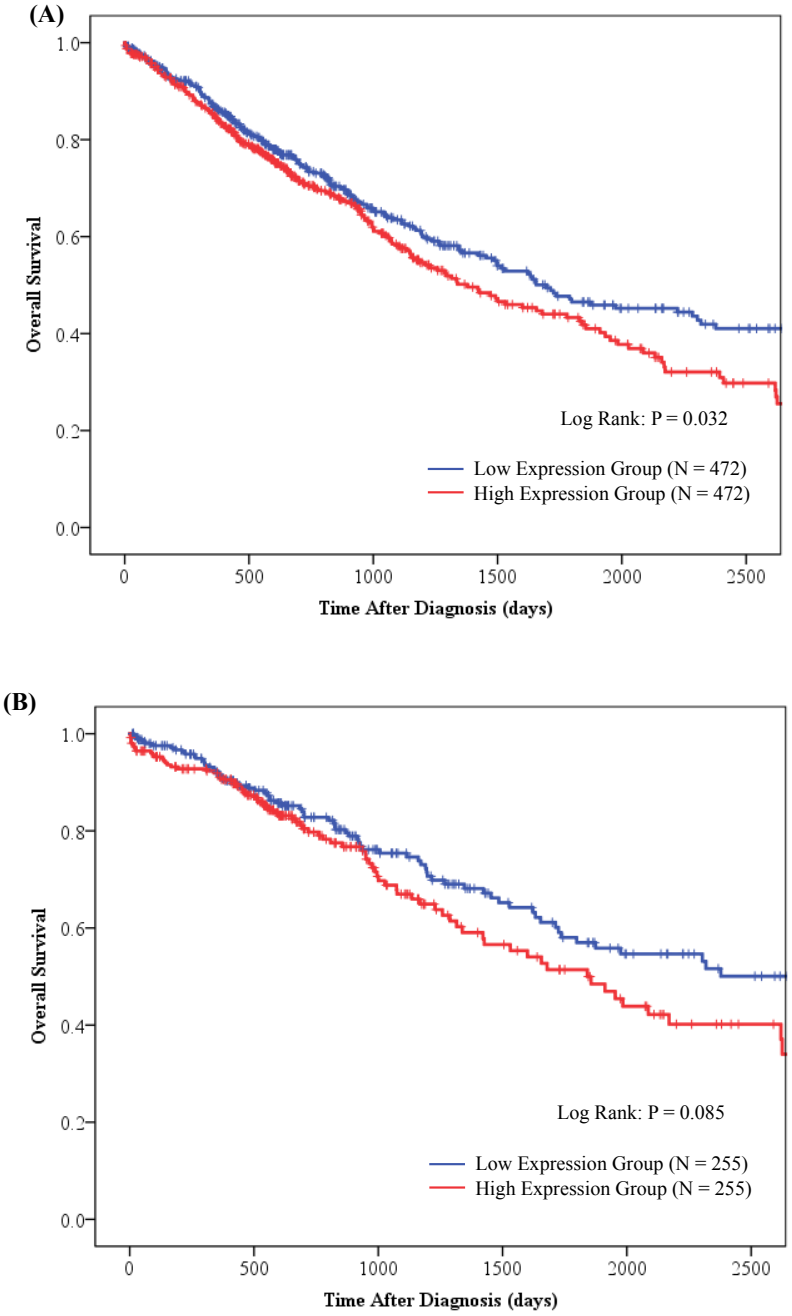

図 12. 中央値で分類した The Cancer Genome Atlas database における Integrin α11 の発現量と Overall Survival

(A) 全症例 (N = 994)、(B) I 期症例 (N = 510)。全症例において、ITGA11 高発現群は低発現群に比べて統計学的に有意に短い OS を認めたが、I 期症例では ITGA11 高発現群は低発現群に比べて OS が短い傾向であるものの統計学的な有意差を認めなかった。

4. 細胞株の機能解析

4-1. ITGA11 強制発現細胞の作成

肺腺癌細胞株 H23、H441 にレンチウイルスベクターを用いて ITGA11 を強制発現した細胞株から total RNA を抽出し、cDNA を合成後リアルタイム PCR を行い、ITGA11 の mRNA 発現量を定量した (図 13)。両細胞株においてコントロールの細胞と比較して ITGA11 強制発現細胞で発現量が上昇していることを確認した (H23: P < 0.001, H441: P = 0.001)。

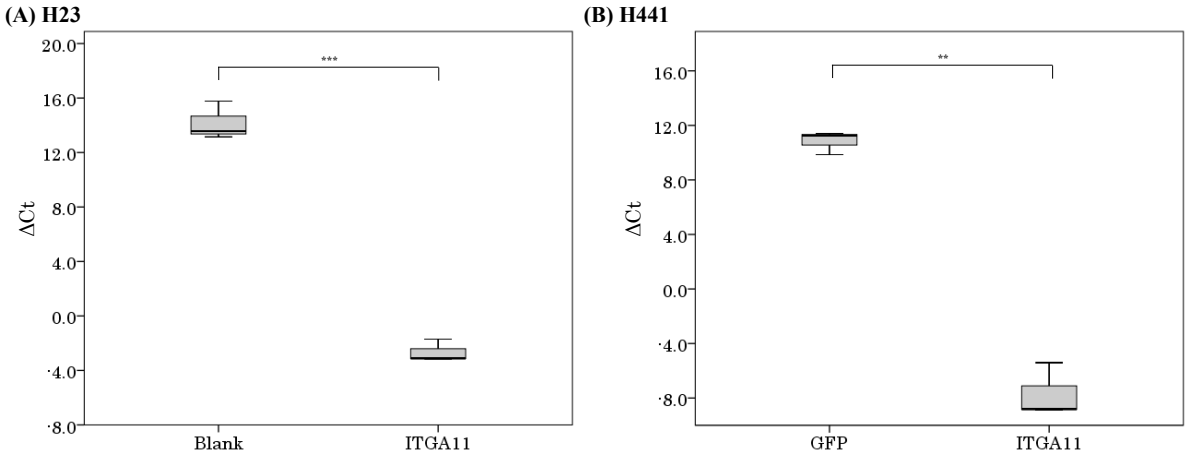

図 13. Integrin α11 強制発現細胞とコントロール細胞の ITGA11 発現量
(A) H23 細胞、(B) H441 細胞における ITGA11 mRNA 発現量。BOX は Interquartile Range (IQR) 、Whisker は 75 パーセンタイル + 1.5 * IQR もしくは、25 パーセンタイル - 1.5 * IQR を表す。N = 3。**P < 0.01; ***P < 0.001。

4-2. ITGA11 強制発現細胞における細胞形態

ITGA11 強制発現することによって細胞の形態学的変化は認めなかった。細胞の面積を測定したところ、コントロールに比べて ITGA11 の強制発現により、コラーゲンコートの有無に関わらず、細胞の面積が大きくなる傾向を認めた (図 14, None: $P = 0.028$, Collagen: $P = 0.001$)。ITGA11 発現量による細胞面積の影響を検討するために分散分析をおこなったところ、ITGA11 発現量、コラーゲンコートによる細胞面積への影響は有意であった ($F(3, 8) = 83.937$, $P < 0.001$)。Tukey を用いた多重比較では、コラーゲンコートの有無の条件下で ITGA11 強制発現とコントロールの間に有意差があり、ITGA11 強制発現により細胞の面積が大きくなると考えられた (Blank: $P = 0.028$, ITGA11: $P = 0.001$)。

