

博士論文

非小細胞肺癌における

Eukaryotic Elongation Factor 1 Alpha 2 の発現と臨床的意義

東北大学大学院 医学系研究科 医科学専攻

腫瘍制御研究部門 呼吸器外科学分野

川村昌輝

要約

【目的】非小細胞肺癌における eukaryotic elongation factor 1 alpha 2 (eEF1A2) の発現と機能を解析し、eEF1A2 の臨床的意義と治療標的分子としての可能性を明らかにすること。【対象と方法】対象は東北大学病院呼吸器外科で根治的肺切除術を施行した非小細胞肺癌 69 症例。免疫染色と定量リアルタイム RT-PCR により eEF1A2 の発現を検出し、臨床病理学的所見および予後との相関を解析した。eEF1A2 の機能解析として肺腺癌細胞株 A549, PC9, II-18, LCSC#1, H1975 および肺扁平上皮癌細胞株 LK2 を用い、eEF1A2 mRNA 干渉による遊走能、浸潤能、増殖能の変化を解析した。また、eEF1A2 発現や肺癌の予後との関連、細胞遊走能への関与が報告されている matrix metalloproteinase 9 (MMP9) の免疫染色を行い解析した。【結果】非小細胞肺癌における eEF1A2 免疫染色の陽性率は 84.1% (58/69 例) で、eEF1A2 免疫染色陰性は死亡 ($p=0.0026$)、リンパ節転移陽性 ($p=0.0097$) と統計学的に有意な相関を示した。eEF1A2 免疫染色陰性群の 5 年生存率は 22.2%、陽性群は 69.7% で有意差を認め ($p=0.0010$)、eEF1A2 免疫染色陰性は独立した予後不良因子であった (ハザード比 2.71, 95%信頼区間 1.08-6.66, $p=0.0335$)。正常肺組織に対する非小細胞肺癌の eEF1A2 mRNA 相対発現は 0.0028-1515 (中央値 0.55) で、eEF1A2 タンパク発現と相関せず、生存に関する意義は認められなかった。用いた細胞株の中では腺癌細胞株 5 種で eEF1A2 タンパク発現を認めた。RNA 干渉により LCSC#1 で遊走能が低下したが他の細胞株では変化せず、浸潤能、増殖能は全ての細胞株で変化しなかった。MMP9 免疫染色は非小細胞肺癌の 85.5% (59/69 例) で陽性であったが、eEF1A2 免疫染色や予後との相関は認めなかった。【結論】eEF1A2 免疫染色は非小細胞肺癌の予後因子として有用と考えられた。肺癌細胞株の機能解析と切除標本の MMP9 発現解析を行ったが予後因

子として働く機序は解明できず，治療標的分子となることを示唆する結果は得られなかった。

背景

肺癌は本邦ならびに欧米先進諸国における主要な死亡原因の1つである。2013年のWHO報告では年間137万人が肺癌のため死亡しており，悪性新生物による死亡数の部位別順位で男性の第1位，女性の第2位を占めている。¹⁾ 本邦でも肺癌は予後不良な悪性新生物の代表であり，がん死亡において男性の第1位，女性の第2位で，死亡数は今なお上昇傾向にある。²⁾ 他の多くの癌腫と同様，早期発見により外科的完全切除を行うことが最も根治が期待できる治療法であり，術後5年生存率は病理病期IA期86.8%，IB期73.9%，IIA期61.6%，IIB期49.8%，IIIA期40.9%とされている。³⁾ 早期発見に向けた取り組みとして，本邦では胸部レントゲン，喀痰細胞診に加えて，一部地域では胸部CTが肺癌検診として行われている。しかし手術適応となる割合は新規罹患例の約30%にとどまり，^{4) 5)} 過半数が進行がんとして発見され化学療法ないし放射線療法を受けているのが現状である。

非小細胞肺癌の化学療法では，従来の細胞傷害性薬剤に加えて分子標的治療薬の重要性が増している。最初に臨床適用されたEpidermal Growth Factor Receptor-Tyrosin Kinase Inhibitor (EGFR-TKI)のGefitinibに加えて，今日ではEGFR-TKIのErlotinibおよびAnaplastic Lymphoma Kinase-Inhibitor (ALK-I)のCrizotinibが実地臨床で用いられている。これら分子標的治療薬は標的分子の遺伝子変異により，抗腫瘍効果が大きく異なることが知られている。EGFR-TKIの場合，EGFR遺伝子にexon19欠失やexon21 L858R等の点突然変異が存在すると高い感受性を示

す一方で、遺伝子変異のない野生型は感受性が低く、exon20 L790M点突然変異が存在する場合は治療抵抗性を示す。⁶⁻⁸⁾ また、EGFR-TKIは長期投与によって耐性を獲得することが知られている。⁹⁾ ALK-IはEML4-AKL転座がある場合に高い抗腫瘍効果を示す。^{10, 11)} 分子標的治療薬を用いる上では抵抗性遺伝子変異の存在と耐性獲得が大きな問題であり、あらたな標的分子の発見が求められている。

eukaryotic elongation factor 1 alpha (eEF1A)はタンパク合成の転写過程においてアミノアシル化 transfer RNA をリボソームに運搬する働きをもつ、翻訳因子の1種である(図1)。^{12, 13)} ヒトでは6q14.1にコードされるeEF1A1と20q13.3にコードされるeEF1A2の2つのアイソフォームが存在し、構成アミノ酸の92%が相同で、¹⁴⁾ 機能も同等である。¹⁵⁾ しかし正常組織における発現部位は大きく異なり、eEF1A1が骨格筋と心筋を除いたほぼ全ての組織で発現しているのに対して、eEF1A2の発現は骨格筋、心筋、脳に局限している。^{14, 15)} 近年では癌組織におけるeEF1A2の異所性発現や翻訳因子以外の機能が報告され、発癌への関与が疑われている。発癌因子であることを示唆する最初の報告は、卵巣癌の約30%でeEF1A2 mRNA発現が亢進し、eEF1A2過剰発現マウス線維芽細胞の投与により卵巣癌細胞株の増殖が促進したとするAnandらの報告である。¹⁶⁾ 以後、他の癌腫でも研究が行われ、乳癌の約30-60%、膵癌の約80%でeEF1A2が発現しているとされている。¹⁷⁻¹⁹⁾ 肺癌では非小細胞肺癌113例の検討で約30%に発現しているとされるが、²⁰⁾ 解析対象がすべて病理病期I期の症例であり、悪性度の高い症例を含めた場合の詳細は不明である。eEF1A2の異所性作用に関する研究では、発癌に関与し得る機能としてdictyostelium属におけるアクチンリモデリングを介した遊走性亢進作用、²¹⁻²³⁾ 乳癌細胞株におけるPTEN/PI3K/Akt経路を介した細胞増殖能、浸潤能、遊走能亢進作用、²⁴⁻²⁶⁾ 膵癌細胞株におけるmatrix

