

博士論文

ヒト肺腺癌における

小胞体ストレス関連遺伝子発現と臨床病理学的検討

酒谷 俊雄

## 目次

略語表 .....	4
要旨 .....	6
目的 .....	7
序文	
1 肺癌治療の現状 .....	8
2 小胞体ストレスと小胞体ストレス応答 .....	9
3 小胞体ストレスと癌との関連 .....	16
4 肺癌における小胞体ストレス関連遺伝子発現 .....	19
方法	
1 肺癌手術検体 .....	21
2 標的遺伝子の決定 .....	22
3 遺伝子発現の定量法 .....	27
4 臨床データ収集および統計解析 .....	31
結果	
1 肺腺癌患者の臨床背景 .....	33
2 小胞体ストレス関連遺伝子の発現は病期や血管侵襲と関連 ...	35

3	IRE1 mRNA 発現は再発の予測因子である .....	41
考察		
1	小胞体ストレス関連遺伝子発現の評価法 .....	62
2	IRE1 遺伝子の役割 .....	68
3	本研究の臨床的意義 .....	70
結語	.....	71
謝辞	.....	72
参考文献	.....	73

## 略語表

ALK	anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase
ATF6	activating transcription factor 6
BiP	binding immunoglobulin protein
bZIP	basic-leucine zipper
CHOP	C/EBP homologus protein
CRT	calreticulin
Ct	cycle threshold
DEPC	dithylpyrocarbonate
dNTP	deoxynucleotide
DTT	dithiothreitol
DW	distilled water
EGFR	epidermal growth factor receptor
eIF-2 $\alpha$	eukaryotic translation initiation factor-2 $\alpha$
ER	endoplasmic reticulum
ERO1L	endoplasmic reticulum oxidoreductase 1L
GADD153	growth arrest- and DNA damage- inducible gene 153

GAPDH	glyceraddehyde-3-phosphate dehydrogenase
IRE1	inositol-requiring kinase 1
JNK	c-Jun N-terminal kinase
MHC	major histocompatibility complex
NF- $\kappa$ B	nuclear factor- $\kappa$ B
NSCLC	non-small cell lung cancer
OS	overall survival
P58 <sup>-IPK</sup>	58-kDa inhibitor of protein kinase
PCR	polymerase chain reaction
PERK	protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
PDI	protein disulfide isomerases
RFS	recurrence-free survival
S1P, S2P	site-1 protease, site-2 protease
uORF	upstream open reading frame
UPR	unfolded protein response
VEGF	vascular endothelial growth factor
XBP-1	X-box transcription factor-1

## 要旨

小胞体ストレスは、低酸素などの状況において小胞体に蓄積される折りたたみ不全タンパクにより引き起こされる。それに打ち勝つため、細胞は小胞体ストレス応答を有するが、働きが不十分であるとアポトーシスが惹起される。癌組織は小胞体ストレスが強く働いている環境と思われる。我々は肺腺癌手術症例における小胞体ストレス関連遺伝子（ERO1L、PERK、ATF6、IRE1）の発現を評価し、臨床的予後との検討を行った。これらの遺伝子が高発現の患者は、病理病期も早期で、血管侵襲も少なかった。また、IRE1は独立した無再発期間予測因子であった（ハザード比、2.16；95%信頼区間、1.09-4.29； $P=0.028$ ）。IRE1は肺腺癌手術症例の再発予測のバイオマーカーとなる可能性がある。

## 目的

癌細胞において、小胞体ストレス応答により生存に有利な状況が作られている可能性が示唆されている。しかし、癌と小胞体ストレスとの関係についてはまだ不明な点も多く、肺癌の予後との関係もほとんど報告がない。本研究の目的は、ヒト肺腺癌において小胞体ストレス関連遺伝子の発現と、腫瘍の悪性度や臨床的予後との関連について検討することである。

## 序文

### 1 肺癌治療の現状

肺癌は本邦ならびに世界的にも癌死の原因で最も多く、世界中で毎年 150 万人以上が死亡している<sup>1</sup>。肺癌は治療方針の違いから、小細胞肺癌と非小細胞肺癌（non-small cell lung cancer, NSCLC）に分類され、NSCLC が全体の約 8 割を占め、その多くは肺腺癌である。肺癌に対しては、手術療法、化学療法、放射線治療、そして免疫療法などが集学的に行われているが、5 年生存率は約 20%であり、I 期に限っても約 70%と他臓器の癌と比較して治療成績は不良である<sup>2-4</sup>。近年、分子生物学の進歩により、特徴的な分子生物学的異常が一部の肺癌の発症に関与することがわかり、特定の分子標的治療薬が著効することが明らかになった。例えば、EGFR 遺伝子変異<sup>5</sup>や EML4-ALK 融合遺伝子<sup>6</sup>などであり、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬（EGFR-TKI）、ALK 阻害薬が著効することが知られている<sup>7,8</sup>。このような治療標的となる新たなドライバー変異を同定する試みが世界で行われており、大規模な全ゲノム解析が行われているにも関



わらず、肺腺癌のうち 1/4 や肺扁平上皮癌の半分以上では標的となりうるドライバー変異は発見されず、このような肺癌患者においては有効な治療は乏しいのが現状である<sup>9-11</sup>。臨床病期 I 期、II 期および IIIA 期の一部の NSCLC では手術療法が標準治療であり、その多くが術後化学療法を必要とする。しかし、術後化学療法に対するエビデンスは未だ十分とはいえず<sup>12</sup>、現状では病期に応じて化学療法の内容を選択しているが、術後早期に再発に至る人も多い。そういった中で術後再発リスクを十分に考慮した上で適切な術後化学療法を検証していく必要があると思われる。

## 2 小胞体ストレスと小胞体ストレス応答

小胞体はタンパク合成・成熟の場であり、真核生物の細胞において合成された分泌タンパク・膜タンパクは小胞体において正しい高次構造を形成した機能的なタンパクとなる<sup>13</sup>。しかし、細胞が低酸素や低栄養などのさまざまなストレスにさらされ、機能や恒常性が失われると、変性した折りたたみ不全タンパクが小胞体内に蓄積される。蓄積した折りたたみ不全タンパクにより、細胞へのスト

レスが生じた状態を小胞体ストレスという<sup>14</sup>。小胞体ストレスは細胞の正常な生理機能を妨げるため、細胞にはこのバランスの崩れた状態を察知して、恒常性を維持するためのタンパク品質管理機構を持っている。小胞体膜に存在するセンサータンパク（PERK、ATF6、IRE1）が小胞体ストレスを察知し<sup>15</sup>、小胞体から核へと至るシグナル経路である小胞体ストレス応答（unfolded protein response, UPR）を活性化させることで、細胞はその障害を回避し恒常性を維持するように働く<sup>16</sup>。UPRは、新規のタンパク合成を低下させることで小胞体におけるタンパクの折りたたみを軽減したり<sup>17</sup>、他のタンパク分子が正しい折りたたみ構造をとることで、機能を獲得するのを助ける働きをもったタンパクである分子シャペロンの量を増やすことで折りたたみ機能を向上させたり<sup>18</sup>、変性タンパクの除去効率をあげることで小胞体ストレスを取り除くよう働く<sup>15</sup>（図1）。しかし負荷が強く長時間に及び、小胞体ストレスがUPRによる細胞の回避機能を超えた場合や、UPRそのものが異常活性化をした場合は、反対に細胞死誘導シグナルとして働き、様々な疾患の原因になっていると考えられている<sup>19</sup>。膵β細胞においてアポトーシスが起こること

で、糖尿病の発症につながるといった報告がある<sup>20</sup>。また、神経細胞においてアポトーシスが生じた場合、神経変性疾患が引き起こされる可能性が報告されている<sup>21</sup>。

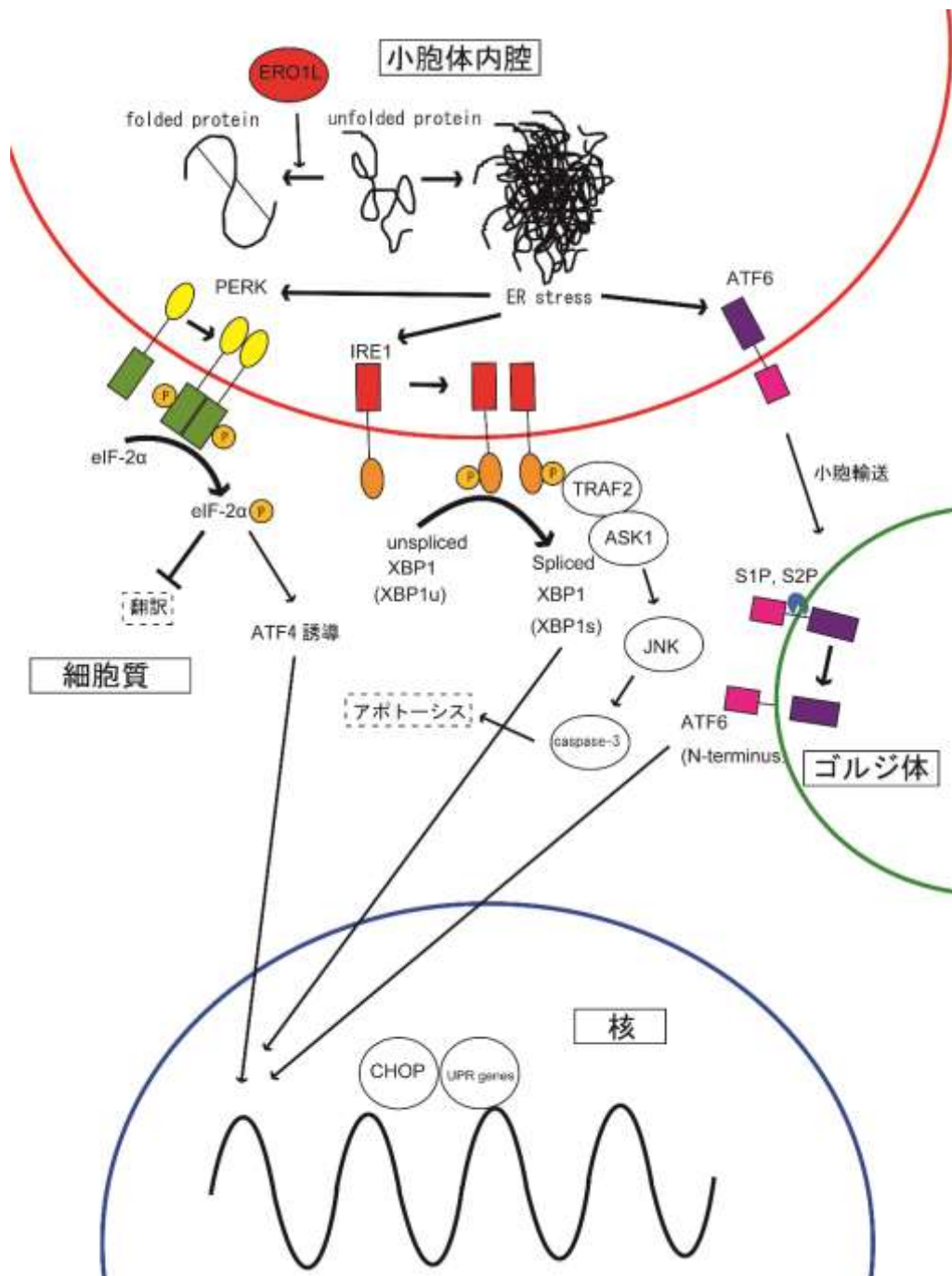


図 1 小胞体ストレスと UPR

タンパク合成増大などにより小胞体ストレスが起こり、UPR の活性化が引き起こされる。UPR は 3 つの小胞体膜関連タンパクである PERK、ATF6、IRE1 によって媒介され、小胞体ストレスに対する転写・翻訳の変化を誘導する。ERO1L は多くの酸化還元酵素に酸化力を提供し、折りたたみ不全タンパクのジスルフィド結合形成に寄与している。

小胞体における折りたたみ不全タンパクの蓄積は膜貫通型タンパクの PERK、ATF6、IRE1 によって認識される。定常状態では、それらのセンサータンパクの小胞体内腔側にシャペロンタンパクの BiP が結合して不活性型となっている。しかし、小胞体内に折りたたみ不全タンパクが蓄積すると、BiP が受容体から離れ折りたたみ不全タンパクに移行することで、受容体の活性化と下流のシグナル伝達が引き起こされる<sup>22, 23</sup>。

PERK は細胞質側にセリン/スレオニンキナーゼドメインをもっており、BiP が離れることで二量体化およびオリゴマー化し、キナーゼドメインが自己リン酸化し活性型となる。活性化型 PERK は基質の eIF2 $\alpha$  を特異的にリン酸化する。eIF2 $\alpha$  のリン酸化によりキャップ依存的な翻訳が抑制され、小胞体に挿入される新規のタンパクを減少することで、小胞体への負荷を軽減する<sup>24, 25</sup>。一方、リン酸化 eIF2 $\alpha$  は mRNA のコーディング領域の 5' 上流に存在する非翻訳領域であり、タンパクをコードする可能性がある upstream open reading frame (uORF) 構造をもつ遺伝子の翻訳を促進するため、転写因子 ATF4 を誘導する<sup>26</sup>。PERK-ATF4 経路はアポトーシス促進にか

かわる転写因子 CHOP/GADD153 の発現も誘導することで、小胞体ストレスの強度や持続時間に応じてアポトーシスシグナルを誘導する。

ATF6 は C 末端側が小胞体側にある膜貫通型タンパクで、N 末端側に bZIP ドメインをもつ膜型の転写因子である。ATF6 は BiP が離れることでゴルジ体へと小胞輸送され、S1P や S2P により膜の内部において切断を受ける。切断された N 末端断片が核へと移行し、分子シャペロンの転写を誘導することで小胞体における折りたたみ機能の向上をはかる。

IRE1 は細胞質側にキナーゼドメインと RNase ドメインをもち、PERK と同様に小胞体ストレスにより BiP が離れ二量体化をおこし、キナーゼドメインの自己リン酸化をおこすことで、RNase ドメインの活性化をおこす。活性型の RNase ドメインは基質の XBP-1 mRNA から 26 塩基のイントロンをスプライシングする<sup>27</sup>。スプライシングされた XBP-1s は折りたたみ不全タンパク質の除去に関係するタンパクや酸化還元酵素などを発現させる。また、オリゴマー化した IRE1 は分泌タンパク・膜タンパクをコードした mRNA を切