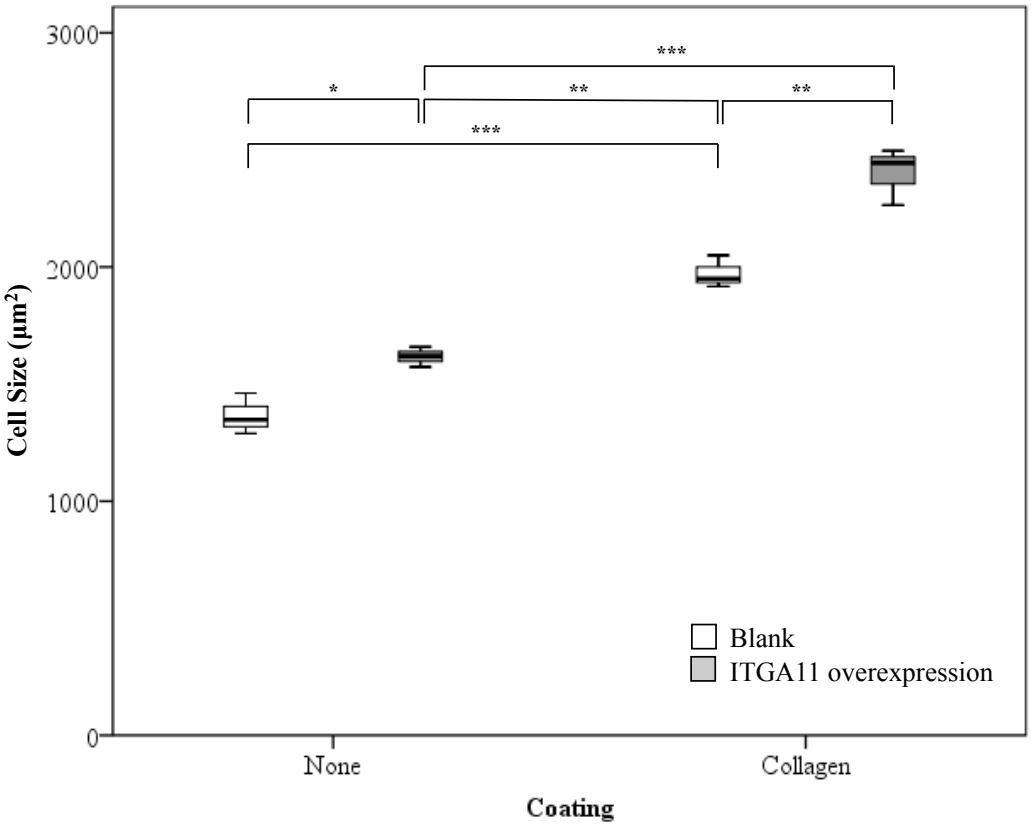

図 14. Integrin α11 強制発現細胞とコントロール細胞の面積の比較
縦軸は細胞面積、横軸は培養プレートのコラーゲンコートの有無を表す。コラーゲンコートの有無に関わらず、ITGA11 強制発現 H23 細胞でコントロールの H23 細胞に比べて統計学的に有意に細胞面積が大きくなる傾向を認めた。BOX は Interquartile Range (IQR) 、Whisker は 75 パーセンタイル + 1.5 * IQR もしくは、25 パーセンタイル - 1.5 * IQR を表す。N = 3。*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001。

4-3. ITGA11 強制発現細胞における上皮間葉転換関連遺伝子の変化

ITGA11 強制発現することによって TGF-β シグナル、上皮間葉転換関連の遺伝子が変化するか調べるために、TGF-β シグナル関連遺伝子および上皮間葉転換関連遺伝子の mRNA 発現量を定量した。コラーゲンコートプレート上での各細胞の遺伝子発現量を図 13、図 14 に示す。H23 細胞、および H441 細胞において、ITGA11 の強制発現を行なってもコントロールと比べて TGF-β シグナル関連遺伝子、上皮間葉転換関連遺伝子に有意な変化は認めなかった (図 15、図 16)。プラスチックプレート上での各遺伝子の発現量についても ITGA11 強制発現による有意な変化は認めなかった。

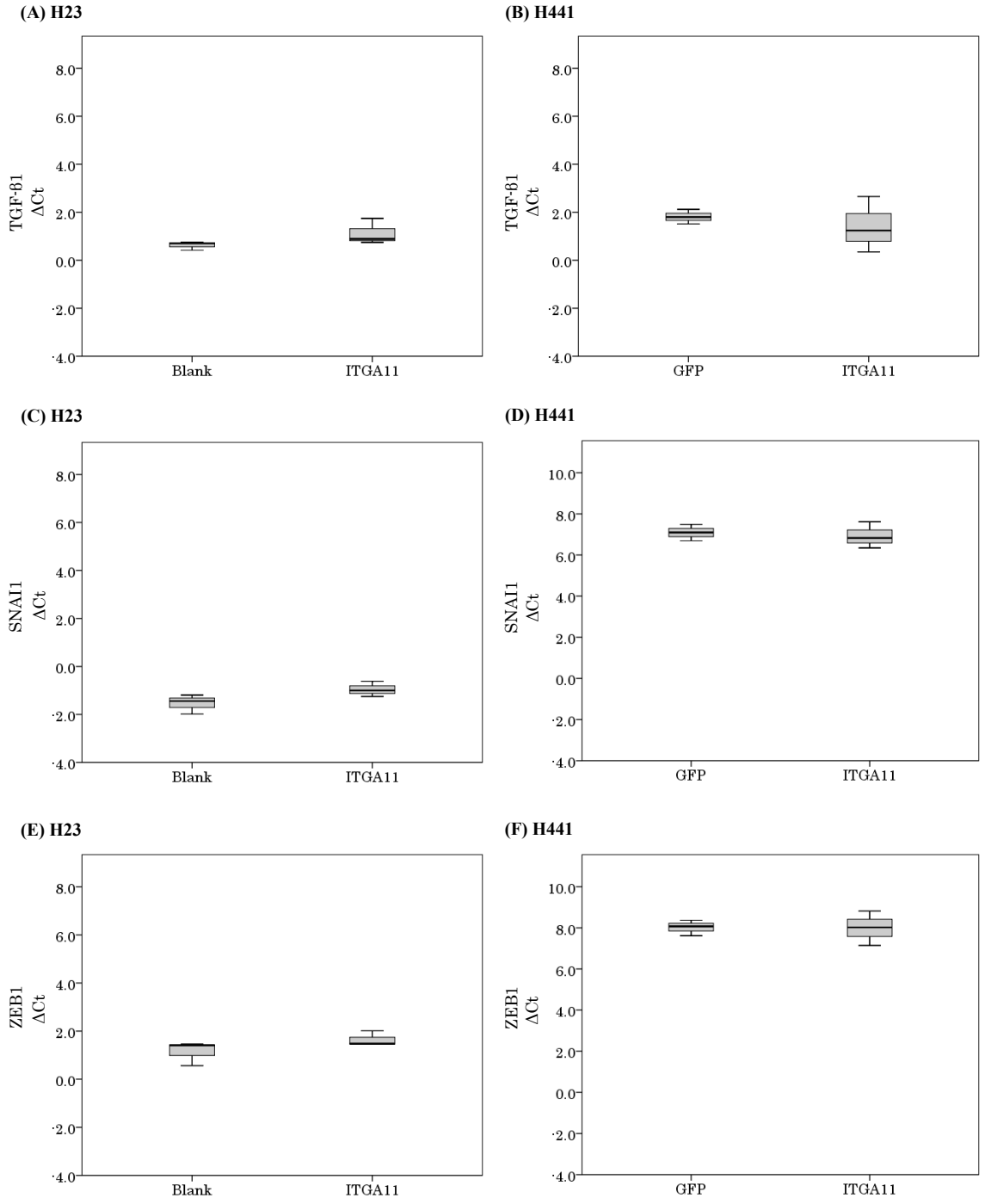

図 15. Integrin α11 強制発現による TGF-β シグナル関連遺伝子発現量
(A)、(C)、(E) H23 細胞、(B)、(D)、(F) H441 細胞におけるコラーゲンコートプレート上での各遺伝子の mRNA 発現量。ITGA11 強制発現によって各遺伝子の発現量の有意な変化は認めなかった。BOX は Interquartile Range (IQR) 、Whisker は 75 パーセンタイル + 1.5 * IQR もしくは、25 パーセンタイル - 1.5 * IQR を表す。N = 3。