metalloproteinase 9 (MMP9) 発現を介した遊走能, 浸潤能亢進作用が報告されている。²⁷⁾ しかし一方では発癌に対して抑制的な, 細胞増殖能, 浸潤能抑制作用の報告もみられる。T 細胞リンパ芽球性白血病細胞株において eEF1A は Guanosine-rich GT oligonucleotide と結合して複合体を形成し, 前立腺癌および乳癌細胞株において eEF1A が結合した Guanosine-rich GT oligonucleotide は DNA 複製の抑制や細胞回転の停止, STAT3 合成の抑制により細胞増殖抑制作用をもつことが報告されている。²⁸⁻³²⁾ 乳癌細胞株でリン酸化 Akt 阻害薬により PTEN/PI3K/Akt 経路を阻害し浸潤能が低下した状態では, eEF1A2 siRNA 導入により浸潤能が回復するとされている。²⁶⁾ 以上のごとく eEF1A2 は異所性発現部位や条件により, 増殖能, 遊走能, 浸潤能に対して異なる作用を持つことが示唆される。また, eEF1A2 にはアポトーシスへの関与の報告もみられる。肺癌細胞株において eEF1A2 抑制によりアポトーシスが亢進されることが報告されており, 肺癌では eEF1A2 がアポトーシスに対して抑制的に作用することが示唆される。³³⁾ 一方, 肝細胞癌細胞株では影響を及ぼさないことが報告されており,³⁴⁾ アポトーシスに関しても発現部位により作用が異なるものと考えられる。

癌組織において, あるタンパクの発現が亢進し発癌に寄与している場合, 肺癌における EGFR のように, その機能を抑制することで癌の治療効果が得られると考えられる。また, 正常組織での発現が少なければ機能抑制による正常組織の傷害性が低く抑えられ, 治療の際に優れた特性となることが期待される。以上の点より, 正常組織での発現が極めてわずかに限局している eEF1A2 を肺癌治療における新たな標的分子候補と捉え機能解析を行うことは, 今後の肺癌治療において大きな意義をもつものとする。本研究では非小細胞肺癌における eEF1A2 の発現を検出し臨床病理学的意義を解析するとともに, eEF1A2 の異所性作用として細胞増殖能, 遊走能, 浸潤

能に着目し，細胞株を用いて機能解析を行った．また，膀胱癌で eEF1A2 と関連し遊走能，浸潤能を調節すると報告された MMP9 は，²⁷⁾ 組織基底膜の IV 型コラーゲンを分解し癌細胞の遊走能，浸潤能を調節するゼラチン分解酵素であり，³⁵⁾ 肺癌でも予後に相関するとの報告があるため，³⁶⁾ eEF1A2 発現との関連や臨床的意義について解析した．

目的

非小細胞肺癌における eEF1A2 の発現と機能を解析し，eEF1A2 発現の臨床的意義と，治療標的分子としての可能性を明らかにすること．

対象と方法

症例

対象は 2000 年 10 月から 2004 年 12 月までに東北大学病院呼吸器外科で根治的肺切除術(肺葉切除ないし肺全摘および系統的縦隔リンパ節郭清)を施行し，5 年以上の長期予後が判明している非小細胞肺癌 69 症例．これらのパラフィン包埋標本および凍結標本を用いて免疫染色と定量リアルタイム RT-PCR を行い，臨床病理学的所見および予後との相関を解析した．定量リアルタイム RT-PCR で相対的 eEF1A2 mRNA 発現を求めるための基準サンプルには，2010 年 1 月から 2011 年 12 月までに東北大学病院呼吸器外科で肺腺癌 46 症例の根治的肺切除術を施行した際に採取した正常肺組織の凍結標本を用い，46 症例の平均値を基準値とした．なお，本研究に関しては東北大学病院倫理委員会の承認を得ている．

免疫染色

ホルマリン固定後パラフィン包埋された切除標本を $3\mu\text{m}$ に薄切し、キシレンとアルコールで脱パラフィン、脱水した。eEF1A2 染色では 0.01% EDTA (pH8.0) 中で 15 分間、MMP9 染色では 0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中で 20 分間、500W の電子レンジで加熱して抗原賦活した。3%過酸化水素加メタノールと 15 分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼを不活化した。10%ヤギ正常血清と 10 分間反応させブロッキングした。一次抗体を、抗 eEF1A2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, CA, US) は 1/50, 抗 MMP9 抗体 (Abcam, Cambridge, UK) は 1/100 に 1.5%ヤギ正常血清で希釈し、 4°C で一晩反応させた。二次抗体および発色試薬にヒストファイン SAB-PO(R) キット (ニチレイバイオサイエンス, 東京, 日本) を使用し、ビオチン標識抗ウサギ抗体, ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン, ギアミノベンジジンと反応させ発色させた。ヘマトキシリンで対比染色を行った。

免疫染色の評価は2名の医師が盲検法にて行い、染色強度と陽性細胞の割合を各々スコア化した。染色強度を”Intensity Score (IS)”とし、陰性を IS0, 400 倍拡大視でなければ陽性と判断できない場合を弱陽性 IS1, 40 倍拡大視で容易に陽性の判断が可能な場合を強陽性 IS3, 弱陽性と強陽性の中間を中等度陽性 IS2 とした。また、陽性細胞の割合を”Proportion Score (PS)”とし、陽性細胞が 10%未満を PS0, 10%以上 25%未満を PS1, 25%以上 50%未満を PS2, 50%以上を PS3 とした。免疫染色の陽性基準は PS2 以上かつ IS2 以上と定義した。³⁶⁾ 以上の評価を、eEF1A2 染色では癌細胞, MMP9 染色では癌細胞および腫瘍の間質を構成する細胞について行い、MMP9 染色では癌細胞と腫瘍間質のいずれかが陽性基準を満たした場合に陽性とした。

定量リアルタイム RT-PCR

RNA 抽出試薬に ISOGEN (ニッポンジーン, 東京, 日本) を用い, フェノール・クロロホルム法により RNA を抽出した. 凍結組織標本 50-100mg または 5×10^6 cells の細胞ペレットを ISOGEN 1mL で溶解しタンパク質を変性させた. クロロホルムを 0.2mL 加え遠心し, RNA が溶解した水相を分離した. イソプロパノールおよび 70%エタノールで洗浄, 遠心してフェノールを除去し, RNA を DNase/RNase-free water で溶解した. 吸光光度法により RNA 濃度を測定した.