断したり、カスパーゼ 2 の発現制御にかかわる miRNA を選択的に切断したりすることで、カスパーゼ経路の活性化を介してアポトーシスを誘導する。また RNase 非依存的な経路として、NF- $\kappa$ B 経路や JNK 経路の活性化があり、アポトーシスの誘導に関与している<sup>28</sup>。

また、小胞体の恒常性維持には、小胞体内の酸化(oxidation)と還元(reduction)のバランスによるレドックス(reduction と oxidation の合成語であり、物質間の電子の授与をおこす反応)環境も重要であり、その破綻により小胞体ストレスが惹起されることが知られている。レドックス環境は約 20 種類の酸化還元酵素やグルタチオン、活性酸素種などにより制御されている<sup>29</sup>。その中で ERO1L は酸化的フォールディングにおいて中心的な役割を果たしている酵素で、小胞体の主要な酸化還元酵素 PDI と強く相互作用をおこし、PDI から電子を受け取り、PDI に酸化力を提供する。ERO1L-PDI をハブとした小胞体酸化還元酵素がネットワークを形成しており、多くの酸化還元酵素に酸化力を提供することで折りたたみ不全タンパクのジスルフィド結合形成に寄与している<sup>30, 31</sup>。

### 3 小胞体ストレスと癌との関連

発癌、増殖、浸潤、遠隔転移といった多段階の経過が癌の発症と進行に関与している<sup>32</sup>。固形癌において、急激な増殖により癌の内部への血液供給が追いつかずに低酸素や低栄養といった小胞体ストレスを惹起する微小環境が生じていることが報告されており<sup>33</sup>、小胞体ストレスマーカーの過剰発現も種々の癌において報告されている<sup>34</sup>。また、癌細胞ではシャペロンタンパクの発現が亢進しており、低栄養などによって引き起こされるストレスに対応している。UPR が腫瘍細胞やマクロファージにおいて炎症誘発性サイトカインの産生を伴い、癌の進行や腫瘍の成長と関係した炎症性微小環境に寄与しているといった報告もある<sup>35,36</sup>。このように種々の癌細胞において、UPR がその生存に有利な方向に寄与している可能性が示唆されている。

小胞体ストレスセンサータンパク PERK を欠損した細胞においては、血管新生因子の遺伝子発現の低下により *in vitro* での腫瘍形成が著しく減少することが示されている<sup>37</sup>。また、PERK のキナーゼドメインの突然変異や eIF2 $\alpha$  のリン酸化耐性型の導入による



PERK 経路の不活化により極端な低酸素状態において細胞生存が損なわれるといった報告がある<sup>38</sup>。また ATF4 を介して酸化的 DNA 損傷を限定することで、PERK が癌細胞増殖および腫瘍成長を促進するといった報告もある<sup>39</sup>。

一方で、強く持続的に PERK を活性化した細胞ではアポトーシスを誘導する CHOP が発現するが、ある種の癌細胞においては、PERK 活性を阻害する P58<sup>IPK</sup>を過剰発現してアポトーシスから回避していることも明らかになっている<sup>40</sup> したがって、PERK-リン酸化 eIF2 $\alpha$ -ATF4 シグナル伝達が、腫瘍細胞増殖および腫瘍成長に重要である<sup>41</sup> ことがわかる。

IRE1-XBP-1 シグナルも癌細胞生存や増殖に重要であり、IRE1 の阻害は、腫瘍増殖や血管新生、血液灌流を減少させ、神経膠腫移植レシピエントマウスにおいて OS を改善するといった報告がある<sup>42</sup>。IRE1-XBP-1 の転写誘導が VEGF の様に血管新生促進因子であり腫瘍形成促進が示唆されており<sup>43</sup>、IRE1-XBP-1 の阻害が抗腫瘍治療の有望なアプローチかもしれないといった報告もある<sup>44</sup>。多発性骨髄腫のモデルにおいては、STF-083010 といった選択的 IRE1

RNase 活性をもった阻害薬<sup>45</sup>や、MKC-3946 といった IRE1 が介在する XBP-1 のスプライシングを阻害する小分子化合物<sup>46</sup>が増殖を抑制するといった報告も散見される。

ATF6 は mTOR シグナリングの活性化を介して、休眠腫瘍細胞の生存に重要な役割を持っていることが示唆されている<sup>47</sup>。ATF6 によって制御されている BiP の発現の増加は、化学療法抵抗性や悪性度の高い癌と相関しているという報告もある<sup>48</sup>。

ERO1L は低酸素で発現が増加し、乳癌や胃癌においては VEGF などの血管新生因子と相関し、ERO1L 高発現群の方が臨床例において予後不良という報告がなされている<sup>49, 50</sup>。大腸癌においては、酸化ストレスを介して、抗原提示などの癌免疫においても重要な働きをしている MHC class I の発現を調節するため、ERO1L 高発現群の方が臨床例において予後良好な可能性があることが報告されている<sup>51</sup>。

以上のように PERK、ATF6、IRE1 といったセンサータンパクや ERO1L といった酸化還元酵素などの働きにより小胞体内では新規タンパク合成の品質管理が行われており、タンパクのホメオスタ

シスが保たれている。多発性骨髄腫においてプロテアソーム阻害薬であるボルテゾミブによる治療効果があることは、タンパクのホメオスタシスを標的とした癌治療が有効であることを示唆している<sup>52</sup>。このように癌細胞の生存・アポトーシスの回避などに UPR が深く関わっていることが多くの報告からわかっている。また、小胞体ストレス関連遺伝子の高発現は癌細胞生存にとって有利に働いているといった報告が多く見られる。

#### 4 肺癌における小胞体ストレス関連遺伝子発現

肺癌における小胞体ストレス関連遺伝子との報告は少なく、術後再発・予後などの臨床経過との関係はわかっていない。カルレティキュリン(CRT)は一般的に小胞体内腔に局在しており、新規に合成されたタンパクの品質管理やフォールディングに関するシャペロンタンパクであるが、近年 CRT が癌細胞や病原体感染細胞などにおいて免疫原性細胞死をおこす際に、細胞膜上に発現促進される (eat-me signal) ことが報告された<sup>53, 54</sup>。NSCLC において、CRT 発現が PERK 下流の eIF2 $\alpha$  リン酸化と相関しており、腫瘍細胞

における CRT 高発現が浸潤成熟樹状細胞やエフェクターメモリーT細胞の濃度と関係し、腫瘍の微小環境における免疫応答の活性化に関係し、予後との関係が見られたといった報告が最近あった<sup>55</sup>。また肺癌の細胞株 A549 と H460 を用いた実験で CDDP によって引き起こされる細胞死の際に小胞体ストレスが関係しており、小胞体ストレスの阻害薬を添加することで CDDP による肺癌細胞の細胞死が増強するといった報告もある<sup>56</sup>。しかし、癌と小胞体ストレスとの関係についてはまだ不明な点も多く、肺癌の予後との関係も未解明であるのが現状である。本研究の目的は、ヒト肺腺癌において小胞体ストレス関連遺伝子の発現と、腫瘍の悪性度や臨床的予後との関連について検討することである。

## 方法

### 1 肺癌手術検体

2007 年 3 月から 2011 年 6 月までに東京大学医学部附属病院呼吸器外科にて手術を行い、原発性肺腺癌の診断がついた 126 症例の切除検体から採取したサンプルを用いて解析を行った。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）、承認を受けた後、臨床検体についてはインフォームドコンセントを全患者より書面で得たうえで、切除検体から肺癌組織の一部を採取した。RNA 抽出用の臨床検体は、臨床検体採取後に可及的速やかに一部を切り分けて、RNAlater® 500  $\mu$ L を入れた 1.5 mL エッペンドルフチューブで一晩 4 °C で保管し、翌日検体の水気を十分に除いた上で新しいエッペンドルフチューブに移し替え、抽出までの間 -20 °C で保存した。臨床検体からの total RNA は RNAiso Plus® (TAKARA)を用いてプロトコールに従って抽出した。肺癌組織の破碎は、オートクレーブ滅菌したハサミで細切してから、専用チュー

ブキット (CK Mix 2 mL: 1.4 mm と 2.8 mm のビーズ) に組織と RNAiso Plus 1 mL を加え、Precellys 24 (Bertin instruments, France) で破碎を行った (条件 : 6500 rpm 23 sec 2 cycle, interval 15 sec)。

## 2 標的遺伝子の決定

小胞体ストレス関連遺伝子の発現を評価するために、まず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。

評価のために用いたデータは、Affymetrix GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array (NCBI の gene expression omnibus のプラットフォーム ID: GPL570) を用いて解析されたデータを用いた。腺癌 40 例は dataset record GSE10245<sup>57</sup> に含まれるものを用いた。正常カウンターパートの 30 サンプルは GSE16538(肺サルコイドーシスの study)<sup>58</sup> から 6 サンプル、GSE24206(間質性肺炎の study)<sup>59</sup> から 6 サンプル、GSE8581(COPD の study)<sup>60</sup> から 18 サンプルの正常肺を用いた。

Bioconductor で genefilter 等のライブラリを用いて、GPL570 の遺伝子のうちコントロールを除き、一定の発現量があり、肺腺癌で過剰発現のみられる遺伝子を抽出した。小胞体ストレス経路に係ることが知られている表 1 にある 84 遺伝子について抽出し、ライブラリ Heatplus の関数 heatmap\_2 を用いて、発現プロファイルの可視化を行った(図 2)。84 遺伝子のうち、肺腺癌で高発現であり、かつ正常肺組織では低発現であり、発現量に有意差をもった 42 遺伝子を heatmap 上に抽出した。ERO1L は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であると思われた。また、Oncomine<sup>TM</sup> (<https://www.oncomine.org/resource/login.html>)において予後との相関が ERO1L で示されたため発現を検討する遺伝子とした(図 3)。

また、小胞体ストレス関連遺伝子の中で、小胞体膜上でセンサータンパクとして働く PERK、ATF6、IRE1 についても重要な遺伝子であると考えられたため標的遺伝子として発現を解析することとした。

表 1 正常肺組織と肺腺癌の発現プロファイル解析に用いた遺伝子

AMFR	DNAJB9	HSPA1B	NPLOC4	SERP1
ATF4	DNAJC3	HSPA1L	NUCB1	SIL1
ATF6	DNAJC4	HSPA2	OS9	SREBF1
ATF6B	DNAJC10	HSPA4	PDIA3	SREBF2
ATNX3	EDEM1	HSPA4L	PFDN2	SYVN1
BAX	EDEM3	HSPA5	PFDN5	TCP1
CALR	EIF2A	HSPH1	PPIA	TOR1A
CANX	EIF2AK3 (PERK)	HTRA2	PPP1R15A	UBE2G2
CCT4	ERN1 (IRE1)	HTRA4	PRKCSH	UBE2J2
CCT7	ERN2	INSIG1	RNF5	UBXN4
CEPBP	ERO1L	INSIG2	RNF139	UFD1L
CREB3	ERO1LB	MANF	RPN1	UGGT1
CREB3L3	ERP44	MAPK8	SCAP	UGGT2
DDIT3	FBXO6	MAPK9	SEC62	USP14
DERL1	GANAB	MAPK10	SEC63	VCP
DERL2	GANC	MBTPS1	SEL1L	XBP1
DNAJB2	HERPUD1	MBTPS2	SELS	



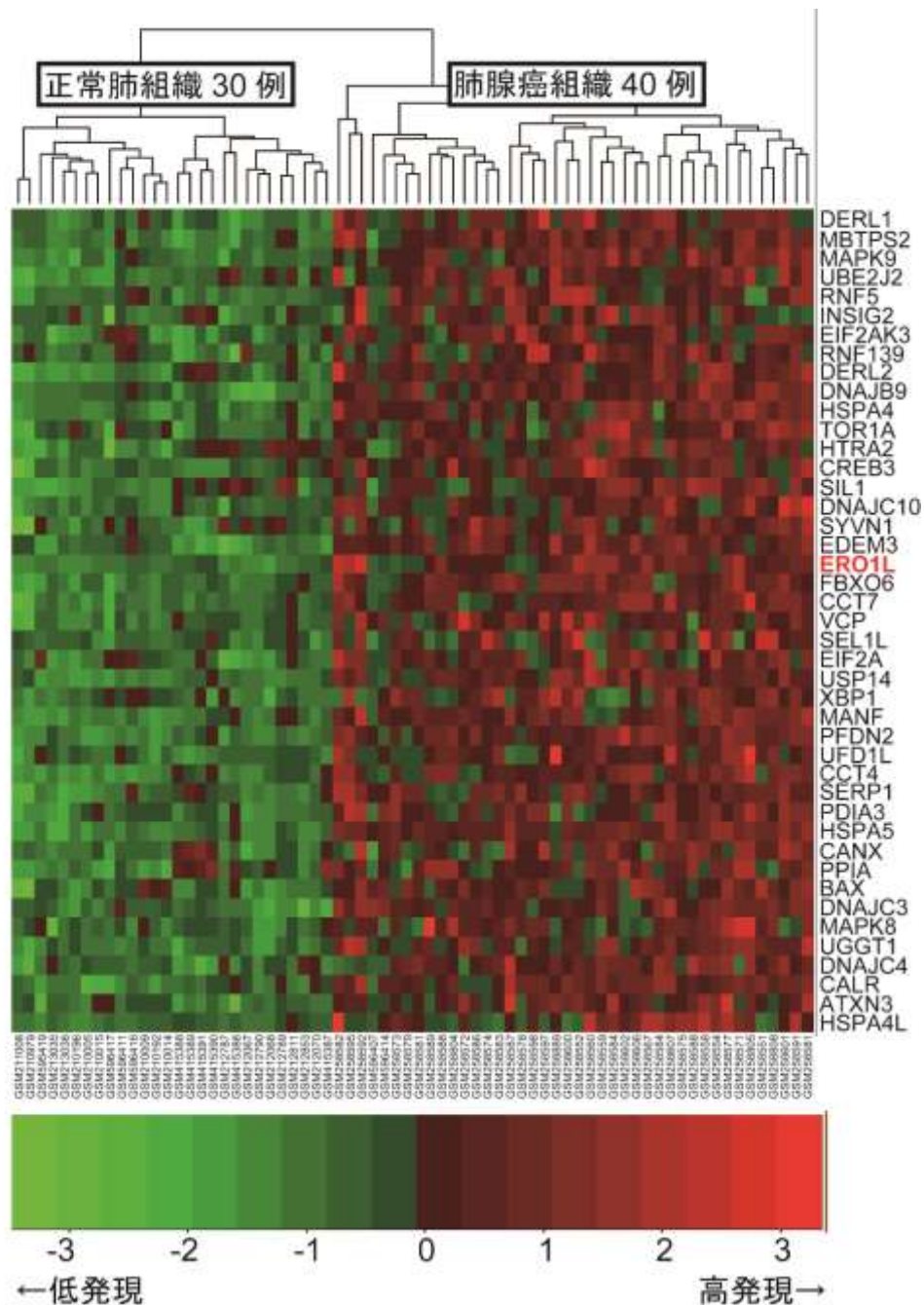


図 2 小胞体ストレス関連遺伝子のマイクロアレイ解析結果  
肺腺癌 40 例(GSE10245)と、正常肺組織 30 例(GSE16538, GSE24206, GSE8581)  
のデータセットの発現プロファイルを用いてヒートマップを作成した。  
ERO1L は肺腺癌において明らかに高発現であり、かつ正常肺組織においては  
まったく発現が見られなかった。ERO1L 以外は正常肺組織でも高発現症例を  
含んでいたが、ERO1L のみ正常肺における高発現症例が認められなかった。