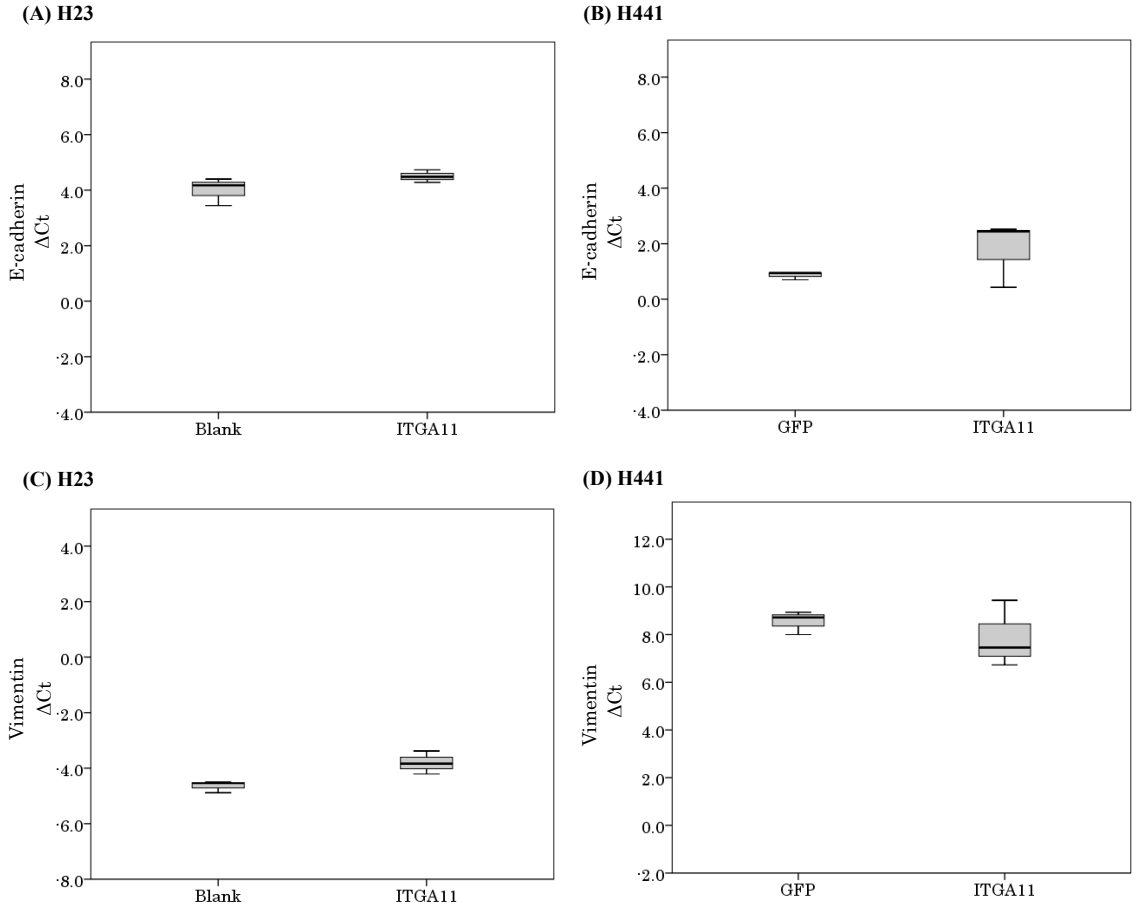

図 16. Integrin α11 強制発現による EMT 関連遺伝子発現量
(A)、(C) H23 細胞、(B)、(D) H441 細胞におけるコラーゲンコートプレート上での各遺伝子の mRNA 発現量。ITGA11 強制発現によって EMT 関連遺伝子についても有意な変化は認めなかった。BOX は Interquartile Range (IQR) 、Whisker は 75 パーセンタイル + 1.5 * IQR もしくは、25 パーセンタイル - 1.5 * IQR を表す。N = 3。

4-4. ITGA11 強制発現株における細胞増殖能

細胞増殖能について検討するために、ITGA11 強制発現細胞とコントロールの細胞を用いて、CCK-8 assay、Cell Counter による細胞数測定を行なった。CCK-8 assay において、ITGA11 発現量による細胞増殖の影響を検討するために分散分析をおこなったところ有意差を認めなかった (図 17A・B、H23: $F(3, 106) = 0.961$, $P = 0.414$, H441: $F(3, 106) = 1.004$, $P = 0.394$)。Cell Counter による細胞数測定でも同様に分散分析を行ったが有意差は認めておらず (図 17C・D、H23: $F(3, 44) = 0.081$, $P = 0.970$, H441: $F(3, 44) = 0.060$, $P = 0.981$)、ITGA11 の強制発現は細胞増殖能に影響を与えないと考えられた。