逆転写ポリメラーゼ反応には High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, CA, US) を用いた. 37°C , 120 分間の逆転写反応により, $2\mu\text{g}$ の RNA から $20\mu\text{L}$ の cDNA 溶液を作成した.

PCR 試薬は TaqMan[®] Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, CA, US) を, Primer/Probe は eEF1A2, MMP9, eukaryotic 18S に対する TaqMan[®] Gene Expression Assay (Applied Biosystems, CA, US) を使用した (配列未公開). 2x TaqMan Gene Expression Master Mix $10\mu\text{L}$, 20x TaqMan[®] Gene Expression Assay $1\mu\text{L}$, Nuclease-free water $7\mu\text{L}$ と cDNA 溶液 $2\mu\text{L}$ を混合し, 95°C で 15 秒の熱変性と, 60°C で 1 分間のアニーリングおよび伸長反応を 40 サイクル行った. 以下の比較 C_T 法により相対的ターゲット遺伝子発現量を算出した.³⁷⁾

ターゲット遺伝子の C_T 値を $C_T(\text{target gene})$, 内在性コントロール遺伝子 eukaryotic 18S の C_T 値を $C_T(\text{control gene})$ とし,

$$\Delta C_T = C_T(\text{target gene}) - C_T(\text{control gene})$$

と定義した. 次に未知サンプルの ΔC_T 値を $\Delta C_T(\text{unknown})$, 基準サンプルの ΔC_T 値を $\Delta C_T(\text{calibrator})$ とし,

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_T(\text{unknown}) - \Delta C_T(\text{calibrator})$$

と定義した。内在性コントロール遺伝子に対するターゲット遺伝子の発現率を下式により計算した。

$$\text{Relative expression ratio} = (1/2)^{\Delta \Delta C_T}$$

細胞株

肺腺癌細胞株 A549, H1975 (理化学研究所バイオリソースセンター, 茨城, 日本), PC9 (免疫生物研究所, 群馬, 日本), H1975 (American Type Culture Collection, VA, US), LCSC#1, 肺扁平上皮癌細胞株 LK2 (東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センター, 宮城, 日本) および正常ヒト気管支上皮細胞株 NHBE (Lonza Walkersville, Basal, Switzerland) を用いた。培養培地として, 肺癌細胞株には RPMI Medium1640[®] と 10% Fetal Bovine Serum (Invitrogen, CA, US) を, NHBE には BEGM[™] と BEGM SingleQuots[®] (Lonza Walkersville, Basal, Switzerland) を使用し, 37°C, 5% CO₂ で培養した。サブコンフルエントとなった時点で 0.25% Trypsin, 1mM EDTA・4Na (Invitrogen, CA, US) を用い継代した。継代は 10 回を限度とした。

Western Blotting

プロテアーゼ阻害剤およびフォスファターゼ阻害剤を溶解した細胞溶解液 (1M Tris-HCl, 200mM NaCl, 2.5mM MgCl₂, 0.05% Nonidet P-40, pH7.4) を使用して培養細胞からタンパク質を抽出した。吸光光度法によりタンパク質濃度を測定し, タンパク質 10 μg を含むサンプルに等量の 2x SDS サンプルバッファ (125mM Tris-HCl, 4% SDS, 20% Glycine, 3.1% 203DTT, 10% β-Mercaptoethanol, 0.01% bromophenol

blue)を加え 100°Cで 10 分間ボイルした。室温, 200V で 30 分間の SDS-PAGE によりサンプルを分離し, 4°C, 70V で 2 時間の電気泳動により Polyvinylidene difluoride (PVDF)膜に転写した。5% Nonfat dry milk で 1 時間ブロッキングした。一次抗体を, 抗 eEF1A2 抗体 (Abcam, Cambridge, UK)は 1µg/mL, 抗 β-actin 抗体 (Cell Signaling Technology, MA, US)は 1/1000 に 5%正常ウシ血清で希釈し, 4°Cで一晩反応させた。PVDF 膜を洗浄後, 二次抗体のヤギ抗ウサギ IgG (Abcam, Cambridge, UK および Cell Signaling Technology, MA, US)を 5% Nonfat dry milk で 1/2000 希釈し, 室温で 1 時間反応させた。ECL prime (GE healthcare life sciences, NJ, US)を用いてシグナルを検出した。

RNA 干渉

short interfering RNA (siRNA)は Silencer® select siRNA (Applied Biosystems, CA, US)の EEF1A2 (siRNA ID : s4480, 5'-ACCGCGACUUCAUCAAGAAAtt-3' (sense) and 5'-UUCUUGAUGAAGUCGCGGUgg-3' (antisense))および Negative Control #1 (配列非公開), 導入試薬は Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen, CA, US)を使用した。導入時の濃度を siRNA 5nM, 導入試薬 3µL/mL とし, Opti-MEM I Reduced-Serum Medium (Invitrogen, CA, US)で希釈した。培養細胞から 1.0×10^5 -cells/mL の細胞浮遊液を作成し, siRNA と導入試薬に細胞浮遊液を混合した。siRNA 非導入コントロールには siRNA と導入試薬の代わりに Opti-MEM I Reduced-Serum Medium を用いた。37°C, 5% CO₂ で 48 時間培養した。

導入後 48 時間後, 上記の定量リアルタイム RT-PCR により mRNA ノックダウン効率を求めた。その際, RNA 抽出と逆転写ポリメラーゼ反応に代えて TaqMan® Gene

Expression Cells-to-Ct™ Kit (Applied Biosystems, CA, US)を使用した。

siRNA 導入後の細胞株を用いて Western blotting および、細胞増殖能、遊走能、浸潤能アッセイを行った。Western blotting と増殖能アッセイでは siRNA 導入 48 時間後に培地を交換してさらに 24 時間培養し、導入 72 時間後にアッセイを行った。