引用：Affymetrix GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array



### 図3 ERO1L の Oncomine™ 結果

有料で利用できるマイクロアレイデータと予後との統合データベースである Oncomine™ では、3 年後生存と ERO1L 発現との関係を見ると、Bild らの報告の再解析では、3 年後生存群（左）では ERO1L 低発現であり、3 年後死亡群（右）では ERO1L 高発現であった。

引用：Oncomine™ (<https://www.oncomine.org/resource/login.html>)

### 3 遺伝子発現の定量法

小胞体ストレス関連遺伝子として選択した ERO1L、PERK、ATF6、IRE1 についてリアルタイム逆転写 PCR 法によって定量を行った。

以下に示すように、臨床検体から抽出した total RNA を DNase 処理して、SuperScript III® Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, USA)を用いて cDNA を合成した。cDNA を合成した後、THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (TOYOBO)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。glyceraddehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)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。

室温で 15 分間の DNase 処理後に 25 mM の EDTA を 1  $\mu$ L 加え、65 °C 15 分間の heat activation を行った。次に random hexamer (Promega) 0.5  $\mu$ L、20 mM dNTP 0.5  $\mu$ L、DEPC 処理水 1  $\mu$ L を加えて全量 13  $\mu$ L とし、65 °C で 5 分間、氷上で 1 分間 incubate した。これを Super Script III®(Invitrogen)による逆転写反応に使用した。

各々の標的遺伝子や GAPDH に対する最適化したプライマー設計は、Genetyx (version 11)、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、BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 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 で得られたアンプリコンについては、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。

逆転写反応によって合成された cDNA を用いて、THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (TOYOBO) でリアルタイム PCR を triplicate で行った。PCR はすべて 2-step の 40 サイクルとし、アニーリングは 60 °C、伸長反応は 72 °C で行った。

## リアルタイム PCR

cDNA	2 $\mu$ L
Forward primer (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ L
Reverse primer (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ L
THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix(TOYOBO)	25 $\mu$ L
DW	19 $\mu$ L
Total	50 $\mu$ L

95 °C 1min  
 95 °C 15sec  
 60 °C 30sec  
 72 °C 45sec

} 35 cycles

上記を pipetting して 16  $\mu$ L ずつ triplicate に分注してからリアルタイム PCR を行った。リアルタイム PCR に用いたプライマーを表 2 に示す。

リアルタイム RT-PCR 後の遺伝子発現量の定量方法としては、相対定量法であるターゲット遺伝子の小胞体ストレス関連遺伝子とリファレンス遺伝子の GAPDH の Ct 値の差分である  $\Delta$ Ct 値を比較する方法<sup>61</sup>を用いた。

表 2 リアルタイム PCR に用いたプライマー

プライマー		
ATF6	Forward (5' to 3')	TCAGACAGTACCAACGCTTATGC
	Reverse (5' to 3')	TAGGACAGGTTTAGTCACGGAAAG
	Product	265 bp
ERO1L	Forward (5' to 3')	GACTTATATCTGGCCTACATGCAA
	Reverse (5' to 3')	GGGCGCTCGAAGAATGGTAAC
	Product	229 bp
IRE1	Forward (5' to 3')	CTCCAGACAGACCTGCGTAA
	Reverse (5' to 3')	GAAGCGAGATGTGAAGTAGCAC
	Product	168 bp
PERK	Forward (5' to 3')	GGCCACTTTGAACTTCGGTAT
	Reverse (5' to 3')	CTCCCTTCTTACTGAATGCCATAACT
	Product	196 bp
GAPDH	Forward (5' to 3')	CACCACCAACTGCTTAGCAC
	Reverse (5' to 3')	TGGCAGGTTTTTCTAGACGG
	Product	305 bp

#### 4 臨床データ収集および統計解析

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<sup>62</sup>によって病期を決定した。本研究では肺癌再発・および最終生存確認日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、病理病期、喫煙歴、リンパ管侵襲、血管侵襲、そして EGFR 遺伝子変異。無再発生存期間 (relapse-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、全生存期間 (overall survival, OS) は肺切除の日から死亡もしくは最後に生存を確認した日までの期間と定義した。

統計解析は全て、SPSS 統計パッケージ (SPSS, Inc., Chicago, IL) を用いて行った。小胞体ストレス関連遺伝子の発現量および臨床病理学的な特徴との関係はピアソンカイ二乗 ( $\chi^2$ ) によって解析した。異なる 2 つの小胞体ストレス関連遺伝子間における発現レベルの相関関係は、Pearson の積率相関係数によって評価した。小胞体ストレス関連遺伝子の発現と病理病期の関係は、各病期群の正規分

布の検定に Shapiro-Wilk 検定を行い、正規分布に従わないデータ分布であったため、ノンパラメトリック手法である Kruskal-Wallis 検定によって病期群間の発現量の差について評価した。多重比較は Mann-Whitney の U 検定を行い、得られた有意確率  $P$  値を Bonferroni の補正によって修正した。RFS と OS は Kaplan-Meier method によって計算し、log-rank test で比較した。単変量・多変量解析は以下の共変量間において関連があるかどうか検証した：年齢、性別、病理病期、喫煙歴、リンパ管侵襲、血管侵襲、EGFR 遺伝子変異、そして小胞体ストレス関連遺伝子の mRNA 発現量（高発現群、低発現群）。予後因子についての多変量解析は Cox 比例ハザードモデルを用いた。有意差は  $P$  値 $<0.05$  とした。



## 結果

### 1 肺腺癌患者の臨床背景

126 例の患者の臨床背景は表 3 の通りである。年齢の中央値は 68 歳（範囲は 36-86 歳）で、63 人（50%）が男性であった。最も多い病理病期は病期 IA と病期 IB であり、それぞれ 43 人（34.1%）であった。喫煙者（ブリンクマン指数が 100 以上を喫煙者と定義した）が全体の約半数（49.2%）であった。リンパ管侵襲が 28 人（22.8%）に見られ、血管侵襲は 54 人（43.9%）に認められた。46 人（36.5%）に EGFR 遺伝子変異が認められ、68 人（54%）は EGFR 遺伝子野生型であり、10 人（9.5%）は EGFR 遺伝子変異不明であった。

術後化学療法は、UFT 使用が 26 例（20.6%）、プラチナ併用療法使用が 20 例（15.9%）であった。再発時に EGFR-TKI を使用したのは、EGFR 遺伝子変異陽性 46 例のうち 16 例（12.7%）であった。

表 3 患者背景

		N	%
年齢	中央値 (範囲)	68 (36-86)	
性別	男性	63	50.0
	女性	63	50.0
病理病期	IA	43	34.1
	IB	43	34.1
	II	18	14.3
	III	16	12.7
	IV	6	4.8
喫煙歴	Smoker	61	49.2
	Never & light smoker	63	50.8
リンパ管侵襲	なし	95	77.2
	あり	28	22.8
血管侵襲	なし	69	56.1
	あり	54	43.9
EGFR 変異	あり	46	36.5
	(EGFR-TKI 使用	16	12.7)
	なし	68	54.0
	不明	12	9.5
術後化学療法	UFT	26	20.6
	プラチナ製剤	20	15.9
	未使用	80	63.5

## 2 小胞体ストレス関連遺伝子の発現は病期や血管侵襲と関連

126 人の肺腺癌患者の臨床病理学的特徴と小胞体ストレス関連遺伝子の発現との間の関係は表 4 の通りである。小胞体ストレス関連遺伝子の発現レベルに応じて、発現が中央値よりも高い患者群を高発現群、一方中央値よりも低い患者群を低発現群と定義した。小胞体ストレス関連遺伝子の mRNA 発現レベルと病理病期、血管侵襲との間には明らかな関係が認められた。小胞体ストレス関連遺伝子の 4 種類すべてにおいて、高発現群では低発現群にくらべて、病理病期が早期である傾向(ERO1L;  $P=0.009^*$ , PERK;  $P=0.002^*$ , ATF6;  $P=0.001$ , IRE1;  $P=0.001$ , カイ二乗検定)が見られ、血管侵襲も少ない傾向(ERO1L;  $P=0.040^*$ , PERK;  $P<0.001^*$ , ATF6;  $P<0.001^*$ , IRE1;  $P=0.003^*$ , カイ二乗検定)が認められた。一方、小胞体ストレス関連遺伝子発現レベルと性別、喫煙歴、リンパ管侵襲、EGFR 遺伝子変異の有無との間には明らかな関係は認められなかった。

表 4 126 例の肺腺癌患者における臨床病期的特徴と小胞体ストレス関連遺伝子の発現間の関係

	ERO1L			PERK		
	高発現	低発現	<i>P</i> value	高発現	低発現	<i>P</i> value
患者数	63	63		63	63	
性別 (男性/女性)	32/31	31/32	0.859	32/31	31/32	0.859
病理病期 (IA/IB/II/III/IV)	29/17 /10/7/0	14/26 /8/9/6	0.009*	31/19 /8/5/0	12/24 /10/11/6	0.002*
喫煙歴 (Never & light / smoker)	31/31	32/30	0.857	30/32	33/29	0.590
リンパ管侵襲 (なし/あり)	50/13	45/15	0.564	50/11	45/17	0.214
血管侵襲 (なし/あり)	41/22	28/32	0.040*	44/17	25/37	<0.001*
EGFR 変異 (あり/なし)	25/32	21/36	0.445	24/33	22/34	0.760

	ATF6			IRE1		
	高発現	低発現	<i>P</i> value	高発現	低発現	<i>P</i> value
患者数	63	63		63	63	
性別(男性/女性)	36/27	27/36	0.109	32/31	31/32	0.850
病理病期 (IA/IB/II/III/IV)	31/21 /7/4/0	12/22 /11/12/6	0.001*	31/18 /10/4/0	12/25 /8/12/6	0.001*
喫煙歴(Never & light / smoker)	29/34	34/27	0.280	34/29	28/32	0.418
リンパ管侵襲 (なし/あり)	52/10	43/18	0.077	52/10	43/18	0.077
血管侵襲 (なし/あり)	47/14	22/39	<0.001*	43/19	26/35	0.003*
EGFR 変異 (あり/なし)	25/31	21/37	0.359	27/30	19/38	0.127

次に、異なる 2 つの小胞体ストレス関連遺伝子間における発現レベルの関係について、Pearson の積率相関係数を用いて検討した (図 4)。散布図を見ると、異なる 2 つの小胞体ストレス関連遺伝子間において、どの 2 つをとっても正の相関が見られることがわかる (相関係数  $r$ : 0.549-0.869)。とくに PERK と IRE1 間の発現レベルにおいて強い相関が認められた ( $r=0.869$ ,  $P<0.001$ )。

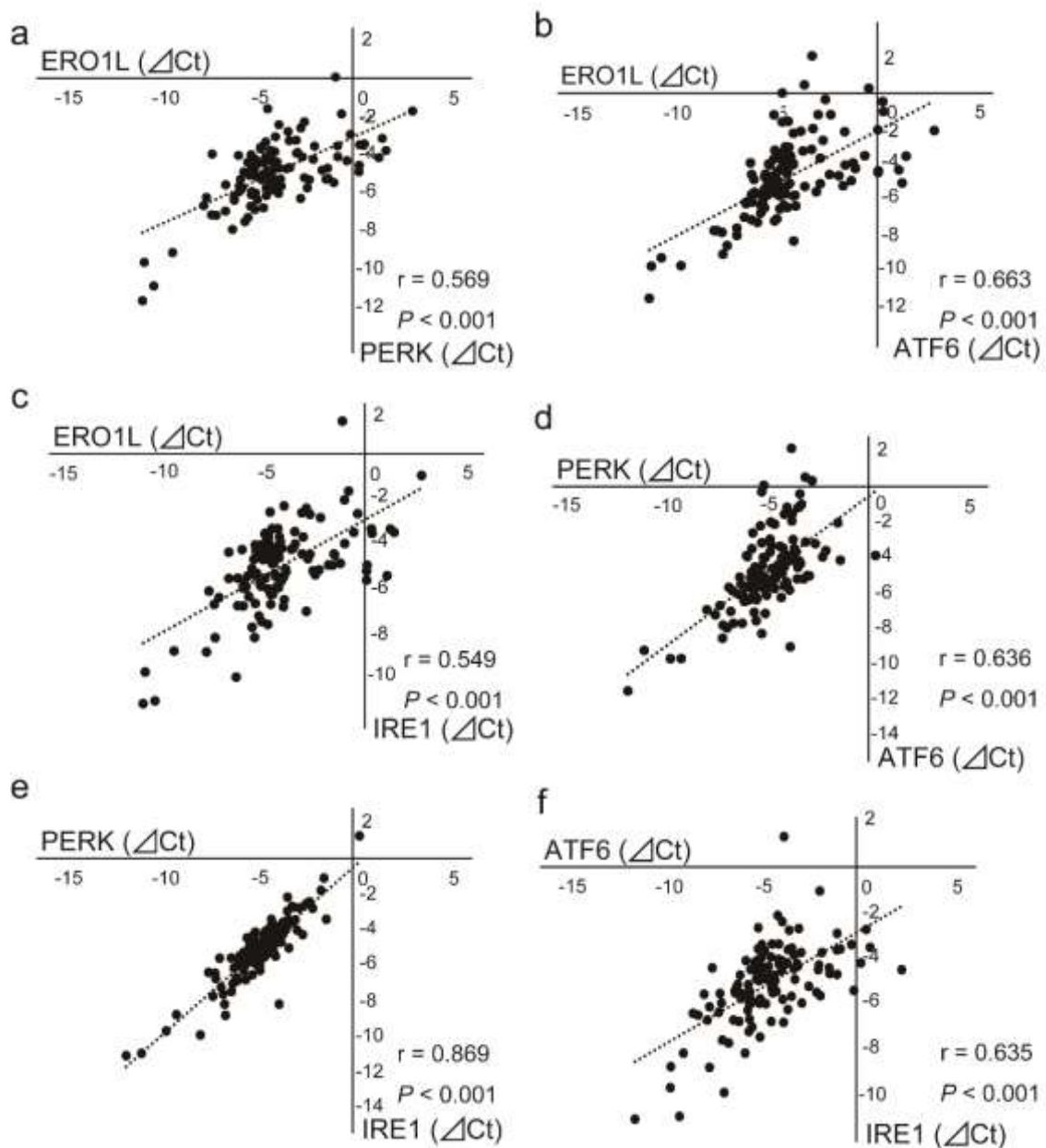


図 4 小胞体ストレス関連遺伝子間における発現レベルの関係

4つの小胞体ストレス関連遺伝子間において Pearson の積率相関係数を使用したところ、どの2つの組み合わせでも発現に相関が認められた。とくに PERK と IRE1 の間の発現は相関係数が  $r=0.869$  と強い相関が認められた。