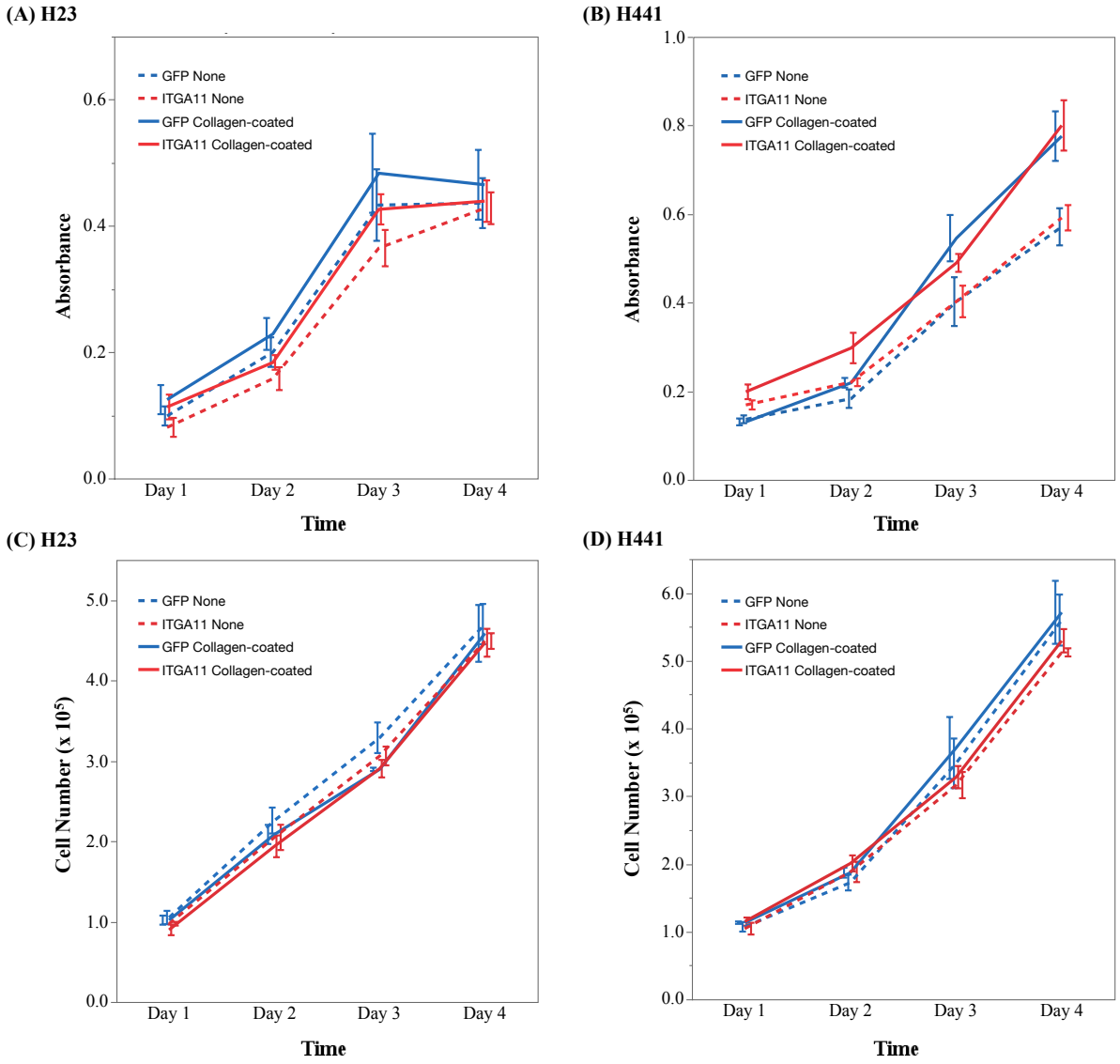

図 17. Cell counting kit-8 を用いた細胞増殖アッセイ
(A) H23 細胞、(B) H441 細胞の Cell counting kit-8 アッセイ、および、(C) H23 細胞、(D) H441 細胞の Cell counter による細胞増殖アッセイ。縦軸は吸光度もしくは細胞数、横軸は時間を表す。実線はコラーゲンコートしたプレート上、破線はプラスチックプレート上での培養を表す。データは平均値 ± 標準誤差で示した。Cell counting kit-8 アッセイ、N = 5。Cell Counter による細胞増殖アッセイ、N = 3。

4-5. ITGA11 強制発現株における細胞遊走能

次に ITGA11 強制発現細胞とコントロールの細胞を用いて、wound healing assay により細胞遊走能を評価した。ITGA11 発現量による細胞遊走能への影響を検討するために分散分析をおこなったところ、ITGA11 発現量とコラーゲンコートによる細胞遊走能への影響は有意であった (H23: $F(3, 12) = 41.536$, $P < 0.001$, H441: $F(3, 24) = 7.075$, $P = 0.001$)。Tukey を用いた多重比較では、コラーゲンコートしていないプラスチックプレート上で細胞遊走能は H23 細胞、および H441 細胞で ITGA11 発現量による有意な差は認めなかった (図 18, H23: $P = 0.997$, H441: $P = 0.066$)。しかし、コラーゲンコートしたプレート上で評価すると、両細胞株で ITGA11 強制発現細胞はコントロールの細胞に比べて有意に遊走能が高くなっていた (H23: $P = 0.012$, H441: $P = 0.018$)。

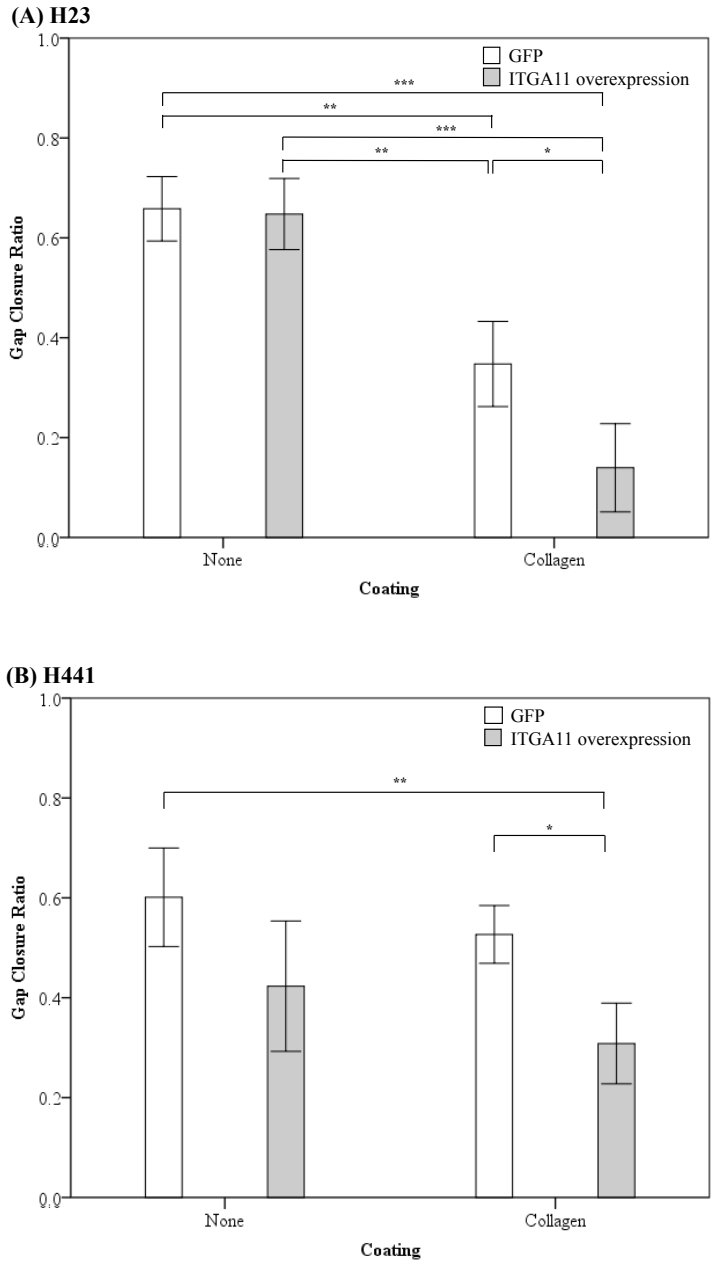

図 18. Wound healing assay による細胞遊走能の評価
(A) H23 細胞、(B) H441 細胞の細胞遊走能。縦軸は Gap closure rate、横軸は培養プレートのコラーゲンコートの有無を表す。両細胞で ITGA11 強制発現細胞とコントロールの細胞を比較すると、プラスチックプレート上では細胞遊走能に有意な差は認めなかったが、コラーゲンコートしたプレート上では ITGA11 強制発現細胞の遊走能が有意に高かった。データは平均値 ± 標準誤差で示した。A; N = 4、B; N = 7。*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001。

4-6. ITGA11 強制発現株における細胞浸潤能

最後に、ITGA11 強制発現 H23 細胞とコントロールの H23 細胞を用いて細胞浸潤能を評価した。ITGA11 強制発現細胞とコントロールの細胞について、細胞浸潤した細胞と細胞遊走した細胞の比を測定したところ、ITGA11 強制発現細胞はコントロールの細胞に比べて有意に浸潤能が高くなっていた (図 19, P = 0.047)。

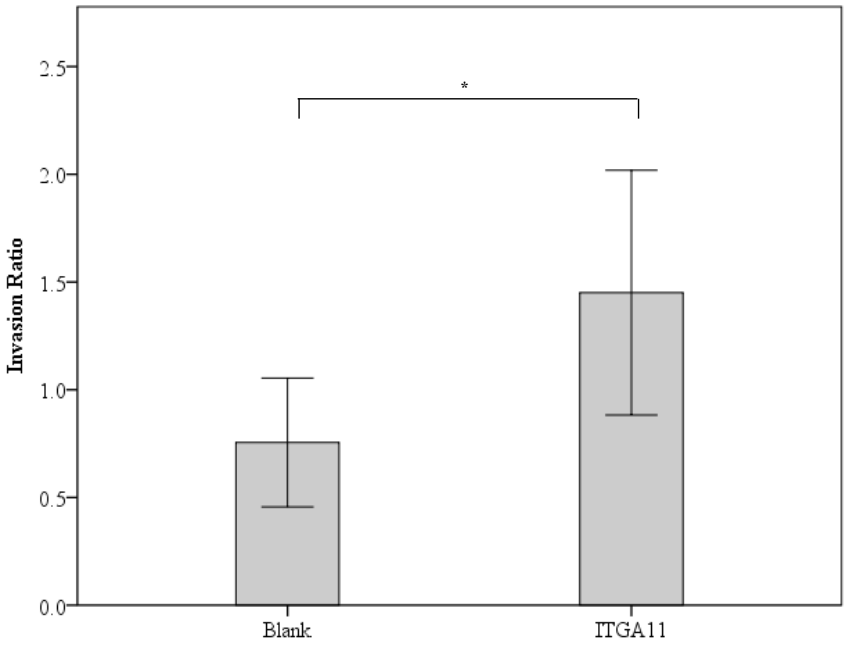

図 19. Invasion assay による細胞浸潤能の評価
縦軸の Invasion ratio はコラーゲンフィルターを浸潤した細胞数とプラスチックフィルターを遊走した細胞数の比を表す。ITGA11 強制発現細胞とコントロールの細胞を比較すると、ITGA11 強制発現細胞の浸潤能は有意に高かった。データは平均値 ± 標準誤差で示した。N = 10。*P < 0.05。