細胞増殖能、遊走能および浸潤能アッセイ

増殖能アッセイには CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, WI, US) を使用し、eEF1A2 siRNA を導入した細胞の増殖能を比色定量法により評価した。96-well プレート上で siRNA を導入し、72 時間後に CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution Reagent 20 μ L を加え、37°C、5% CO₂ で 1 時間反応させ、490nm の吸光度を測定した。

遊走能および浸潤能アッセイには CytoSelect™ 24-well Cell Migration and Invasion Assay (CELL BIOLABS, CA, US) を用い、8 μ m 孔の空いたチャンバーを通過する細胞数を蛍光定量法により検出することで、siRNA を導入した細胞の遊走能および浸潤能を評価した。6-well プレート上で siRNA を導入し、48 時間後に無血清培地で 1.0x10⁶ cells/mL の細胞浮遊液を作成した。各アッセイプレートの upper chamber に細胞浮遊液 300 μ L、lower well に培地 500 μ L を入れ、Migration アッセイでは 24 時間、Invasion アッセイでは 48 時間培養した。各アッセイプレートの新しい well に Cell Detachment Solution 225 μ L を入れ、培地を除去した upper chamber を移し、37°C で 30 分反応させた。upper chamber を振盪し底面に付着した細胞を剥がし、upper chamber を除いた。4x lysis buffer/CyQuant GR Dye 75 μ L を加え室温で 20 分反応させた。各 well のサンプルを新しい 96-well プレートに 200 μ L ずつ移し、

480nm/520nm の蛍光比 (Relative Fluorescence Unit : RFU) を測定した.

統計学的検討

割合, 平均値, 中央値の単変量解析ではそれぞれカイ二乗検定, Student の t 検定, Wilcoxon 順位和検定を行った. 生存解析では生存期間の起点を手術日, 終点を死亡日ないし最終生存確認日, アウトカムを全死亡として Kaplan-Meier 曲線を描出し, 群間の比較には log-rank 検定を行った. 多変量解析では Cox の比例ハザードモデルによる解析を行った. p 値が 0.05 未満の場合に統計学的有意差ありとした. 全ての解析で統計ソフト JMP10 (SAS Institute, NC, US) を用いた.

結果

対象症例の内訳

対象とした非小細胞肺癌 69 症例の一覧を表 1 に, まとめを表 2 に示す. 年齢 30-82 歳(中央値 69 歳), 男:女=50:19, 腺癌:扁平上皮癌=50:19, 観察期間は 3.8-138.4 ヶ月(中央値 52.5 ヶ月)で, 27 例が再発し, 34 例が死亡していた. 全体の 5 年生存率は 63.5%, 病理病期別では I 期 72.2%, II 期 75.0%, III 期 40.1%であった(図 2). II 期は症例数が 12 例と少なく, 生存率が I 期を上回っていたが, 統計学的有意差は認めなかった($p=0.9361$, log-rank 検定).

非小細胞肺癌の eEF1A2 タンパク発現

eEF1A2 免疫染色の陽性コントロール(大脳皮質), 陰性コントロール(正常肺)および各 Intensity Score, Proportion Score の代表的顕微鏡像を図 3 に, 各症例の免疫

染色スコアを表 1 に示す. 正常肺では eEF1A2 免疫染色は陰性であり (図 3A), 肺癌切除標本では eEF1A2 発現は 2 例を除き細胞質に局限し, 腫瘍間質は全ての症例で陰性であった (図 3B, IS2 および 3). また, eEF1A2 陽性細胞の腫瘍内の分布は多くの症例で不均一であり, 特に線維化の強い腫瘍では陽性細胞の偏在が著しかった. 免疫染色陽性率は 84.1% (58/69 例) であった.

eEF1A2 免疫染色の結果と臨床病理所見および予後について単変量解析した結果を表 3 に示す. eEF1A2 免疫染色陰性例では死亡 ($p=0.0026^*$, カイ二乗検定), リンパ節転移 ($p=0.0097^*$, カイ二乗検定), リンパ管浸潤 ($p=0.0097^*$, カイ二乗検定) が多かった. これらの結果から, eEF1A2 タンパク発現陰性はリンパ節転移陽性と関連し, その結果予後不良となる可能性が考えられた. 年齢, 性別, 組織型, T 因子, 血管浸潤に関しては有意差を認めなかった.

非小細胞肺癌の eEF1A2 mRNA 発現

各症例の正常肺組織に対する eEF1A2 mRNA 相対発現を表 1 に示す. 相対発現量の範囲は 0.0028-1515 (中央値 0.55) で, 1 倍以上の症例は 40.6% (28/69 例) であった. 免疫染色陽陰性との相関を検定したところ, 統計学的に有意な相関は認めなかった ($p=0.6404$, Wilcoxon 順位和検定).

mRNA 発現と臨床病理所見, 予後についての単変量解析では, 腺癌の mRNA 発現が扁平上皮癌と比較して高値であった ($p=0.0078^*$, Wilcoxon 順位和検定). しかし免疫染色の解析結果と異なり, 生存やリンパ節転移との関連は認められなかった (表 3).

eEF1A2 タンパク発現と非小細胞肺癌の予後

年齢、性別、組織型、T 因子、N 因子、リンパ管浸潤、血管浸潤、eEF1A2 免疫染色について log-rank 検定を行った結果を表 4 に示す。eEF1A2 免疫染色結果別の 5 年生存率は陽性群 69.7%、陰性群 22.2%で有意差を認め(p=0.0010*)、全体の 5 年生存率が 63.5%であることから、eEF1A2 免疫染色陰性は予後不良因子であると考えられた。免疫染色の結果に基づく Kaplan-Meier 曲線を図 3 に示す。N 因子についても有意差を認め(p=0.0244*)、リンパ節転移陽性群の予後が不良という妥当な結果であった。Cox の比例ハザードモデルによる多変量解析では eEF1A2 免疫染色陰性(ハザード比 2.71, 95%信頼区間 1.08-6.66, p=0.0335*)および pN1-2(ハザード比 4.07, 95%信頼区間 1.06-14.63, p=0.0408*)が統計学的に有意な因子であり、eEF1A2 免疫染色陰性が独立した予後因子であることが示された(表 5)。