小胞体ストレス関連遺伝子について 4 種類すべてにおいて高発現群では低発現群よりも病期が早期であったため、より詳しく検討するために病理病期別に小胞体ストレス関連遺伝子の発現レベルを解析し、Box plot で示した。小胞体ストレス関連遺伝子の発現レベルは、病理病期が進行するほど減少する傾向にあった（図 5）。小胞体ストレス関連遺伝子の各々の病期群において、各群のデータ分布が正規分布に従うか Shapiro-Wilk 検定を行ったところ、正規分布に従わなかったため、ノンパラメトリック手法である Kruskal-Wallis 検定にて群間の発現量に差を認めるかを検証した。

4 つの小胞体ストレス関連遺伝子すべてにおいて異なる病理病期群の間の中央値において、統計学的に有意差が認められた（ERO1L,  $P=0.002$ ; PERK,  $P<0.001$ ; ATF6,  $P<0.001$ ; IRE1,  $P<0.001$ , Kruskal-Wallis 検定)。そのため、肺腺癌患者の術後予後と小胞体ストレス遺伝子発現との間には関連があると思われ検討を進めた。

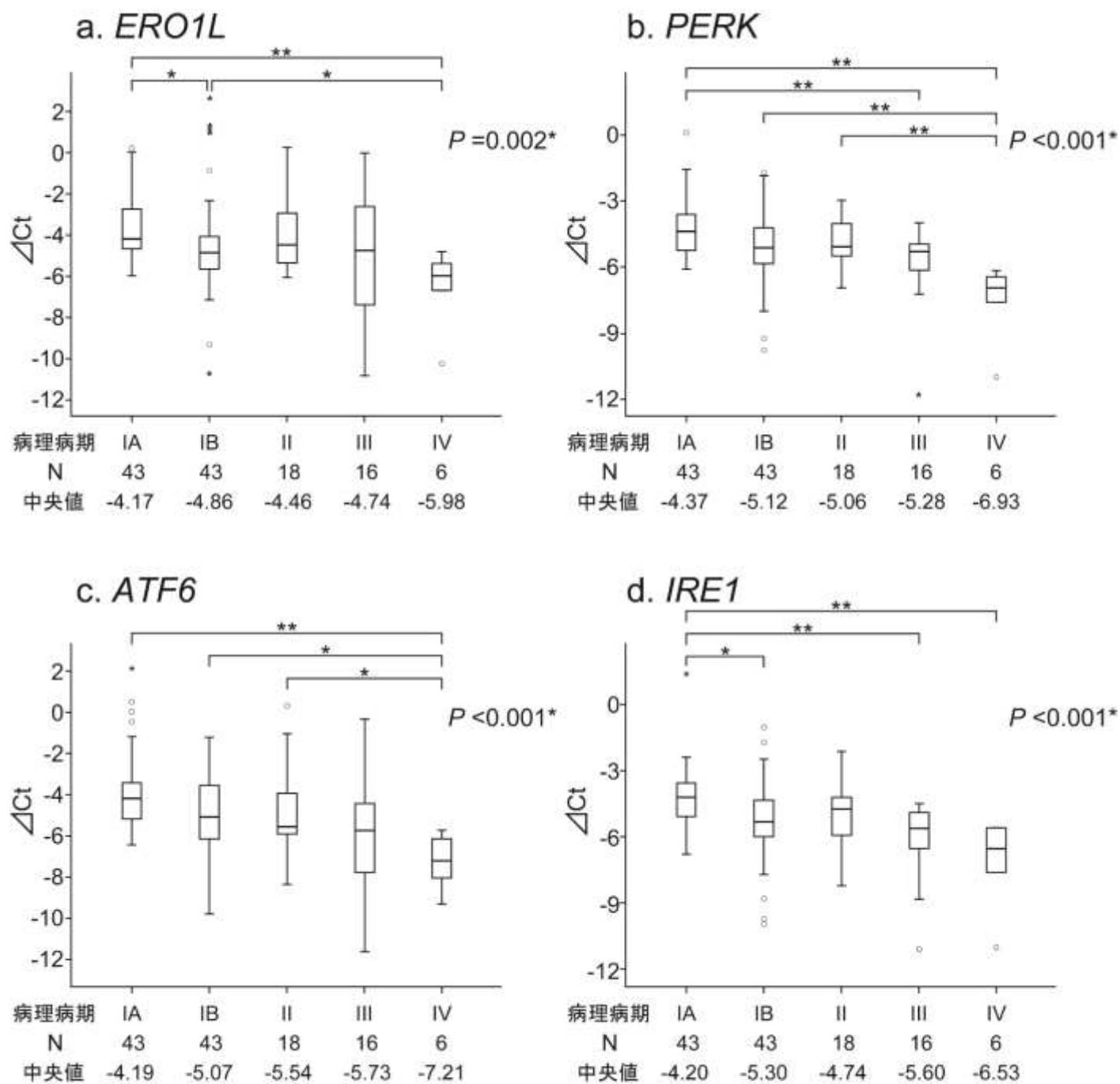


図5 小胞体ストレス関連遺伝子の発現と病理病期の関係

4つの小胞体ストレス関連遺伝子すべてにおいて、病理病期が進むほど発現が下がる傾向が認められた。Kruskal-Wallis検定を行ったところ、統計学的有意に群間に差が認められた。多重比較はMann-WhitneyU検定後にBonferroniの補正を行った（\*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ ）。



### 3 IRE1 mRNA 発現は再発の予測因子である

log-rank test による RFS の単変量解析を行った結果を表 5 に示す。病理病期 ( $P<0.001$ )、リンパ管侵襲の有無 ( $P<0.001$ )、血管侵襲の有無 ( $P<0.001$ )、PERK 発現 ( $P=0.003$ )、ATF6 発現 ( $P=0.001$ )、IRE1 発現 ( $P<0.001$ ) は統計学的に有意な RFS の予後因子であった。

Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析を行った結果を臨床病理学的特徴のうち、共変量として単変量解析で有意差がついた病理病期、リンパ管侵襲の有無、血管侵襲の有無、PERK 発現、ATF6 発現、IRE1 発現を用いて行ったところ、表 6 に示すように IRE1 発現、リンパ管侵襲の有無、血管侵襲の有無、病理病期が独立した予後規定因子であり、ハザード比はそれぞれ 2.16 倍、0.44 倍、0.41 倍、そして 0.40 倍であった ( $P=0.028$ 、 $0.037$ 、 $0.031$  そして  $0.015$ )。

表 5 肺腺癌患者における RFS の単変量解析結果

		RFS			
		数	中央値 (日)	95% 信頼区間	P 値
年齢	≥70	57	2396	2111-2681	0.137
	<70	69	2172	1860-2486	
性別	男性	63	2158	1859-2458	0.560
	女性	63	2400	2087-2713	
病理病期	I	86	2754	2548-2960	<0.001*
	II, III, IV	40	1282	907-1657	
喫煙歴	Smoker	61	2299	2008-2590	0.522
	Never&light	63	2284	1963-2604	
リンパ管 侵襲	なし	95	2679	2462-2897	<0.001*
	あり	28	1031	664-1397	
血管侵襲	なし	69	2692	2488-2896	<0.001*
	あり	54	1671	1305-2036	
EGFR 変異	あり	46	2216	1817-2614	0.770
	なし	68	2233	1957-2508	
ERO1L	高発現群	63	2435	2173-2697	0.065
	低発現群	63	2117	1776-2457	
PERK	高発現群	63	2527	2275-2779	0.003*
	低発現群	63	1992	1652-2332	
ATF6	高発現群	63	2575	2345-2804	0.001*
	低発現群	63	1951	1600-2302	
IRE1	高発現群	63	2720	2463-2976	<0.001*
	低発現群	63	1844	1521-2168	

表 6 肺腺癌患者における RFS の多変量解析結果

RFS					
		数	ハザード比	95% 信頼区間	P 値
リンパ管 侵襲	あり	28	0.443	0.207-0.952	0.037*
	なし	95			
血管侵襲	あり	54	0.412	0.184-0.921	0.031*
	なし	69			
病理病期	II, III, IV	40	0.399	0.190-0.839	0.015*
	I	86			
IRE1	高発現群	63	2.157	1.085-4.288	0.028*
	低発現群	63			

つぎに log-rank test による OS の単変量解析を行った結果を表 7 に示す。病理病期 ( $P=0.010$ )、血管侵襲の有無 ( $P=0.004$ )、IRE1 発現 ( $P=0.009$ ) は統計学的に有意な OS の予後因子であった。

Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析を行った結果を表 8 に示す。OS に対する多変量解析については、表 7 に示した臨床病理学的特徴のうち、共変量として病理病期、血管侵襲の有無、IRE1 発現を用いて行ったところ、血管侵襲の有無が独立した予後規定因子であり、ハザード比は 0.09 倍であった ( $P=0.022$ )。

表 7 肺腺癌患者における OS の単変量解析結果

		OS			
		数	中央値 (日)	95% 信頼区間	<i>P</i> 値
年齢	≥70	57	2804	2632-2977	0.432
	<70	69	3071	2935-3207	
性別	男性	63	2848	2688-3008	0.636
	女性	63	3060	2914-3206	
病理病期	I	86	3135	3047-3224	0.010*
	II, III, IV	40	2529	2271-2786	
喫煙歴	Smoker	63	2815	2645-2985	0.261
	Never&light	63	3097	2967-3226	
リンパ管 侵襲	なし	95	3090	2983-3196	0.079
	あり	28	2748	2414-3081	
血管侵襲	なし	69	3012	2955-3070	0.004*
	あり	54	2835	2594-3077	
EGFR 変異	あり	49	3103	2954-3253	0.322
	なし	68	2843	2691-2508	
ERO1L	高発現群	63	3008	2888-3127	0.277
	低発現群	63	2968	2781-3155	
PERK	高発現群	63	3013	2898-3127	0.251
	低発現群	63	2962	2770-3153	
ATF6	高発現群	63	2973	2884-3061	0.058
	低発現群	63	2917	2711-3123	
IRE1	高発現群	63	3185	3129-3240	0.009*
	低発現群	63	2728	2526-2930	

表 8 肺腺癌患者における OS の多変量解析結果

		OS			
		数	ハザード比	95% 信頼区間	<i>P</i> 値
血管侵襲	あり	54	0.088	0.011-0.702	0.022*
	なし	69			

Kaplan-Meier method による解析では、小胞体ストレス関連遺伝子の高発現群と低発現群における RFS および OS は明らかに有意差が認められた（図 6 と図 7）。

RFS に関して、PERK（高発現群; 2527 日, 低発現群; 1992 日,  $P=0.003$ ）、ATF6（高発現群; 2575 日, 低発現群; 1951 日,  $P=0.001$ ）、IRE1（高発現群; 2720 日, 低発現群; 1844 日,  $P<0.001$ ）において高発現群で統計学的有意に長い RFS が認められた。また ERO1L（高発現群; 2435 日, 低発現群; 2117 日,  $P=0.065$ ）においても統計学的有意差はないものの、高発現群で RFS は長い傾向が示された。

OS に関しても同様に、IRE1 において高発現群で統計学的有意に長い OS（高発現群; 3185 日, 低発現群; 2728 日,  $P=0.009$ ）が認められた。また、ERO1L（高発現群; 3008 日, 低発現群; 2968 日,  $P=0.277$ ）、PERK（高発現群; 3013 日, 低発現群; 2962 日,  $P=0.251$ ）、ATF6（高発現群; 2973 日, 低発現群; 2917 日,  $P=0.058$ ）においては、統計学的有意差はないものの、ATF6 高発現群で OS は長い傾向が示された。