考察

1. 本研究の意義

本研究でITGA11と非小細胞肺癌の術後予後について検討した。我々は、当院における非小細胞肺癌の手術検体を用いて、ITGA11 のリアルタイム PCR による発現測定と肺腺癌の術後予後との関係について評価を行い、ITGA11 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 から得られた RNA sequencing の結果を用いた *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ITGA11強制発現により細胞遊走能と浸潤能が亢進することが示された。以上より、非小細胞肺癌の ITGA11 高発現は細胞遊走と浸潤をしやすくさせることで、術後再発に関連していると考えた。癌細胞そのものにおけるITGA11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。

2. 本研究結果と臨床との関連

Integrin は肺癌に限らず各種癌腫の腫瘍の進展、転移に重要な機能をもつ。癌細胞における異常な Integrin 発現が癌細胞周囲の微小環境への細胞接着を変化させ、癌進展を促進させると考えられる [59]。過去の研究では Integrin α2β1 の発現が胃癌細

胞、膵癌細胞において、コラーゲン基質上で細胞の遊走能と増殖能の上昇に関係していた [73, 74]。また、ITGA11 は転移性悪性黒色腫に発現していることが知られており、Integrin α1、α2、α11 などのコラーゲン受容体の発現が予後の悪化と関連していた [75]。本研究では非小細胞肺癌において原発巣での ITGA11 の発現が予後の悪化と関連することを我々の施設の臨床検体と TCGA database を用いて示した。さらに、I 期の症例についても ITGA11 の高発現が予後に関連していることも証明した。これらの結果から、ITGA11 は非小細胞肺癌の術後の予後予測マーカーになりうると考えられた。肺癌においては根治手術後に補助化学療法を追加することで再発率と予後が改善することが知られているが [76, 77]、どのような症例で行うべきかコンセンサスはない。現在、根治的手術後の再発を予測する因子は病理学的病期という形態学的なもので評価されており、分子生物学的なバイオマーカーが発見されることで術後化学療法を追加する症例を適切に選択できる可能性がある。

3. Integrin α11 の機能

Integrin α11 は間葉系細胞において、細胞進展、細胞遊走やコラーゲン基質のリモデリングに関連する [60, 78]。線維芽細胞で ITGA11 を欠失させるとコラーゲン基質上の細胞接着能や細胞の伸展が抑制されると報告されており、本研究において ITGA11 強制発現細胞で細胞の面積が大きくなる結果は妥当と考えられた。また、myofibroblasts において ITGA11 をノックダウンさせると、TGF-β によって誘導され

る分化マーカーである α-smooth muscle actin (α-SMA) や Collagen I の発現が抑制され、細胞遊走能が低下されることが示されている [62]。膵癌においては CAFs で ITGA11 が発現しており、CAFs の前駆細胞と考えられている Pancreatic stellate cells で ITGA11 のノックダウンすることによって遊走能が低下したと報告されている [79]。さらに、CAFs における ITGA11 の発現は腫瘍間質のコラーゲンの硬度に影響を与えることで、非小細胞肺癌の進展を促進すると報告されている [66]。腫瘍細胞そのものにおける ITGA11 の発現についてはほとんど報告されてなかったが、Westcott らにより ITGA11 が乳癌の collective invasion に関連する重要な浸潤促進遺伝子であると報告されており、癌細胞そのものにおける ITGA11 発現が癌の進展に関与する可能性が示唆された [80]。本研究では肺癌細胞株において ITGA11 の発現によって形態学的な変化や細胞増殖能に影響がない一方で、他の Integrin と同様にコラーゲン基質上で細胞遊走能と浸潤能の上昇を認めた [73, 74]。TGF シグナルと EMT に関連する遺伝子の発現について検討したところ、ITGA11 の強制発現細胞とコントロール細胞において、EMT 関連転写因子である、SNAI1、ZEB1 の発現や E-cadherin、Vimentin などの発現は変化していなかった。そのため、ITGA11 の発現は EMT を誘導するのではなく ECM への細胞接着能の変化やコラーゲンのリモデリングなどの機序により、細胞遊走や浸潤に関連していると考えられた。

4. 臨床病理所見との関係

本研究では *in vitro* の実験において、ITGA11 の強制発現することによって細胞遊走能、浸潤能の上昇を認めたにも関わらず、臨床検体における ITGA11 の発現量と血管浸潤、リンパ管浸潤に関しては統計学的な有意差を認めなかった。腫瘍細胞が血管内への浸潤 (Intravasation) するためには、腫瘍細胞が原発巣から離れて細胞外基質を浸潤し、その後血管内皮細胞のタイトジャンクションを通過するという複数のプロセスを経る必要がある [81, 82]。血管内皮細胞のタイトジャンクションを通過するためには、腫瘍細胞と血管内皮細胞の相互作用によるタイトジャンクションの調整を必要とする [83, 84]。過去の報告では腫瘍から分泌される matrix metalloproteinase 1 (MMP-1) が endothelial proteinase-activated receptor 1 (PAR1) を活性化し、内皮細胞の通過性を調節しており、血管への intravasation が起こりやすくなるとされている [85]。今回の研究の結果からは ITGA11 の発現のみでは血管浸潤やリンパ管浸潤を起こすのは不十分であり、他の複合的要因が加わることによって血管浸潤やリンパ管浸潤が生じる可能性が示唆された。

5. 研究の限界と今後の発展の方向性

本研究ではいくつかの Limitation が考えられる。1 つ目は、本研究の臨床検体は非小細胞肺癌患者のうちでも切除可能であった症例なので、大部分が I 期、II 期の症例である。進行肺癌の症例数が少ないため、本研究の結果を非小細胞肺癌全症例

に一般化することは難しい。2 つ目の問題点として、ITGA11 の発現量と RFS について後ろ向きに解析した研究である。3 つ目に、ITGA11 の発現によって細胞株における遊走能、浸潤能が上昇したが、病理学的に脈管浸潤に差を認めなかった結果から、臨床検体の解析において検出力の不足があった可能性がある。4 つ目に、本研究では ROC 曲線を用いたカットオフ値により RFS および OS について検討した。臨床検体、TCGA データベースにおいて、中央値で分けた場合には一部有意差を認めないデータがあった。ROC 曲線によりカットオフ値を設定することにより、予測の精度を過大評価している可能性がある。5 つ目の問題点は肺癌切除例の臨床検体を用いた研究ということである。切除検体を用いているため腫瘍組織片は純粋な肺癌細胞のみではなく、線維芽細胞や血球細胞などの正常細胞も含まれる heterogeneous な細胞集団である。そのため、本研究で抽出した RNA は組織全体での平均の発現量を比較しているに過ぎない。本研究の妥当性を示すためには肺癌組織における ITGA11 の発現について検討する必要があったが、適切な抗体が見つからなかったことから免疫染色などによる ITGA11 発現の局在について検証が不十分になってしまった。最後に、本研究では *in vivo* の研究を行なっていないことが限界として挙げられる。