肺癌細胞株における eEF1A2 発現

eEF1A2 の機能解析にあたり、eEF1A2 が発現している細胞株を選択するため、まず eEF1A2 発現解析を行った。eEF1A2 タンパク発現を Western blotting により確認したところ、腺癌細胞株の 5 種全てで eEF1A2 シグナルを認めた。扁平上皮癌細胞株 LK2 では eEF1A2 シグナルを認めなかった(図 4A)。

次に正常気管支上皮細胞に対する eEF1A2 mRNA 相対発現を定量リアルタイム PCR 法により求めた。腺癌細胞株では A549 105, PC9 278, II-18 1878, LCSC#1 1513, H1975 1192 と、今回用いた 5 細胞株全てで eEF1A2 mRNA 発現が著明に亢進していた。一方、扁平上皮癌細胞株 LK2 は 1.7 で正常気管支上皮細胞とほぼ同等であった(図 4B)。mRNA 発現 1000 以上の H1975 よりも mRNA 発現の低い A549, PC9 でより強いシグナルを認め、切除標本と同様にタンパクと mRNA が相関しない細胞株が存在した。

細胞増殖能, 遊走能, 浸潤能に対する eEF1A2 抑制の効果

eEF1A2 タンパクが発現していた肺腺癌細胞株 5 種の, eEF1A2 siRNA 導入による mRNA ノックダウン効率は, 5 種全ての細胞株で 90%以上であることを定量リアルタイム RT-PCR により確認した(図 5A). 続いて, eEF1A2 siRNA 導入による eEF1A2 タンパク発現への影響を確認したところ, A549, II-18, LSCS#1 ではタンパクレベルでも発現が低下していたが, PC9, H1975 では低下しておらず, 一部の細胞株で mRNA とタンパクの抑制効果が一致しなかった(図 5B).

遊走能アッセイの結果, eEF1A2 タンパク発現が抑制された肺腺癌細胞株 LCSC#1 の遊走能低下を認めたものの($p=0.0057^*$, Student の t 検定), 他の細胞株 4 種では有意な変化は認めなかった(図 6A). また, 増殖能および浸潤能アッセイでは, 5 種全ての肺腺癌細胞株で eEF1A2 siRNA 導入による細胞増殖能, 浸潤能の有意な変化は認めなかった(図 6B, C).

非小細胞肺癌における eEF1A2 と MMP9

MMP9 免疫染色を行ったところ, 陽性率は 85.5% (59/69 例)であった. MMP9 免疫染色陽性例を図 8 に示す. eEF1A2 免疫染色との相関を検定したが有意な相関は認めなかった($p=0.7118$, カイ二乗検定). MMP9 免疫染色と年齢, 性別, 組織型, T 因子, N 因子, リンパ管浸潤, 血管浸潤, 死亡との間にも関連は認めなかった(表 6).

考察

肺癌における eEF1A2 発現とその意義については, ほとんど研究が行われていない.

Li らは非小細胞肺癌切除症例 113 例を対象に eEF1A2 免疫染色を行い、28%が陽性であったと報告しているものの、病理病期 I 期という極めて限定された症例のみが対象であった。²⁰⁾ 本研究は病理病期 I から III 期までを広く対象として、肺癌における eEF1A2 の発現と臨床的意義を検討した最初の報告である。

eEF1A2 発現解析の結果、eEF1A2 免疫染色陰性はリンパ節転移陽性と相関し、肺癌術後の独立した予後不良因子であることが判明した。eEF1A2 発現と予後の相関については癌腫により異なる結果が報告されており、乳癌、卵巣癌では eEF1A2 mRNA 発現が予後良好因子とされる一方で、^{17, 38)} 膵癌では eEF1A2 タンパク発現が予後不良因子とされている。³⁹⁾ eEF1A2 とリンパ節転移についても異なる結果が報告されており、Kulkarni らは乳癌において eEF1A2 mRNA 発現とリンパ節転移に相関を認めないとし、¹⁷⁾ Hu らは膵癌において eEF1A2 タンパク発現例はリンパ節転移が多いとしている。³⁹⁾ eEF1A2 の異所性作用である細胞増殖能、遊走能、浸潤能も発現部位によって異なる結果が報告されており、これらの作用が肺癌の予後やリンパ節転移に関与しているのではないかと考え、肺癌細胞株における eEF1A2 抑制の増殖能、遊走能、浸潤能への影響と切除標本における MMP9 発現を解析したが、予後やリンパ節転移に影響する機序は解明できなかった。eEF1A2 の異所性作用であるアポトーシスについては今回解析していないが、肺癌細胞株では eEF1A2 がアポトーシスに抑制的に作用すると報告されており、³³⁾ eEF1A2 タンパク発現陰性が予後不良因子となる原因とは考えにくい。また、eEF1A2 は翻訳因子であることから eEF1A2 過剰発現が予後や転移に関連するタンパクの発現量を変化させる可能性が考えられる。しかし B リンパ球前駆細胞株において eEF1A2 過剰発現は総タンパク発現量に影響しないことが報告されており、⁴⁰⁾ 肺癌で総タンパク発現量に影響するかどうかは明らかでない。

以上のように、eEF1A2 が肺癌の予後に影響する機序を本研究の結果とこれまでの報告から説明することはできないが、他にもいくつかの仮説が考えられる。第一に、eEF1A2 発現が抗癌剤の感受性に影響を及ぼすことで、eEF1A2 発現陰性例の術後補助化学療法や再発後化学療法の治療効果が減弱し予後が不良となった可能性がある。抗癌剤が eEF1A2 の作用に影響を及ぼすことの示唆として、小細胞肺癌などの治療に用いられるトポイソメラーゼ II 阻害薬の etoposide が eEF1A2 をアセチル化することが報告されている。⁴¹⁾ eEF1A2 のアセチル化がどのような作用に影響するのかは明らかでないが、抗癌剤により eEF1A2 が転写後修飾を受けるとすれば、抗癌剤の作用機序に関与し、治療効果に影響している可能性は十分に考えられる。第二に、eEF1A2 が血管新生に抑制的に作用することで、発現陰性例の予後が不良となる可能性が考えられる。血管新生は多くの癌腫と同様に肺癌でも発癌と治療において重要な役割を果たしており、^{42, 43)} eEF1A2 と血管新生の関連は検討に値する。また、eEF1A2 は見かけ上の予後因子で、eEF1A2 の発現量を調節する真の予後因子が存在している可能性も考えられる。発癌に関与する細胞内シグナル伝達経路である Ras/Raf/ERK1/2 経路のなかで、⁴⁴⁾ C-Raf の発現抑制により eEF1A2 の発現とリン酸化が抑制されることが報告されている。^{33, 45)} eEF1A2 がサロゲートマーカーであるとするれば真の予後因子を探索することは困難だが、検討課題の一つである。

eEF1A2 mRNA の検討では、mRNA 発現量は免疫染色の結果と相関せず、予後やリンパ節転移との関連も認めなかった。タンパクと mRNA の発現量が相関しない例はこれまでも報告されており、Chen らは肺腺癌 76 例を用いて 98 遺伝子がコードするタンパクと mRNA について検討し、発現量が相関するのは 21.4% (21/98 遺伝子) であるとしている。⁴⁶⁾ eEF1A2 タンパクと mRNA の発現量の相関については報告が極めて少なく、