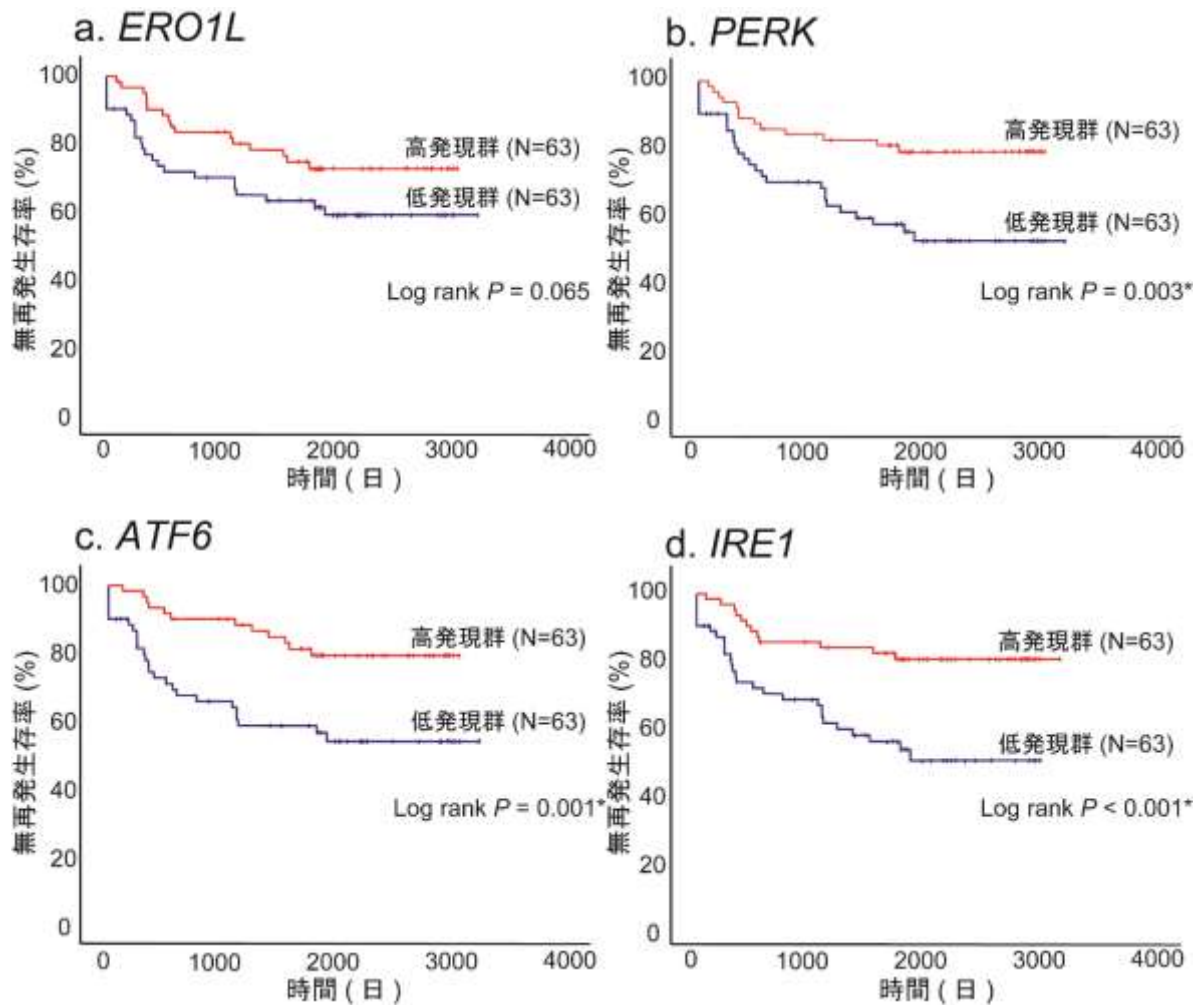


図 6 小胞体ストレス関連遺伝子の発現と RFS

PERK、ATF6、IRE1 においては、高発現群で統計学的有意に長い RFS が認められた。ERO1L においては、統計学的な有意差は見られなかったものの、他の小胞体ストレス遺伝子と同様に高発現群で RFS は長い傾向を示した。



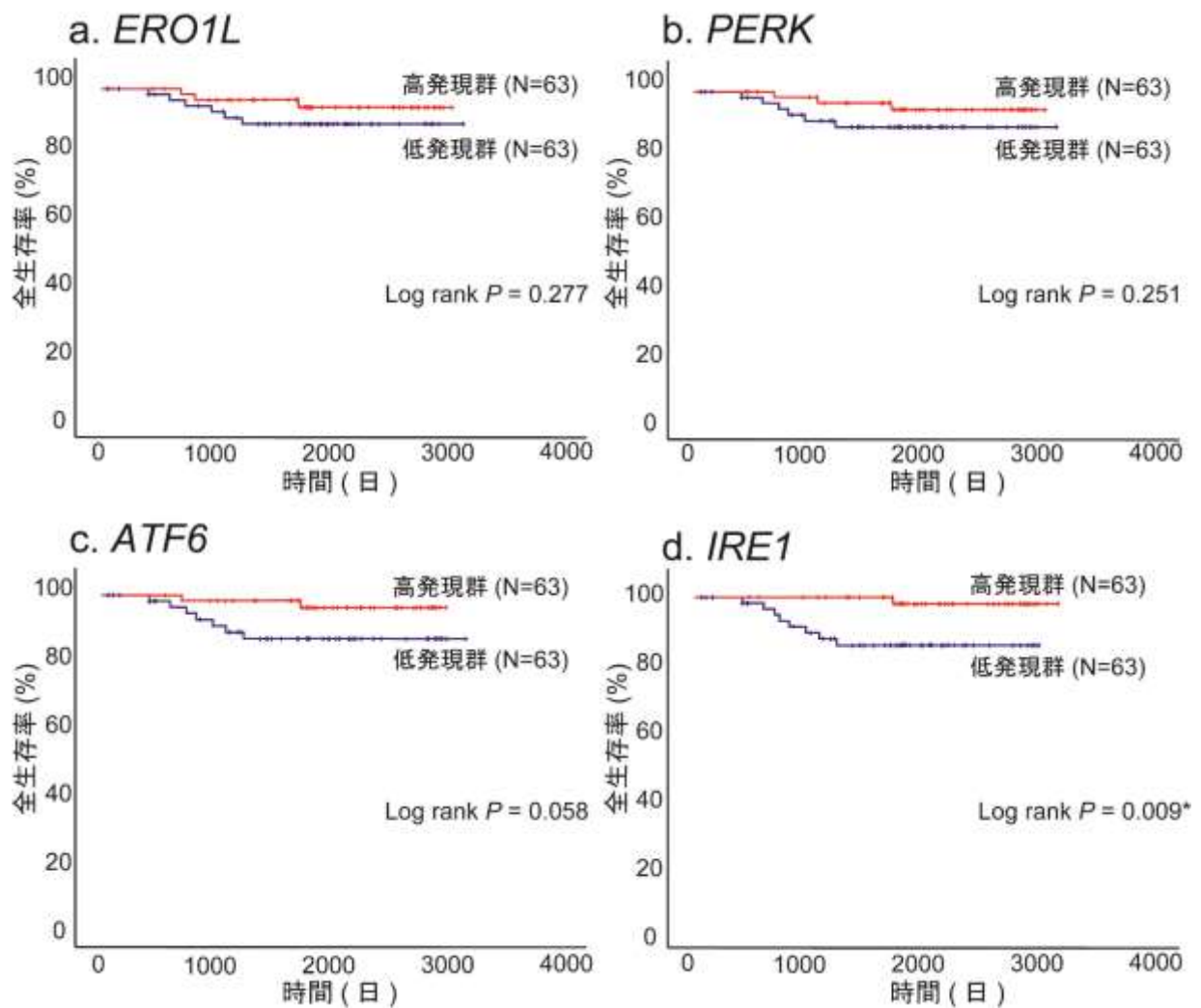


図 7 小胞体ストレス関連遺伝子の発現と OS

IRE1 においては、高発現群で統計学的有意に長い RFS が認められた。ERO1L、PERK、ATF6 においては、統計学的な有意差は見られなかった。IRE1 と同様に ATF6 高発現群で OS は長い傾向を示した。

また、RFS および OS は術後化学療法および EGFR-TKI の影響を受ける可能性があるため、術後化学療法薬（表 3 の背景に含まれる UFT やプラチナ製剤）および EGFR-TKI を除外しても RFS および OS の結果が変わらないか検証した。

術後化学療法薬を使用した UFT26 例およびプラチナ製剤 20 例を除外した RFS および OS の Kaplan-Meier method による解析を図 8 および図 9 に示す。小胞体ストレス関連遺伝子の高発現群と低発現群における RFS は統計学的有意差が認められ、術後化学療法薬を含んだ結果と変わらないものであった。OS においては全症例 126 例で検証した際に統計学的有意差が認められた IRE1 においても、有意差が認められなかったが、Kaplan-Meier 曲線はきれいに分かれており術後化学療法薬を除外した影響というよりは症例数が 86 例と減った事による検出力の低下が原因と考えられた。

また、EGFR-TKI は術後再発に使用するため、EGFR-TKI を使用した 16 例を除外した OS の Kaplan-Meier method による解析を図 10 に示す。小胞体ストレス関連遺伝子の高発現群と低発現群におけ

る RFS および OS は明らかに有意差が認められ、術後化学療法薬を含んだ結果と変わらないものであった。

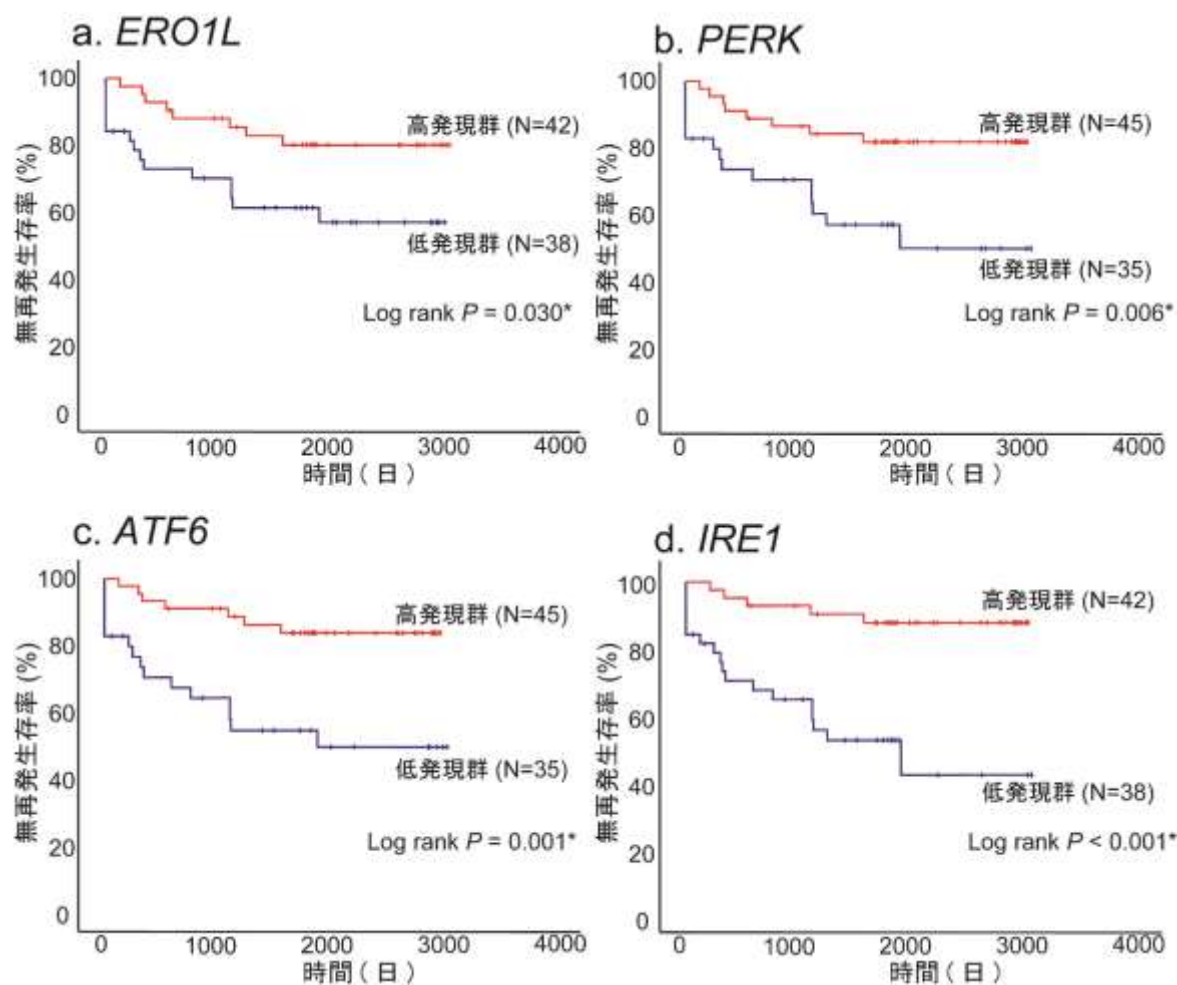


図 8 小胞体ストレス関連遺伝子の発現と RFS（術後化学療法使用例を除外）

術後化学療法使用例 46 例を除外したところ、全症例 126 例での検証と同様に、小胞体ストレス関連遺伝子高発現群で統計学的有意に長い RFS が認められた。

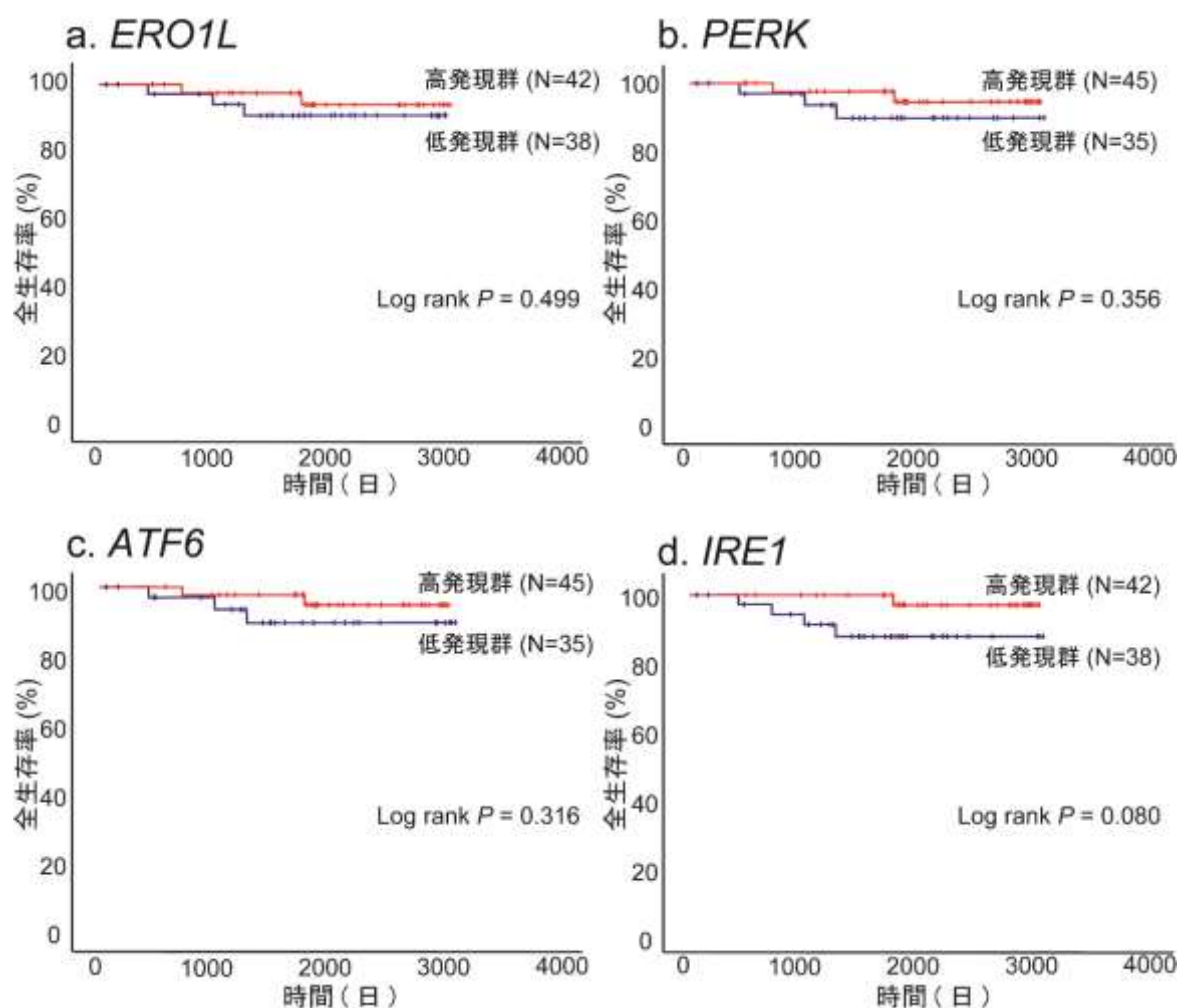


図 9 小胞体ストレス関連遺伝子の発現と OS（術後化学療法使用例を除外）

術後化学療法使用例 46 例を除外したところ、全症例 126 例での検証と同様に、小胞体ストレス関連遺伝子高発現群で OS は長い傾向が認められた。しかし、全症例では有意差がついた IRE1 においても、症例数が 80 例と減ったことによる検出力の低下から統計学的な有意差はつかなかった。