今後の研究の方向性としては、本研究は強制発現系のみの検討であったため siRNA や CRISPR-Cas9 などの手法を用いて抑制系を樹立し細胞遊走能が抑制されるか検討が必要であろう。また、本研究は mRNA レベルでの検討であり、タンパク発

現についても検討する必要がある。抗体については製造されているもので肺癌組織の免疫染色を試みたが特異的な染色が困難であった。今後、適切な抗体を入手できれば、高発現症例での免疫染色を検討したい。また、肺癌組織における発現の局在を検討するために in situ hybridization や laser microdissection による検証も考えられた。さらに、xenograft model の作成により生体内での機能解析についても検討すべきだと考える。ITGA11 の腫瘍に関する機序を解明することは、肺癌の理解の一端が深まることに加えて、ITGA11 の発現上昇のある肺癌症例において、新たな治療の開発につながる可能性があると考えられる。

結語

ヒト肺癌手術症例において Integrin α11 の高発現症例では術後再発が多く、その機序として肺癌細胞における Integrin α11 の発現が遊走能・浸潤能を上昇させることによると考えられる。

謝辞

本研究にあたり、多大なる御高配と御指導、御鞭撻を賜りました、東京大学大学院医学系研究科器官病態内科学講座呼吸器内科学 長瀬隆英 教授に深く感謝いたします。また、本研究全般にわたり直接の御指導、御鞭撻を頂きました、東京大学大学院医学系研究科器官病態内科学講座呼吸器内科学 鹿毛秀宣 講師に深く感謝いたします。最後に、本研究に数々の御助言、御協力を賜りました東京大学医学部附属病院呼吸器内科 305 研究室の諸氏に深く御礼申し上げます。

本研究の成果は、Cancer Science（2020 年 1 月号）に掲載された。

引用文献

1. Walters S, Maringe C, Coleman MP, Peake MD, Butler J, Young N, Bergstrom S, Hanna L, Jakobsen E, Kolbeck K, Sundstrom S, Engholm G, Gavin A, Gjerstorff ML, Hatcher J, Johannesen TB, Linklater KM, McGahan CE, Steward J, Tracey E, Turner D, Richards MA, Rachet B, Group IMW. Lung cancer survival and stage at diagnosis in Australia, Canada, Denmark, Norway, Sweden and the UK: a population-based study, 2004-2007. Thorax. 68: 551-564; 2013.

2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 68: 394-424; 2018.

3. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. N Engl J Med. 359: 1367-1380; 2008.

4. Little AG, Gay EG, Gaspar LE, Stewart AK. National survey of non-small cell lung cancer in the United States: epidemiology, pathology and patterns of care. Lung Cancer. 57: 253-260; 2007.

5. Matsuda A, Matsuda T, Shibata A, Katanoda K, Sobue T, Nishimoto H, Japan Cancer Surveillance Research G. Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2008: a study of 25 population-based cancer registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) project. Jpn J Clin Oncol. 44: 388-396; 2014.

6. Howlader NN, A.M.; Krapcho, M.; Miller, D.; Brest, A.; Yu, M.; Ruhl, J.; Tatalovich, Z.; Mariotto, A.; Lewis, D.R.; Chen, H.S.; Feuer, E.J.; Cronin, K.A. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016, National Cancer Institute. Bethesda, MD. 2019.

7. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. Cancer Res. 64: 8919-8923; 2004.

8. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Bando M, Ohno S, Ishikawa Y, Aburatani H, Niki T, Sohara Y, Sugiyama Y, Mano H. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. Nature. 448: 561-566; 2007.

9. Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, Nardone J, Lee K, Reeves C, Li Y, Hu Y, Tan Z, Stokes M, Sullivan L, Mitchell J, Wetzel R, Macneill J, Ren JM, Yuan J, Bakalarski CE, Villen J, Kornhauser JM, Smith B, Li D, Zhou X, Gygi SP, Gu TL, Polakiewicz RD, Rush J, Comb MJ. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. Cell. 131: 1190-1203; 2007.

10. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature. 417: 949-954; 2002.

11. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, Seto T, Satouchi M, Tada H, Hirashima T, Asami K, Katakami N, Takada M, Yoshioka H, Shibata K, Kudoh S, Shimizu E, Saito H, Toyooka S, Nakagawa K, Fukuoka M, West Japan Oncology G. Gefitinib

versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol. 11: 121-128; 2010.

12. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, Palmero R, Garcia-Gomez R, Pallares C, Sanchez JM, Porta R, Cobo M, Garrido P, Longo F, Moran T, Insa A, De Marinis F, Corre R, Bover I, Illiano A, Dansin E, de Castro J, Milella M, Reguart N, Altavilla G, Jimenez U, Provencio M, Moreno MA, Terrasa J, Munoz-Langa J, Valdivia J, Isla D, Domine M, Molinier O, Mazieres J, Baize N, Garcia-Campelo R, Robinet G, Rodriguez-Abreu D, Lopez-Vivanco G, Gebbia V, Ferrera-Delgado L, Bombaron P, Bernabe R, Bearz A, Artal A, Cortesi E, Rolfo C, Sanchez-Ronco M, Drozdowskyj A, Queralt C, de Aguirre I, Ramirez JL, Sanchez JJ, Molina MA, Taron M, Paz-Ares L, Spanish Lung Cancer Group in collaboration with Groupe Francais de P-C, Associazione Italiana Oncologia T. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol. 13: 239-246; 2012.

13. Peters S, Camidge DR, Shaw AT, Gadgeel S, Ahn JS, Kim DW, Ou SI, Perol M, Dziadziuszko R, Rosell R, Zeaiter A, Mitry E, Golding S, Balas B, Noe J, Morcos PN, Mok T, Investigators AT. Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 377: 829-838; 2017.

14. Shaw AT, Solomon BJ. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. N Engl J Med. 372: 683-684; 2015.

15. Planchard D, Besse B, Groen HJM, Souquet PJ, Quoix E, Baik CS, Barlesi F, Kim TM, Mazieres J, Novello S, Rigas JR, Upalawanna A, D'Amelio AM, Jr., Zhang P, Mookerjee B,

Johnson BE. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. Lancet Oncol. 17: 984-993; 2016.

16. Kohno T, Tsuta K, Tsuchihara K, Nakaoku T, Yoh K, Goto K. RET fusion gene: translation to personalized lung cancer therapy. Cancer Sci. 104: 1396-1400; 2013.

17. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. 12: 252-264; 2012.

18. Gubin MM, Zhang X, Schuster H, Caron E, Ward JP, Noguchi T, Ivanova Y, Hundal J, Arthur CD, Krebber WJ, Mulder GE, Toebes M, Vesely MD, Lam SS, Korman AJ, Allison JP, Freeman GJ, Sharpe AH, Pearce EL, Schumacher TN, Aebersold R, Rammensee HG, Melief CJ, Mardis ER, Gillanders WE, Artyomov MN, Schreiber RD. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. Nature. 515: 577-581; 2014.

19. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN, Kohrt HE, Horn L, Lawrence DP, Rost S, Leabman M, Xiao Y, Mokatrin A, Koeppen H, Hegde PS, Mellman I, Chen DS, Hodi FS. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. Nature. 515: 563-567; 2014.

20. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, Chow LQ, Vokes EE, Felip E, Holgado E, Barlesi F, Kohlhaufl M, Arrieta O, Burgio MA, Fayette J, Lena H, Poddubskaya E, Gerber DE, Gettinger SN, Rudin CM, Rizvi N, Crino L, Blumenschein GR, Jr., Antonia SJ, Dorange C, Harbison CT, Graf Finckenstein F, Brahmer JR. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 373: 1627-1639; 2015.

21. Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Perez-Gracia JL, Han JY, Molina J, Kim JH, Arvis CD, Ahn MJ, Majem M, Fidler MJ, de Castro G, Jr., Garrido M, Lubiniecki GM, Shentu Y, Im E, Dolled-Filhart M, Garon EB. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. Lancet. 387: 1540-1550; 2016.

22. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbe C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N Engl J Med. 363: 711-723; 2010.

23. Hanna N, Johnson D, Temin S, Baker S, Jr., Brahmer J, Ellis PM, Giaccone G, Hesketh PJ, Jaiyesimi I, Leighl NB, Riely GJ, Schiller JH, Schneider BJ, Smith TJ, Tashbar J, Biermann WA, Masters G. Systemic Therapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. J Clin Oncol. 35: 3484-3515; 2017.

24. Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrin ligands at a glance. J Cell Sci. 119: 3901-3903; 2006.

25. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. Cell Tissue Res. 339: 269-280; 2010.

26. Campbell ID, Humphries MJ. Integrin structure, activation, and interactions. Cold Spring Harb Perspect Biol. 3; 2011.

27. Sheppard D. Epithelial integrins. Bioessays. 18: 655-660; 1996.

28. Chapman HA, Li X, Alexander JP, Brumwell A, Lorizio W, Tan K, Sonnenberg A, Wei Y, Vu TH. Integrin alpha6beta4 identifies an adult distal lung epithelial population with regenerative potential in mice. J Clin Invest. 121: 2855-2862; 2011.

29. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell. 110: 673-687; 2002.

30. Cooper J, Giancotti FG. Integrin Signaling in Cancer: Mechanotransduction, Stemness, Epithelial Plasticity, and Therapeutic Resistance. Cancer Cell. 35: 347-367; 2019.

31. Wang S, Basson MD. Integrin-linked kinase: a multi-functional regulator modulating extracellular pressure-stimulated cancer cell adhesion through focal adhesion kinase and AKT. Cell Oncol. 31: 273-289; 2009.

32. Sahai E. Illuminating the metastatic process. Nat Rev Cancer. 7: 737-749; 2007.

33. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nat Rev Cancer. 2: 442-454; 2002.

34. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest. 119: 1420-1428; 2009.

35. Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. J Clin Invest. 119: 1438-1449; 2009.

36. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. Nat Rev Mol Cell Biol. 15: 178-196; 2014.

37. Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong ST, Choi H, El Rayes T, Ryu S, Troeger J, Schwabe RF, Vahdat LT, Altorki NK, Mittal V, Gao D. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. Nature. 527: 472-476; 2015.

38. Margadant C, Sonnenberg A. Integrin-TGF-beta crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. EMBO Rep. 11: 97-105; 2010.

39. Hamidi H, Ivaska J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. Nat Rev Cancer. 18: 533-548; 2018.

40. Truong HH, Xiong J, Ghotra VP, Nirmala E, Haazen L, Le Devedec SE, Balcioglu HE, He S, Snaar-Jagalska BE, Vreugdenhil E, Meerman JH, van de Water B, Danen EH. beta1 integrin inhibition elicits a prometastatic switch through the TGFbeta-miR-200-ZEB network in E-cadherin-positive triple-negative breast cancer. Sci Signal. 7: ra15; 2014.

41. Annes JP, Chen Y, Munger JS, Rifkin DB. Integrin alphaVbeta6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1. J Cell Biol. 165: 723-734; 2004.

42. Adachi M, Taki T, Higashiyama M, Kohno N, Inufusa H, Miyake M. Significance of integrin alpha5 gene expression as a prognostic factor in node-negative non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 6: 96-101; 2000.

43. Roman J, Ritzenthaler JD, Roser-Page S, Sun X, Han S. alpha5beta1-integrin expression is essential for tumor progression in experimental lung cancer. Am J Respir Cell Mol Biol. 43: 684-691; 2010.

44. Kramer RH, Vu MP, Cheng YF, Ramos DM, Timpl R, Waleh N. Laminin-binding integrin alpha 7 beta 1: functional characterization and expression in normal and malignant melanocytes. Cell Regul. 2: 805-817; 1991.

45. Plantefaber LC, Hynes RO. Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells. Cell. 56: 281-290; 1989.

46. Yan P, Zhu H, Yin L, Wang L, Xie P, Ye J, Jiang X, He X. Integrin alphavbeta6 Promotes Lung Cancer Proliferation and Metastasis through Upregulation of IL-8-Mediated MAPK/ERK Signaling. Transl Oncol. 11: 619-627; 2018.

47. Diaz LK, Cristofanilli M, Zhou X, Welch KL, Smith TL, Yang Y, Sneige N, Sahin AA, Gilcrease MZ. Beta4 integrin subunit gene expression correlates with tumor size and nuclear grade in early breast cancer. Mod Pathol. 18: 1165-1175; 2005.

48. Friedrichs K, Ruiz P, Franke F, Gille I, Terpe HJ, Imhof BA. High expression level of alpha 6 integrin in human breast carcinoma is correlated with reduced survival. Cancer Res. 55: 901-906; 1995.

49. Liapis H, Flath A, Kitazawa S. Integrin alpha V beta 3 expression by bone-residing breast cancer metastases. Diagn Mol Pathol. 5: 127-135; 1996.

50. Ross MH, Esser AK, Fox GC, Schmieder AH, Yang X, Hu G, Pan D, Su X, Xu Y, Novack DV, Walsh T, Colditz GA, Lukaszewicz GH, Cordell E, Novack J, Fitzpatrick JAJ, Waning DL, Mohammad KS, Guise TA, Lanza GM, Weilbaecher KN. Bone-Induced Expression of Integrin beta3 Enables Targeted Nanotherapy of Breast Cancer Metastases. Cancer Res. 77: 6299-6312; 2017.

51. Danen EH, Ten Berge PJ, Van Muijen GN, Van 't Hof-Grootenboer AE, Brocker EB, Ruiter DJ. Emergence of alpha 5 beta 1 fibronectin- and alpha v beta 3 vitronectin-receptor expression in melanocytic tumour progression. Histopathology. 24: 249-256; 1994.

52. Moretti S, Martini L, Berti E, Pinzi C, Giannotti B. Adhesion molecule profile and malignancy of melanocytic lesions. Melanoma Res. 3: 235-239; 1993.

53. Danen EH, Jansen KF, Van Kraats AA, Cornelissen IM, Ruiter DJ, Van Muijen GN. Alpha v-integrins in human melanoma: gain of alpha v beta 3 and loss of alpha v beta 5 are related to

tumor progression in situ but not to metastatic capacity of cell lines in nude mice. Int J Cancer. 61: 491-496; 1995.

54. Slack-Davis JK, Atkins KA, Harrer C, Hershey ED, Conaway M. Vascular cell adhesion molecule-1 is a regulator of ovarian cancer peritoneal metastasis. Cancer Res. 69: 1469-1476; 2009.

55. Li Q, Liu S, Lin B, Yan L, Wang Y, Wang C, Zhang S. Expression and correlation of Lewis y antigen and integrins alpha5 and beta1 in ovarian serous and mucinous carcinoma. Int J Gynecol Cancer. 20: 1482-1489; 2010.

56. De S, Chen J, Narizhneva NV, Heston W, Brainard J, Sage EH, Byzova TV. Molecular pathway for cancer metastasis to bone. J Biol Chem. 278: 39044-39050; 2003.

57. Hosotani R, Kawaguchi M, Masui T, Koshiba T, Ida J, Fujimoto K, Wada M, Doi R, Imamura M. Expression of integrin alphaVbeta3 in pancreatic carcinoma: relation to MMP-2 activation and lymph node metastasis. Pancreas. 25: e30-35; 2002.

58. Bates RC, Bellovin DI, Brown C, Maynard E, Wu B, Kawakatsu H, Sheppard D, Oettgen P, Mercurio AM. Transcriptional activation of integrin beta6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. J Clin Invest. 115: 339-347; 2005.

59. Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. Nat Rev Cancer. 10: 9-22; 2010.

60. Popova SN, Rodriguez-Sanchez B, Liden A, Betsholtz C, Van Den Bos T, Gullberg D. The mesenchymal alpha11beta1 integrin attenuates PDGF-BB-stimulated chemotaxis of embryonic fibroblasts on collagens. Dev Biol. 270: 427-442; 2004.

61. Talior-Volodarsky I, Connelly KA, Arora PD, Gullberg D, McCulloch CA. alpha11 integrin stimulates myofibroblast differentiation in diabetic cardiomyopathy. Cardiovasc Res. 96: 265-275; 2012.

62. Bansal R, Nakagawa S, Yazdani S, van Baarlen J, Venkatesh A, Koh AP, Song WM, Goossens N, Watanabe H, Beasley MB, Powell CA, Storm G, Kaminski N, van Goor H, Friedman SL, Hoshida Y, Prakash J. Integrin alpha 11 in the regulation of the myofibroblast phenotype: implications for fibrotic diseases. Exp Mol Med. 49: e396; 2017.

63. Lu N, Carracedo S, Ranta J, Heuchel R, Soininen R, Gullberg D. The human alpha11 integrin promoter drives fibroblast-restricted expression in vivo and is regulated by TGF-beta1 in a Smad- and Sp1-dependent manner. Matrix Biol. 29: 166-176; 2010.

64. Carracedo S, Lu N, Popova SN, Jonsson R, Eckes B, Gullberg D. The fibroblast integrin alpha11beta1 is induced in a mechanosensitive manner involving activin A and regulates myofibroblast differentiation. J Biol Chem. 285: 10434-10445; 2010.

65. Fernando RI, Litzinger M, Trono P, Hamilton DH, Schlom J, Palena C. The T-box transcription factor Brachyury promotes epithelial-mesenchymal transition in human tumor cells. J Clin Invest. 120: 533-544; 2010.

66. Navab R, Strumpf D, To C, Pasko E, Kim KS, Park CJ, Hai J, Liu J, Jonkman J, Barczyk M, Bandarchi B, Wang YH, Venkat K, Ibrahimov E, Pham NA, Ng C, Radulovich N, Zhu CQ, Pintilie M, Wang D, Lu A, Jurisica I, Walker GC, Gullberg D, Tsao MS. Integrin alpha11beta1 regulates cancer stromal stiffness and promotes tumorigenicity and metastasis in non-small cell lung cancer. Oncogene. 35: 1899-1908; 2016.

67. Kuner R, Muley T, Meister M, Ruschhaupt M, Buness A, Xu EC, Schnabel P, Warth A, Poustka A, Sultmann H, Hoffmann H. Global gene expression analysis reveals specific patterns of cell junctions in non-small cell lung cancer subtypes. Lung Cancer. 63: 32-38; 2009.

68. Crouser ED, Culver DA, Knox KS, Julian MW, Shao G, Abraham S, Liyanarachchi S, Macre JE, Wewers MD, Gavrilin MA, Ross P, Abbas A, Eng C. Gene expression profiling identifies MMP-12 and ADAMDEC1 as potential pathogenic mediators of pulmonary sarcoidosis. American journal of respiratory and critical care medicine. 179: 929-938; 2009.

69. Meltzer EB, Barry WT, D'Amico TA, Davis RD, Lin SS, Onaitis MW, Morrison LD, Sporn TA, Steele MP, Noble PW. Bayesian probit regression model for the diagnosis of pulmonary fibrosis: proof-of-principle. BMC Med Genomics. 4: 70; 2011.

70. Bhattacharya S, Srisuma S, Demeo DL, Shapiro SD, Bueno R, Silverman EK, Reilly JJ, Mariani TJ. Molecular biomarkers for quantitative and discrete COPD phenotypes. Am J Respir Cell Mol Biol. 40: 359-367; 2009.

71. Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. BMC Mol Biol. 7: 33; 2006.

72. Groome PA, Bolejack V, Crowley JJ, Kennedy C, Krasnik M, Sobin LH, Goldstraw P, Committee IIS, Cancer R, Biostatistics, Observers to the C, Participating I. The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. J Thorac Oncol. 2: 694-705; 2007.

73. Li A, Zhou T, Guo L, Si J. Collagen type I regulates beta-catenin tyrosine phosphorylation and nuclear translocation to promote migration and proliferation of gastric carcinoma cells. Oncol Rep. 23: 1247-1255; 2010.

74. Grzesiak JJ, Bouvet M. The alpha2beta1 integrin mediates the malignant phenotype on type I collagen in pancreatic cancer cell lines. Br J Cancer. 94: 1311-1319; 2006.

75. Vuoristo M, Vihinen P, Vlaykova T, Nylund C, Heino J, Pyrhonen S. Increased gene expression levels of collagen receptor integrins are associated with decreased survival parameters in patients with advanced melanoma. Melanoma Res. 17: 215-223; 2007.

76. Kato H, Ichinose Y, Ohta M, Hata E, Tsubota N, Tada H, Watanabe Y, Wada H, Tsuboi M, Hamajima N, Ohta M, Japan Lung Cancer Research Group on Postsurgical Adjuvant C. A randomized trial of adjuvant chemotherapy with uracil-tegafur for adenocarcinoma of the lung. N Engl J Med. 350: 1713-1721; 2004.

77. Winton T, Livingston R, Johnson D, Rigas J, Johnston M, Butts C, Cormier Y, Goss G, Inculet R, Vallieres E, Fry W, Bethune D, Ayoub J, Ding K, Seymour L, Graham B, Tsao MS, Gandara D, Kesler K, Demmy T, Shepherd F, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials G, National Cancer Institute of the United States Intergroup JBRTI. Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. N Engl J Med. 352: 2589-2597; 2005.

78. Tiger CF, Fougerousse F, Grundstrom G, Velling T, Gullberg D. alpha11beta1 integrin is a receptor for interstitial collagens involved in cell migration and collagen reorganization on mesenchymal nonmuscle cells. Dev Biol. 237: 116-129; 2001.

79. Schnittert J, Bansal R, Mardhian DF, van Baarlen J, Ostman A, Prakash J. Integrin alpha11 in pancreatic stellate cells regulates tumor stroma interaction in pancreatic cancer. FASEB J. 33: 6609-6621; 2019.

80. Westcott JM, Prechtl AM, Maine EA, Dang TT, Esparza MA, Sun H, Zhou Y, Xie Y, Pearson GW. An epigenetically distinct breast cancer cell subpopulation promotes collective invasion. J Clin Invest. 125: 1927-1943; 2015.

81. Chiang SP, Cabrera RM, Segall JE. Tumor cell intravasation. Am J Physiol Cell Physiol. 311: C1-C14; 2016.

82. Han W, Chen S, Yuan W, Fan Q, Tian J, Wang X, Chen L, Zhang X, Wei W, Liu R, Qu J, Jiao Y, Austin RH, Liu L. Oriented collagen fibers direct tumor cell intravasation. Proc Natl Acad Sci U S A. 113: 11208-11213; 2016.

83. Zervantonakis IK, Hughes-Alford SK, Charest JL, Condeelis JS, Gertler FB, Kamm RD. Three-dimensional microfluidic model for tumor cell intravasation and endothelial barrier function. Proc Natl Acad Sci U S A. 109: 13515-13520; 2012.

84. Reymond N, d'Agua BB, Ridley AJ. Crossing the endothelial barrier during metastasis. Nat Rev Cancer. 13: 858-870; 2013.

85. Juncker-Jensen A, Deryugina EI, Rimann I, Zajac E, Kupriyanova TA, Engelholm LH, Quigley JP. Tumor MMP-1 activates endothelial PAR1 to facilitate vascular intravasation and metastatic dissemination. Cancer Res. 73: 4196-4211; 2013.