Tomlinson らが卵巣癌 13 例について解析し、mRNA 発現亢進がタンパク発現の有無と
相関しない可能性を示唆しているのみである。³⁸⁾ タンパク発現量が mRNA 量に依存し
ない機序としては、mRNA からタンパクへの翻訳や、分解の段階での調節が考えられ
る。翻訳段階で発現量が調節されるタンパクの例として、乳癌において良好な予後
を示唆するとされ、mRNA とタンパク発現が相関しない Tribbles homolog 3 (TRIB3)
が挙げられる。^{47, 48)} eEF1A2 の分解に関しては Ras/Raf/ERK1/2 経路中の C-Raf が
eEF1A2 のユビキチン化を調節していることが報告されており、⁴⁵⁾ eEF1A2 タンパク量
が mRNA に依存しない可能性を示唆している。また免疫染色の結果、多くの症例で腫
瘍内における eEF1A2 陽性細胞の分布が偏在していた。免疫染色では腫瘍の最大割面
に近い部分を評価しているのに対して、定量リアルタイム RT-PCR には腫瘍の辺縁近
傍の組織を 50-100mg 用いているため、サンプリング部位の相違によりタンパクと
mRNA 量が相関しなかった可能性も考えられる。

肺腺癌細胞株を用いた検討では eEF1A2 siRNA 導入により 5 種全ての細胞株で mRNA
発現が 10%以下に抑制されたが、タンパク発現が抑制されない細胞株が存在した。こ
れは切除標本で mRNA とタンパクが相関しなかったことと矛盾しない結果である。細
胞増殖能、遊走能、浸潤能の解析では肺腺癌細胞株 LCSC#1 で遊走能が低下したが、
他の細胞株では変化せず、増殖能と浸潤能は全ての細胞株で変化しなかった。eEF1A2
タンパク発現が減少した細胞株で遊走能が低下したことは、乳癌や膀胱癌細胞株にお
いて eEF1A2 が遊走能を亢進させるとする報告と同様の結果である。^{24, 27)} eEF1A2 タン
パク発現が低下した他の細胞株で遊走能への影響がみられなかった理由としては、
それらの細胞では遊走能を亢進させる作用がもともと弱く、発現を抑制しても作用
の変化が小さかった可能性が考えられる。あるいは、eEF1A2 mRNA とタンパクの発現

が必ずしも相関しないことにより、遊走能亢進作用が減弱するための十分な eEF1A2 タンパク低下が得られなかった可能性も考えられる。

免疫染色はタンパク発現の解析において広く行われている手法である。一般的なホルマリン固定パラフィン包埋で保管された切除標本を対象に解析できるため、長期間の追跡調査が終了し予後が判明した症例の生存解析が可能であることや、手技が簡便で費用も比較的安価であるなど長所が多い。一方で抗原賦活の方法や抗体の種類によって染色性が異なること、顕微鏡像による主観的評価であること、評価基準が定まっていないことなどの短所も存在する。⁴⁹⁾ 本研究の評価基準策定にあたり eEF1A2 免疫染色について MEDLINE で検索したところ 8 報告が存在した。評価方法の内訳は、染色強度のみを 4 段階評価した報告が 3 例、^{17, 18, 50)} 染色強度と陽性細胞の割合を各々 4 段階に評価した報告が 3 例、^{20, 27, 39)} 染色強度を 4 段階、陽性細胞の割合をコンピュータにより 100 分率で評価した報告が 1 例、³⁸⁾ 評価基準が明確に記載されていない報告が 1 例であり、¹⁹⁾ 本研究では染色強度 (IS) と陽性細胞の割合 (PS) を各々 4 段階に評価する方法を採用した。この方法を用いた 3 報告で PS の設定は同一であったため、本研究も同様に定めた。3 報告の陽性基準は“IS と PS の和が 3 以上”が 2 例、“IS1 以上かつ PS1 以上”が 1 例であったが、これらを適用すると前者の場合は陽性率 95.7% (66/69 例)、後者では 97.1% (67/69 例) となり、本研究においては不適と考えられた。臓器や用いた抗体の相違などにより染色性が異なることが原因と考え、より厳しい陽性基準として“IS2 以上かつ PS2 以上”と定めた。非小細胞肺癌 113 例を対象とした Li らの検討では 10%以上の腫瘍細胞が染色された場合を陽性と定義して陽性率 28%であった。²⁰⁾ 本研究の対象症例では病理病期 I 期の陽性率は 94.6%であり、Li らと比較して陽性基準を厳しく設定しているにも関わらず大きく異なる結果であ

った。陽性率の相違が生じた最大の原因として、eEF1A2 陽性細胞の腫瘍内分布が不均一であることが挙げられる。中枢型扁平上皮癌を除き、肺癌の病理病期I期とは最大腫瘍径が30mm以下であることを示しているが、Liらはこれらの病変に対して直径1.5mmの腫瘍くり抜き標本を各症例2本ずつ採取して組織マイクロアレイブロックを作成し免疫染色している。即ち腫瘍の一部分のみを解析したこととなるため、偏在するeEF1A2 陽性細胞の存在を正しく評価できていない可能性がある。本研究では手術検体の薄切標本をそのまま免疫染色に用い、腫瘍全体の染色性と陽性細胞の割合をより正確に評価している。また、これ以外の原因としては、用いた抗eEF1A2抗体と染色試薬の相違、抗原賦活の方法が異なることが挙げられる。本研究ではeEF1A2免疫染色の評価に際して、上記のごとく可能な限り詳細に検討し、かつ陽性判定を厳格に行った。判定は独立した2名により行われ、各スコアの平均値を採用した。従って、本研究における免疫染色の結果は信頼に足るものであると考える。