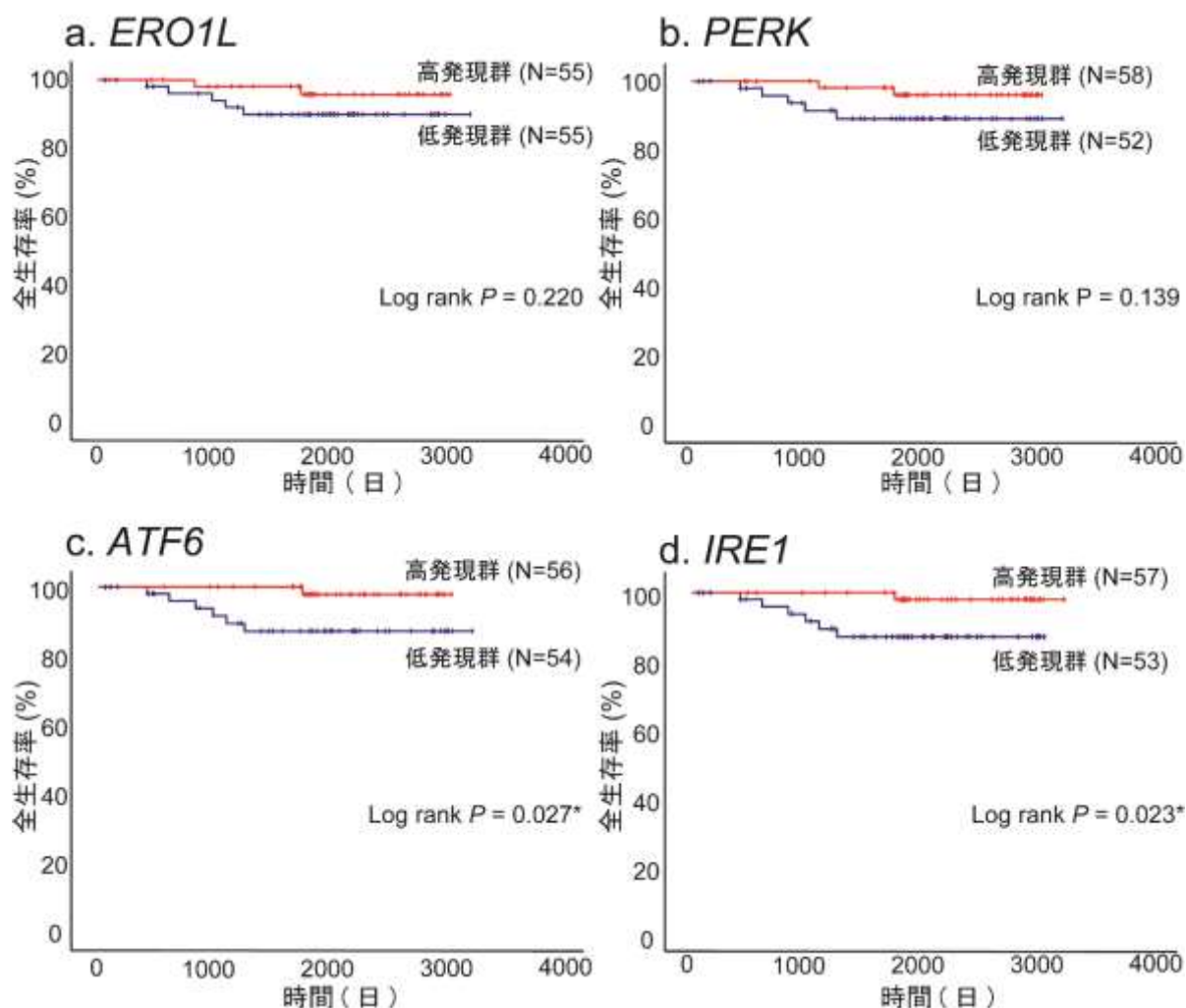


図 10 小胞体ストレス関連遺伝子の発現と OS (EGFR-TKI 使用例を除外)

EGFR-TKI 使用例 16 例を除外したところ、全症例 126 例での検証と同様に、小胞体ストレス関連遺伝子高発現群で OS は長い傾向が認められた。ATF6 および IRE1 においては、高発現群で統計学的有意差をもって長い OS の傾向が示された。

RFS、OS とともに統計学的に有意に高発現群で良好な結果が認められた IRE1 について、病理病期 I 期のみで検討した。病理病期 I 期の肺腺癌患者においても、中央値で高発現群・低発現群に分けることで、IRE1 高発現群の方が低発現に比べて、RFS は長い傾向にあり予後良好な傾向の予測因子となりうる（図 11）ということが示唆されたが、病理病期 I 期は 86 例と総数が減少することで、検出力が低くなってしまったため、統計学な有意差は認められなかった(高発現群; 2918 日, 低発現群; 2461 日,  $P=0.098$ )。

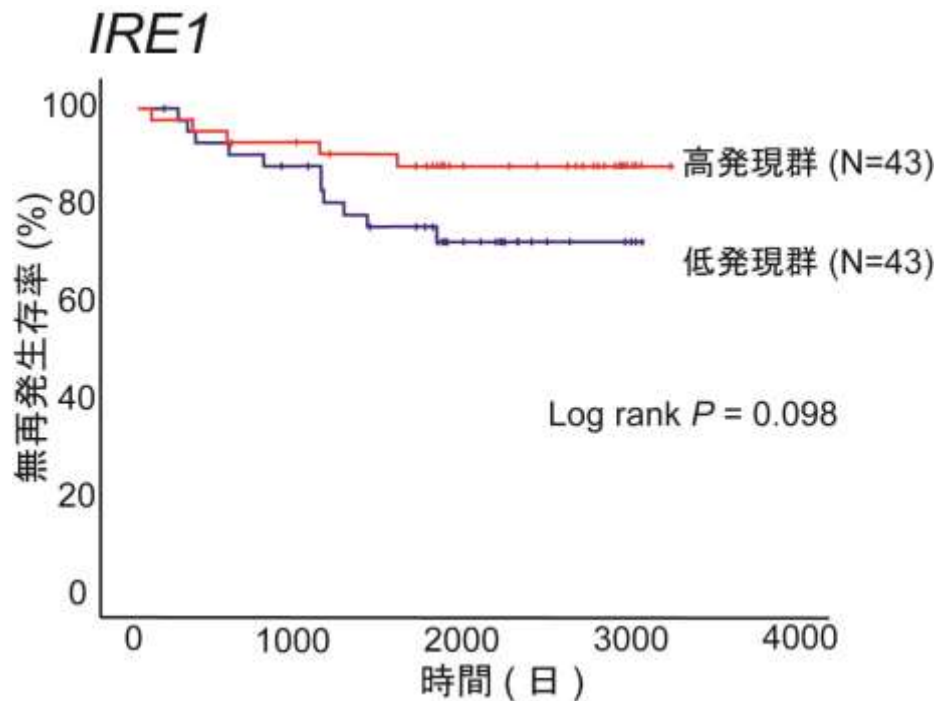


図 11 病理病期 I 期の肺腺癌患者における、IRE1 発現と RFS との関係 (カットオフ値は I 期の IRE1  $\Delta$  Ct 値中央値の -4.75)

病理病期 I 期のみで見ても、IRE1 高発現群の方が低発現群と比べて RFS は長い傾向であった。症例数が少ないこともあり、統計学的には有意な差ではなかった。



そこで、よりよいカットオフ値を導入することで病理病期 I 期の肺腺癌患者の RFS の予測因子として IRE1 発現を利用できないか検証した。ROC 曲線を作成することで、病理病期 I 期の肺腺癌における IRE1 高発現群・低発現群の選別を検討した（図 12）。ROC 曲線からのカットオフ値は理想的な左上隅から最も近い点（ベストポイント）をカットオフ値に設定する方法<sup>63</sup>や、Youden index を用いてカットオフ値を設定する方法<sup>64</sup>などが知られている。図 12 に示したように、ベストポイントから求めた病理病期 I 期の IRE1 のカットオフ  $\Delta$ Ct 値は-5.5 であり、図 13 に示したように Youden index から求めたカットオフ  $\Delta$ Ct 値は-5.79 であった。このカットオフ値を用いて病理病期 I 期の肺腺癌患者の Kaplan-Meier 曲線を書き直したものが図 14 および図 15 であり、ともに統計学的有意差が認められた。以上より、PERK、ATF6、IRE1 の高発現群においては、統計学的に有意に長い RFS が示され、くわえて IRE1 高発現においては統計学的に有意に長い OS が示された。

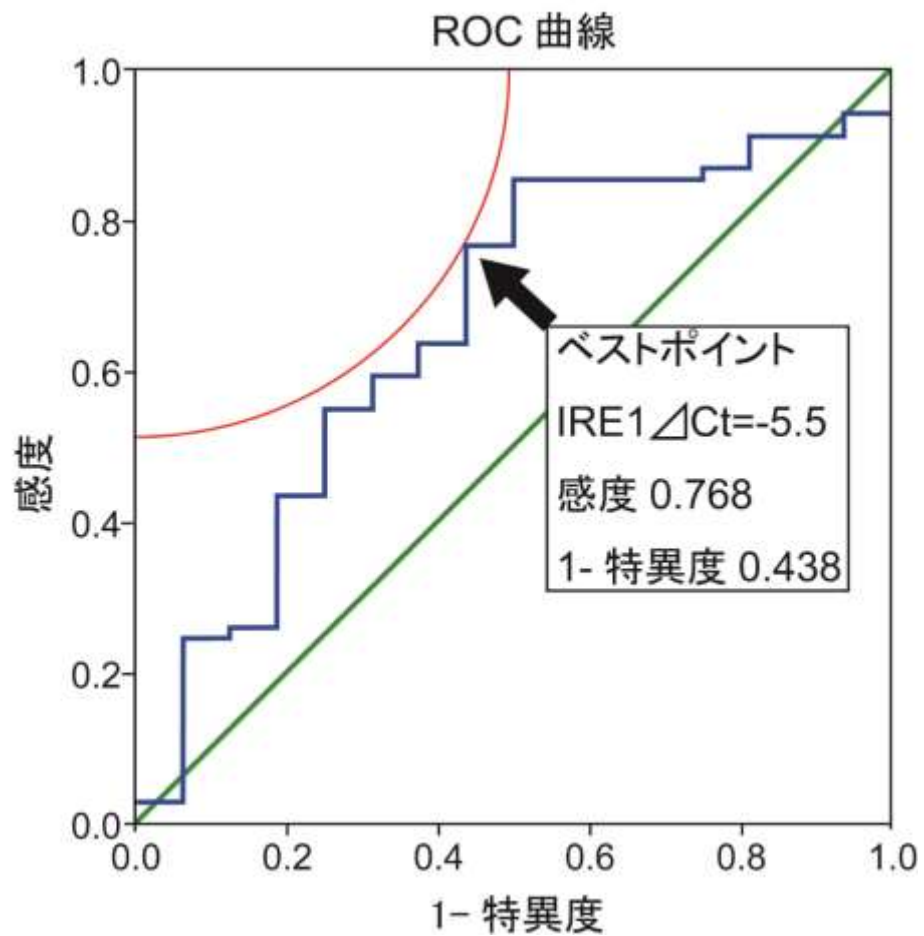


図 12 病理病期 I 期肺腺癌患者における IRE1 発現の ROC 曲線

ROC 曲線（青色）の中で、左上隅から最も近い点は上記図のように感度 0.768、1-特異度 0.438 の点であり、IRE1  $\Delta$ Ct 値は -5.5 であった。赤い円弧は左上隅を中心とした円の 1/4 周を示してある。