本研究ではeEF1A2が非小細胞肺癌の治療標的分子となることを示唆する結果は得られなかったものの、免疫染色という簡便な手法により肺癌術後の予後不良症例を抽出できる可能性が示唆された。現在では肺癌術後の再発防止と予後改善のため、病理病期に応じて補助化学療法を行うことが一般的であり、IA期の一部とIB期では経口tegafur-uracil薬、IIA期以上では白金製剤ベースの二剤併用療法を行うことが推奨されている。⁵¹⁾ 本研究の臨床応用として、補助化学療法の適応決定や治療薬選択にeEF1A2免疫染色を組み合わせ、免疫染色陰性例に対する適応拡大や、より治療効果の高い治療薬選択を行うことで予後を改善できる可能性があると考えられる。

結論

非小細胞肺癌術後症例 69 例を対象に検討したところ 約 84% で eEF1A2 タンパク発現を認め、eEF1A2 タンパク発現が非小細胞肺癌術後の独立した予後因子であることが判明した。肺腺癌細胞株における eEF1A2 siRNA 導入による細胞増殖能、遊走能、浸潤能の変化と、非小細胞肺癌における MMP9 の発現を解析したが、eEF1A2 発現が予後因子として作用する機序の解明には至らなかった。また、eEF1A2 が非小細胞肺癌の治療標的分子となることを示唆する結果は得られなかった。

文献

1. WHO: Fact sheet No. 297. 2013 Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>
2. Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan: Vital statistics of Japan. 2011 Available from: <http://www.mhlw.go.jp/english/database/db-hw/vs01.html>
3. Sawabata N, Miyaoka E, and Asamura H: Japanese Lung Cancer Registry Study of 11, 663 Surgical Cases in 2004. *J Thorac Oncol* 2011;6:1229-1235
4. Center for Cancer Control and Information Services and National Cancer Center J: Monitoring of Cancer Incidence in Japan 2008. 2013 Available from: http://ganjoho.jp/data/professional/statistics/odjrh3000000hwsa-att/mcij2008_report.pdf
5. Sakata R, Fujii Y, and Kuwano H: Thoracic and cardiovascular surgery in Japan during 2008: annual report by The Japanese Association for Thoracic Surgery. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 2010;58:356-383
6. Costa D, Kobayashi S, Tenen D, et al.: Pooled analysis of the prospective trials of gefitinib monotherapy for EGFR-mutant non-small cell lung cancers. *Lung Cancer* 2007;58:95-103
7. Morita S, Okamoto I, Kobayashi K, et al.: Combined survival analysis of prospective clinical trials of gefitinib for non-small cell lung cancer with EGFR mutations. *Clin Cancer Res* 2009;15:4493-4498
8. Yun CH, Mengwasser KE, Toms AV, et al.: The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:2070-2075
9. Pao W, Miller VA, Politi KA, et al.: Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2005;2:e73
10. Kwak E, Bang Y, and Camidge R: Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in

- Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2010;363:1693-1703
11. Camidge D, Bang Y, Kwak E, et al.: Progression-Free Survival (PFS) from a Phase I Study of Crizotinib (PF-02341066) in Patients with ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). 2011 Available from: http://www.oncuvview.tv/portals/0/linkedfiles/ASCO_2011_Camidge.pdf
 12. Merrick WC: Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol Rev* 1992;56:291-315
 13. Thornton S, Anand N, Purcell D, et al.: Not just for housekeeping: protein initiation and elongation factors in cell growth and tumorigenesis. *J Mol Med (Berl)* 2003;81:536-548
 14. Knudsen SM, Frydenberg J, Clark BF, et al.: Tissue-dependent variation in the expression of elongation factor-1 alpha isoforms: isolation and characterisation of a cDNA encoding a novel variant of human elongation-factor 1 alpha. *Eur J Biochem* 1993;215:549-554
 15. Kahns S, Lund A, Kristensen P, et al.: The elongation factor 1 A-2 isoform from rabbit: cloning of the cDNA and characterization of the protein. *Nucleic Acids Res* 1998;26:1884-1890
 16. Anand N, Murthy S, Amann G, et al.: Protein elongation factor EEF1A2 is a putative oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet* 2002;31:301-305
 17. Kulkarni G, Turbin DA, Amiri A, et al.: Expression of protein elongation factor eEF1A2 predicts favorable outcome in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2007;102:31-41
 18. Tomlinson VA, Newbery HJ, Wray NR, et al.: Translation elongation factor eEF1A2 is a potential oncoprotein that is overexpressed in two-thirds of breast tumours. *BMC Cancer* 2005;5:113
 19. Cao H, Zhu Q, Huang J, et al.: Regulation and functional role of eEF1A2 in pancreatic carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;380:11-16
 20. Li R, Wang H, Bekele BN, et al.: Identification of putative oncogenes in lung adenocarcinoma by a comprehensive functional genomic approach. *Oncogene* 2006;25:2628-2635
 21. Yang F, Demma M, Warren V, et al.: Identification of an actin-binding protein from Dictyostelium as elongation factor 1a. *Nature* 1990;347:494-496
 22. Edmonds BT, Bell A, Wyckoff J, et al.: The effect of F-actin on the binding and hydrolysis of guanine nucleotide by Dictyostelium elongation factor 1A. *J Biol Chem* 1998;273:10288-10295
 23. Condeelis J: Elongation factor 1 alpha, translation and the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci* 1995;20:169-170
 24. Amiri A, Noei F, Jeganathan S, et al.: eEF1A2 activates Akt and stimulates Akt-dependent actin remodeling, invasion and migration. *Oncogene* 2007;26:3027-3040
 25. Jimenez C, Portela RA, Mellado M, et al.: Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration. *J Cell Biol* 2000;151:249-262