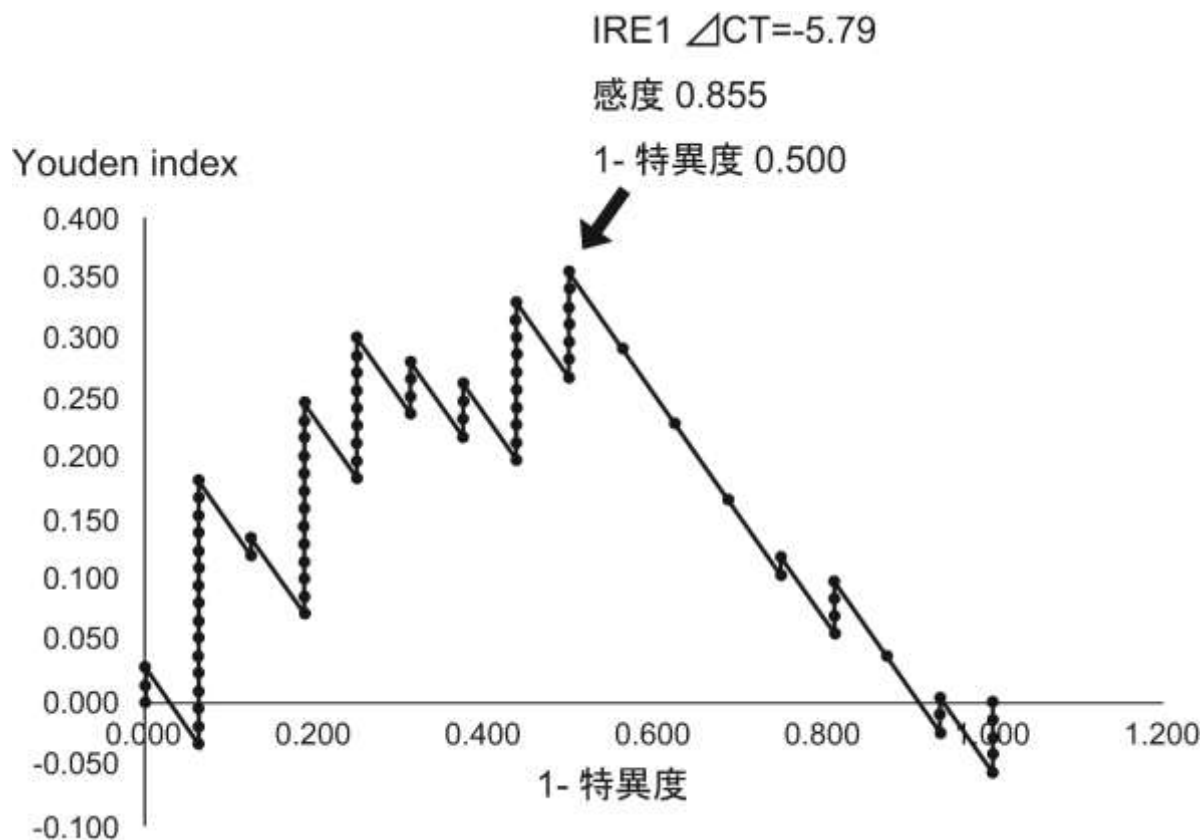


図 13 Youden index によるカットオフ値

Youden index(感度-(1-特異度))によって求めたカットオフ値は上記に示すように、感度 0.855、1-特異度 0.500 の点で、IRE1  $\Delta$ Ct 値は-5.79 であった。

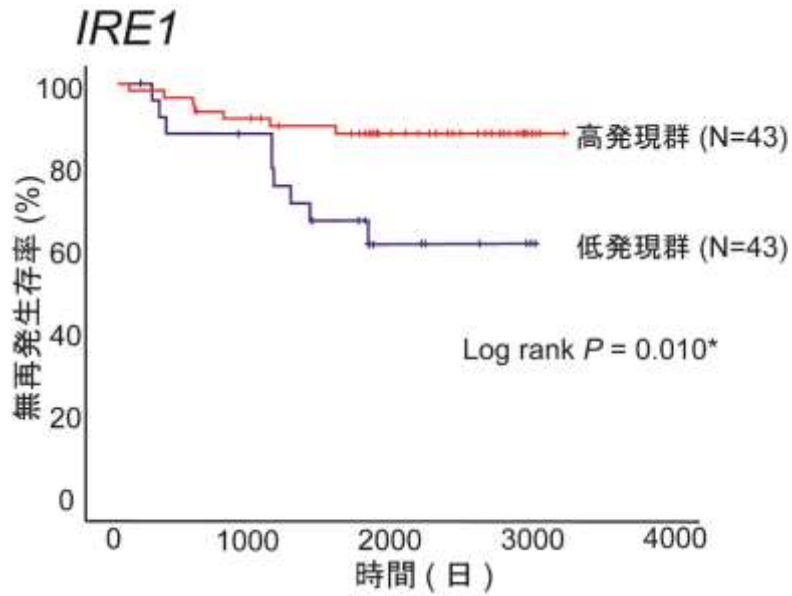


図 14 病理病期 I 期の肺腺癌患者における、IRE1 発現と RFS との関係（カットオフ値はベストポイント IRE1  $\Delta$ Ct 値 -5.5 を使用）

図 10 に比べて、IRE1 高発現群と低発現群の Kaplan-Meier 曲線がよりはっきりと分かれており、統計学的有意差をもって高発現群の RFS が長い傾向が認められた ( $P=0.010$ )。

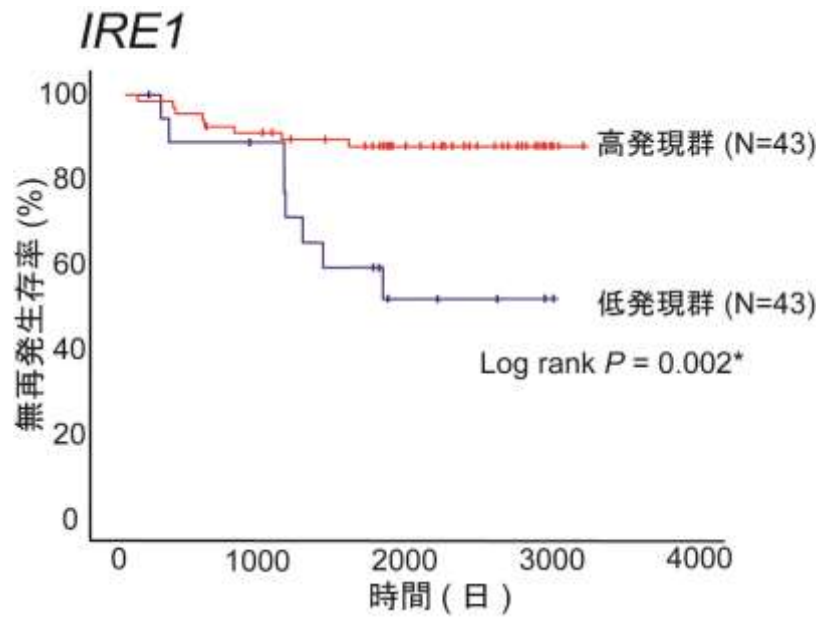


図15 病理病期 I 期の肺腺癌患者における、IRE1 発現と RFS との関係（カットオフ値は Youden index で求めた IRE1  $\Delta$  Ct 値 -5.79 を使用）

図 10 に比べて、IRE1 高発現群と低発現群の Kaplan-Meier 曲線がよりはっきりと分かれており、統計学的有意差をもって高発現群の RFS が長い傾向が認められた ( $P=0.002$ )。

## 考察

### 1 小胞体ストレス関連遺伝子発現の評価法

本研究は、小胞体ストレス関連遺伝子発現と肺腺癌術後予後との間の関係を検証した研究である。小胞体ストレス関連遺伝子が種々の癌の発生・進展に関与しているという報告は認められるものの、小胞体ストレス関連遺伝子発現と肺腺癌の臨床的経過との関係については、有用な報告が少ないのが現状である。そこで我々は、当院における肺腺癌手術検体を用いて、小胞体ストレス関連遺伝子4遺伝子(ERO1L、PERK、ATF6、IRE1)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、これらの遺伝子発現がRFSやOSと関連することを発見した。

乳癌と胃癌における報告では、ERO1L発現がVEGFRなどの血管新生因子発現と関連し、低酸素状況でERO1L発現増加が見られ、また臨床例においてはERO1L高発現群が予後不良であり、本研究の結果とは矛盾した内容であった<sup>49, 50</sup>。また一方で、大腸癌における報告では、ERO1L高発現がMHC class I分子の高発現と相

関し、臨床的に予後良好な可能性があるとのことであった<sup>51</sup>。さらに NSCLC においては、CRT 高発現と臨床的に予後良好と報告されており<sup>55</sup>、それらの報告は本研究結果と類似したものであった。

いままでの報告においては、免疫染色による評価による腫瘍組織におけるタンパク発現と予後との関連について評価している報告<sup>49, 50</sup>が多かったが、本研究においては qRT-PCR による mRNA 発現と予後との関連についたものであり、翻訳の過程での影響が考えられる。ただし、小胞体ストレス遺伝子の mRNA 発現とタンパク発現に相関があったと報告<sup>65-67</sup>されており、本研究前に行った肺癌細胞株から抽出した RNA とタンパクでの発現評価においては、qRT-PCR による mRNA 発現と Western blot 法によるタンパク発現との間には相関が認められた（図 16）。小胞体ストレス関連遺伝子が実際に腫瘍内で発現しているかは、The Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>)における免疫染色での評価で、肺腺癌において腫瘍部分での染色が良好であることを確認した。

小胞体ストレス関連遺伝子発現と癌の臨床経過については論議を呼んでいるところ<sup>68</sup>であり、肺腺癌との関連も不明である。

このように小胞体ストレス関連遺伝子発現が癌の臨床経過に一見矛盾したような結果を示した理由としては、図 17 に示す様に癌種ごとに発現量が異なることが影響している可能性がある。これらの小胞体ストレス関連遺伝子発現は、UPR により小胞体ストレスを軽減することで癌細胞生存に有利に働く可能性がある一方で、過剰な UPR がアポトーシスを誘導し癌細胞生存に不利に働く可能性もある。そのために癌種ごとの臨床経過に対する役割が異なっている可能性が考えられる。

いままでの報告および本研究結果から、小胞体ストレス関連遺伝子高発現群は、UPR によって小胞体ストレスに対する対応力が上がり癌細胞生存に有利に働く側面を持っていると思われる一方で、小胞体ストレス関連遺伝子高発現群は、本研究のように NSCLC においては病期が早期であったり、大腸癌においては癌免疫に関わっていたりと予後良好な側面も持っていることが示唆された。小胞体ストレス関連遺伝子の高発現は単に分化度が高いことの表れである可能性もある。癌種により高発現群のどちらの側面が



より強く表れるかによって、臨床経過が異なっている可能性がある  
と思われた。

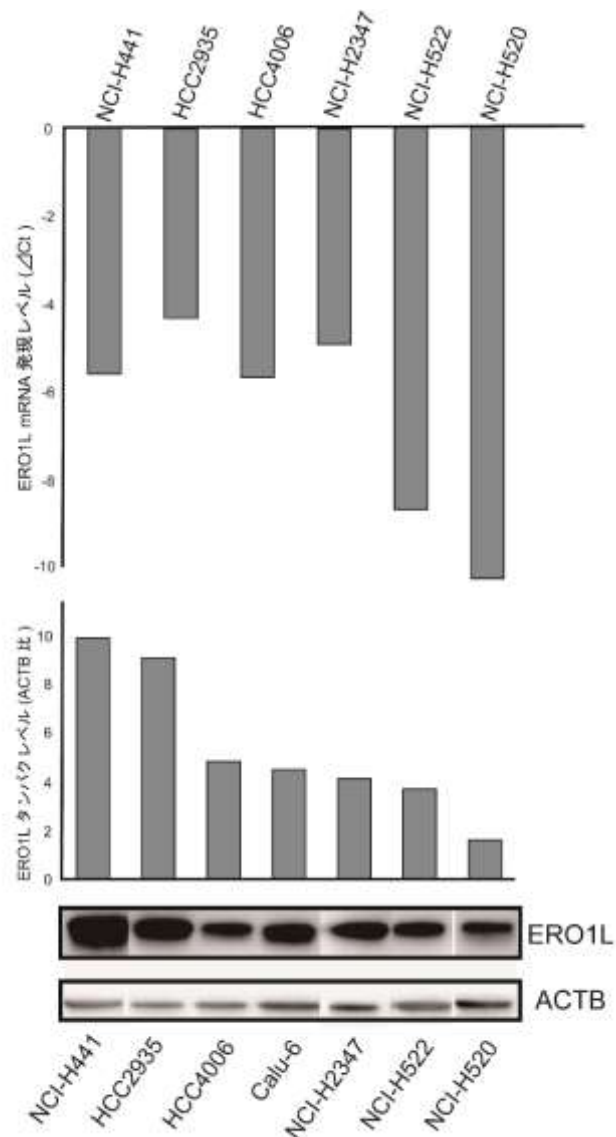


図 16 qRT-PCR による mRNA 発現と Western blot 法によるタンパク発現

肺癌細胞株における ERO1L 発現量を、qRT-PCR による mRNA 発現と、Western blot 法によるタンパク発現とで確認したところ、mRNA 高発現株はタンパク発現も高値であり（図の左方向）、mRNA 低発現株はタンパク発現も低値であった（図の右方向）。

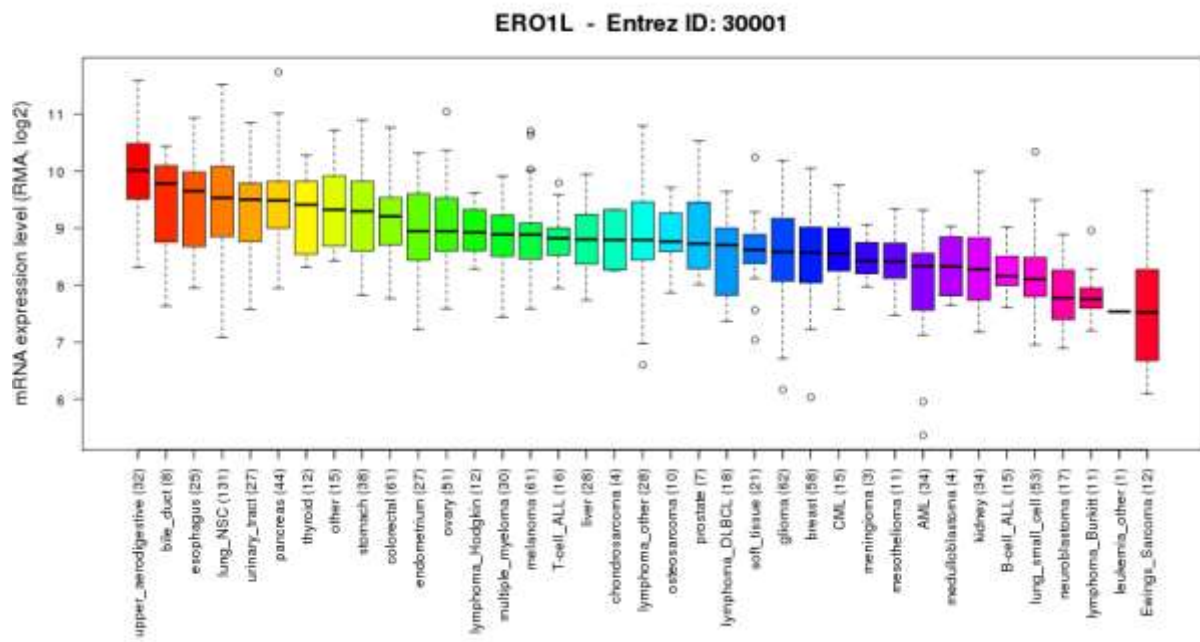


図 17 癌種ごとの ERO1L mRNA 発現量

癌種ごとに ERO1L 発現量をみると、発現量の差は大きい。

NSCLC は比較的高発現であるが（4 番目に発現が大きい癌種）、

同じ癌種であっても症例ごとのばらつきが大きいことがわかる。

引用：Cancer Cell Line Encyclopedia

(<https://portals.broadinstitute.org/ccle/home>)

## 2 IRE1 遺伝子の役割

本研究において、肺腺癌術後検体を用いた評価により IRE1 高発現と低発現の間に RFS、OS において有意な差が認められ、IRE1 発現が独立した予後規定因子であることが示された。他の小胞体ストレス関連遺伝子と比べて IRE1 がより強く RFS や OS といった臨床経過に強く影響を及ぼした。IRE1 は UPR に関与するシャペロンタンパク遺伝子の誘導だけではなく、JNK 経路や NF- $\kappa$ B 経路といった面からのアポトーシス制御といったように、小胞体内のホメオスタシス維持に多方面から影響を及ぼすセンサータンパク<sup>28, 69</sup>であり、他の PERK や ATF6 といったセンサータンパクと異なる部分がある。そのように複数の経路をもつことが他の小胞体ストレス関連遺伝子よりも RFS や OS などの経過に強く寄与した可能性は考えられる。しかし、今までの報告では、小胞体ストレスセンサーの3つの受容体の機能の違いについてはまだはっきりとわかっていなく、癌との関連についての報告も少ない。そのため、IRE1 経路が強く肺腺癌の発生・進展に強く影響を与えているのかについてはさらなる研究が望まれる。

肺腺癌の実臨床においてよく使用される殺細胞性抗癌剤 CDDP によるアポトーシスに、小胞体ストレスなどが関係していることを、肺癌細胞株を用いた実験で示した報告がある<sup>56</sup>。肺癌細胞株のアポトーシスの際に PERK や IRE1 発現が増え、CDDP 耐性に小胞体ストレスが関与している可能性を示唆している。本研究結果でも、同様に IRE1 発現と PERK 発現との間には強い正の相関があり、NSCLC においては他の小胞体ストレス関連遺伝子間よりも PERK と IRE1 との間には何らかのクロストークがある可能性が示唆された。

癌細胞内に低酸素暴露や CDDP 投与といった小胞体ストレスが増強するような微小環境が生じると、癌細胞は UPR を活性化させ小胞体ストレスを減弱させることで、アポトーシスから逃れ、小胞体内のホメオスタシスを保つように働く。UPR は細胞周期を止め、新しいタンパク合成を止めたりすることで折りたたみ不全タンパクの産生を減らすように働く。本研究結果からも IRE1 高発現な癌細胞では細胞周期が遅くなったことが、RFS や OS が長くなるのに寄与した可能性が考えられる。細胞周期は抗癌剤の感受性にも影響するため、IRE1 高発現な癌細胞において細胞周期が遅くなっているた

めに CDDP によるアポトーシスが起こりにくくなっている可能性が考えられる。

### 3 本研究の臨床的意義

本研究によって、肺腺癌手術症例において IRE1 遺伝子の発現低下が予後良好因子であり、肺腺癌の悪性度と相関していることが示された。本研究では簡便な腫瘍部分のリアルタイム PCR による IRE1 発現評価により、術後再発リスクなどを予測することにより、術後補助化学療法の対象患者や使用薬剤の検討などに応用できる可能性がある。

また IRE1 遺伝子発現が術後再発に関係していることより、IRE1 経路と肺腺癌の悪性度との間の関係が今後より解明されることにより、この経路が新たな治療標的となる可能性がある。

## 結語

ヒト肺腺癌手術症例において、腫瘍における小胞体ストレス関連遺伝子高発現が腫瘍の悪性度と相関しており、IRE1 高発現が独立した予後良好因子であることを明らかにした。

## 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、  
東京大学医学部附属病院 検査部 高井大哉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。



## 参考文献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65: 87-108.
- [2] Yang P. Epidemiology of lung cancer prognosis: quantity and quality of life. *Methods Mol Biol.* 2009; 471: 469-86.
- [3] Tanaka F, Yanagihara K, Otake Y, et al. Surgery for non-small cell lung cancer: postoperative survival based on the revised tumor-node-metastasis classification and its time trend. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2000; 18: 147-55.
- [4] Chansky K, Sculier JP, Crowley JJ, Giroux D, Van Meerbeeck J, Goldstraw P. The International Association for the Study of Lung Cancer Staging Project: prognostic factors and pathologic TNM stage in surgically managed non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2009; 4: 792-801.
- [5] 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.* 2004; 64: 8919-23.
- [6] Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature.* 2007; 448: 561-6.
- [7] Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2004; 350: 2129-39.
- [8] Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2010; 363: 1693-703.
- [9] George J, Lim JS, Jang SJ, et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature.* 2015; 524: 47-53.
- [10] Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature.* 2012; 489: 519-25.
- [11] Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature.* 2014; 511: 543-50.
- [12] Butts CA, Ding K, Seymour L, et al. Randomized phase III trial of vinorelbine plus cisplatin compared with observation in completely

- resected stage IB and II non-small-cell lung cancer: updated survival analysis of JBR-10. *J Clin Oncol*. 2010; 28: 29-34.
- [13] Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol*. 2012; 197: 857-67.
- [14] Dorner AJ, Wasley LC, Kaufman RJ. Increased synthesis of secreted proteins induces expression of glucose-regulated proteins in butyrate-treated Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*. 1989; 264: 20602-7.
- [15] Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8: 519-29.
- [16] Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*. 2005; 74: 739-89.
- [17] Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. 1999; 397: 271-4.
- [18] Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*. 2000; 101: 451-4.
- [19] Zinszner H, Kuroda M, Wang X, et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev*. 1998; 12: 982-95.
- [20] Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*. 2010; 140: 900-17.
- [21] Kakiuchi C, Iwamoto K, Ishiwata M, et al. Impaired feedback regulation of XBP1 as a genetic risk factor for bipolar disorder. *Nat Genet*. 2003; 35: 171-5.
- [22] Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*. 2000; 2: 326-32.
- [23] Ma K, Vatter KM, Wek RC. Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*. 2002; 277: 18728-35.
- [24] Shi Y, Vatter KM, Sood R, et al. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit

- kinase, PERK, involved in translational control. *Mol Cell Biol.* 1998; 18: 7499-509.
- [25] Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell.* 2000; 5: 897-904.
- [26] Harding HP, Novoa I, Zhang Y, et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell.* 2000; 6: 1099-108.
- [27] Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* 2001; 107: 881-91.
- [28] Urano F, Bertolotti A, Ron D. IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci.* 2000; 113 Pt 21: 3697-702.
- [29] Fass D. Disulfide bonding in protein biophysics. *Annu Rev Biophys.* 2012; 41: 63-79.
- [30] Frand AR, Kaiser CA. The ERO1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell.* 1998; 1: 161-70.
- [31] Pollard MG, Travers KJ, Weissman JS. Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell.* 1998; 1: 171-82.
- [32] Moolgavkar SH, Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: a model for human carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 1981; 66: 1037-52.
- [33] Bi M, Naczki C, Koritzinsky M, et al. ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *Embo j.* 2005; 24: 3470-81.
- [34] Koumenis C, Wouters BG. "Translating" tumor hypoxia: unfolded protein response (UPR)-dependent and UPR-independent pathways. *Mol Cancer Res.* 2006; 4: 423-36.
- [35] Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010; 140: 883-99.
- [36] Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature.* 2008; 454: 455-62.

- [37] Blais JD, Addison CL, Edge R, et al. Perk-dependent translational regulation promotes tumor cell adaptation and angiogenesis in response to hypoxic stress. *Mol Cell Biol*. 2006; 26: 9517-32.
- [38] Fels DR, Koumenis C. The PERK/eIF2alpha/ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth. *Cancer Biol Ther*. 2006; 5: 723-8.
- [39] Bobrovnikova-Marjon E, Grigoriadou C, Pytel D, et al. PERK promotes cancer cell proliferation and tumor growth by limiting oxidative DNA damage. *Oncogene*. 2010; 29: 3881-95.
- [40] Huber AL, Lebeau J, Guillaumot P, et al. p58(IPK)-mediated attenuation of the proapoptotic PERK-CHOP pathway allows malignant progression upon low glucose. *Mol Cell*. 2013; 49: 1049-59.
- [41] Ye J, Kumanova M, Hart LS, et al. The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *Embo j*. 2010; 29: 2082-96.
- [42] Auf G, Jabouille A, Guerit S, et al. Inositol-requiring enzyme 1alpha is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107: 15553-8.
- [43] Ghosh R, Lipson KL, Sargent KE, et al. Transcriptional regulation of VEGF-A by the unfolded protein response pathway. *PLoS One*. 2010; 5: e9575.
- [44] Koong AC, Chauhan V, Romero-Ramirez L. Targeting XBP-1 as a novel anti-cancer strategy. *Cancer Biol Ther*. 2006; 5: 756-9.
- [45] Papandreou I, Denko NC, Olson M, et al. Identification of an Ire1alpha endonuclease specific inhibitor with cytotoxic activity against human multiple myeloma. *Blood*. 2011; 117: 1311-4.
- [46] Mimura N, Fulciniti M, Gorgun G, et al. Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1alpha is a promising therapeutic option in multiple myeloma. *Blood*. 2012; 119: 5772-81.
- [47] Schewe DM, Aguirre-Ghiso JA. ATF6alpha-Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105: 10519-24.
- [48] Lee AS. GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res*. 2007; 67: 3496-9.

- [49] Kutomi G, Tamura Y, Tanaka T, et al. Human endoplasmic reticulum oxidoreductin 1-alpha is a novel predictor for poor prognosis of breast cancer. *Cancer Sci.* 2013; 104: 1091-6.
- [50] Seol SY, Kim C, Lim JY, et al. Overexpression of Endoplasmic Reticulum Oxidoreductin 1-alpha (ERO1L) is Associated with Poor Prognosis of Gastric Cancer. *Cancer Res Treat.* 2016.
- [51] Kukita K, Tamura Y, Tanaka T, et al. Cancer-Associated Oxidase ERO1-alpha Regulates the Expression of MHC Class I Molecule via Oxidative Folding. *J Immunol.* 2015; 194: 4988-96.
- [52] Dimopoulos MA, San-Miguel JF, Anderson KC. Emerging therapies for the treatment of relapsed or refractory multiple myeloma. *Eur J Haematol.* 2011; 86: 1-15.
- [53] Kepp O, Senovilla L, Galluzzi L, et al. Viral subversion of immunogenic cell death. *Cell Cycle.* 2009; 8: 860-9.
- [54] Obeid M, Panaretakis T, Tesniere A, et al. Leveraging the immune system during chemotherapy: moving calreticulin to the cell surface converts apoptotic death from "silent" to immunogenic. *Cancer Res.* 2007; 67: 7941-4.
- [55] Fucikova J, Becht E, Iribarren K, et al. Calreticulin Expression in Human Non-Small Cell Lung Cancers Correlates with Increased Accumulation of Antitumor Immune Cells and Favorable Prognosis. *Cancer Res.* 2016; 76: 1746-56.
- [56] Shi S, Tan P, Yan B, et al. ER stress and autophagy are involved in the apoptosis induced by cisplatin in human lung cancer cells. *Oncol Rep.* 2016; 35: 2606-14.
- [57] Kuner R, Muley T, Meister M, et al. Global gene expression analysis reveals specific patterns of cell junctions in non-small cell lung cancer subtypes. *Lung Cancer.* 2009; 63: 32-8.
- [58] Crouser ED, Culver DA, Knox KS, et al. Gene expression profiling identifies MMP-12 and ADAMDEC1 as potential pathogenic mediators of pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009; 179: 929-38.
- [59] Meltzer EB, Barry WT, D'Amico TA, et al. Bayesian probit regression model for the diagnosis of pulmonary fibrosis: proof-of-principle. *BMC Med Genomics.* 2011; 4: 70.

- [60] Bhattacharya S, Srisuma S, Demeo DL, et al. Molecular biomarkers for quantitative and discrete COPD phenotypes. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009; 40: 359-67.
- [61] 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.* 2006; 7: 33.
- [62] Groome PA, Bolejack V, Crowley JJ, et al. 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.* 2007; 2: 694-705.
- [63] Akobeng AK. Understanding diagnostic tests 3: Receiver operating characteristic curves. *Acta Paediatr.* 2007; 96: 644-7.
- [64] Fluss R, Faraggi D, Reiser B. Estimation of the Youden Index and its associated cutoff point. *Biom J.* 2005; 47: 458-72.
- [65] Tsai HY, Yang YF, Wu AT, et al. Endoplasmic reticulum ribosome-binding protein 1 (RRBP1) overexpression is frequently found in lung cancer patients and alleviates intracellular stress-induced apoptosis through the enhancement of GRP78. *Oncogene.* 2013; 32: 4921-31.
- [66] Weng S, Zhou L, Deng Q, et al. Niclosamide induced cell apoptosis via upregulation of ATF3 and activation of PERK in Hepatocellular carcinoma cells. *BMC Gastroenterol.* 2016; 16: 25.
- [67] Dadey DY, Kapoor V, Khudanyan A, et al. The ATF6 pathway of the ER stress response contributes to enhanced viability in glioblastoma. *Oncotarget.* 2016; 7: 2080-92.
- [68] Galmiche A, Sauzay C, Chevet E, Pluquet O. Role of the unfolded protein response in tumor cell characteristics and cancer outcome. *Curr Opin Oncol.* 2017; 29: 41-7.
- [69] Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, et al. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev.* 2002; 16: 1345-55.