26. Pecorari L, Marin O, Silvestri C, et al.: Elongation Factor 1 alpha interacts with phospho-Akt in breast cancer cells and regulates their proliferation, survival and motility. *Mol Cancer* 2009;8:58
27. Xu C, Hu DM, and Zhu Q:eEF1A2 promotes cell migration, invasion and metastasis in pancreatic cancer by upregulating MMP-9 expression through Akt activation. *Clin Exp Metastasis* 2013 DOI: 10.1007/s10585-013-9593-6.
28. Xu X, Hamhouyia F, Thomas SD, et al.: Inhibition of DNA replication and induction of S phase cell cycle arrest by G-rich oligonucleotides. *J Biol Chem* 2001;276:43221-43230
29. Jing N, Li Y, Xiong W, et al.: G-quartet oligonucleotides: a new class of signal transducer and activator of transcription 3 inhibitors that suppresses growth of prostate and breast tumors through induction of apoptosis. *Cancer Res* 2004;64:6603-6609
30. Bates PJ, Kahlon JB, Thomas SD, et al.: Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding. *J Biol Chem* 1999;274:26369-26377
31. Dapas B, Tell G, Scaloni A, et al.: Identification of different isoforms of eEF1A in the nuclear fraction of human T-lymphoblastic cancer cell line specifically binding to aptameric cytotoxic GT oligomers. *Eur J Biochem* 2003;270:3251-3262
32. Scaggiante B, Dapas B, Grassi G, et al.: Interaction of G-rich GT oligonucleotides with nuclear-associated eEF1A is correlated with their antiproliferative effect in haematopoietic human cancer cell lines. *FEBS Journal* 2006;273:1350-1361
33. Lamberti A, Longo O, Marra M, et al.: C-Raf antagonizes apoptosis induced by IFN-alpha in human lung cancer cells by phosphorylation and increase of the intracellular content of elongation factor 1A. *Cell Death Differ* 2007;14:952-962
34. Grassi G, Scaggiante B, Farra R, et al.: The expression levels of the translational factors eEF1A 1/2 correlate with cell growth but not apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines with different differentiation grade. *Biochimie* 2007;89:1544-1552
35. Bjorklund M and Koivunen E: Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2005;1755:37-69
36. Cox G, Jones JL, and O'Byrne KJ: Matrix metalloproteinase 9 and the epidermal growth factor signal pathway in operable non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:2349-2355
37. Livak KJ and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-408
38. Tomlinson VA, Newbery HJ, Bergmann JH, et al.: Expression of eEF1A2 is associated with clear cell histology in ovarian carcinomas: overexpression of the gene is not dependent on modifications at the eEF1A2 locus. *Br J Cancer* 2007;96:1613-1620

39. Hu D, Xu C, and Zhu C: eEF1A2 Protein Expression Correlates with Lymph Node Metastasis and Decreased Survival in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Hepatogastroenterology* 2012;60:870-875
40. Talapatra S, Wagner JD, and Thompson CB: Elongation factor-1 alpha is a selective regulator of growth factor withdrawal and ER stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2002;9:856-861
41. Hu JL, Xu G, Lei L, et al.: Etoposide phosphate enhances the acetylation level of translation elongation factor 1A in PLC5 cells. *Z Naturforsch C* 2012;67:327-330
42. Botrel TE, Clark O, Clark L, et al.: Efficacy of bevacizumab (Bev) plus chemotherapy (CT) compared to CT alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC): systematic review and meta-analysis. *Lung Cancer* 2011;74:89-97
43. Lima AB, Macedo LT, and Sasse AD: Addition of bevacizumab to chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2011;6:e22681
44. Olson JM and Hallahan AR: p38 MAP kinase: a convergence point in cancer therapy. *Trends Mol Med* 2004;10:125-129
45. Sanges C, Scheuermann C, Zahedi RP, et al.: Raf kinases mediate the phosphorylation of eukaryotic translation elongation factor 1A and regulate its stability in eukaryotic cells. *Cell Death Dis* 2012;3:e276
46. Chen G, Gharib TG, Huang CC, et al.: Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:304-313
47. Wennemers M, Bussink J, Grebenchtchikov N, et al.: TRIB3 protein denotes a good prognosis in breast cancer patients and is associated with hypoxia sensitivity. *Radiother Oncol* 2011;101:198-202
48. Wennemers M, Bussink J, van den Beucken T, et al.: Regulation of TRIB3 mRNA and protein in breast cancer. *PLoS One* 2012;7:e49439
49. Shi SR, Shi Y, and Taylor CR: Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. *J Histochem Cytochem* 2011;59:13-32
50. Pinke DE, Kalloger SE, Francetic T, et al.: The prognostic significance of elongation factor eEF1A2 in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008;108:561-568
51. 日本肺癌学会: 肺癌診療ガイドライン(2013 年度版). 2013 Available from: http://www.haigan.gr.jp/modules/guideline/index.php?content_id=3

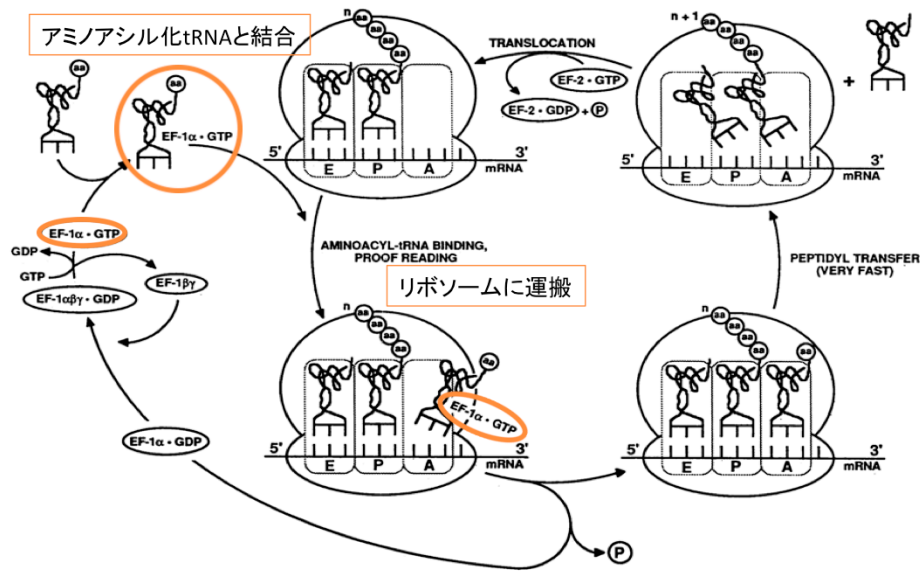


図1. タンパク合成, 転写過程の模式図. eEF1Aはアミノアシル化tRNAと結合し, リボソームに運搬する.

Merrick WC. Microbiol Rev 1992;56:291-315より引用.

年齢	性別	組織型	pT	pN	リンパ管浸潤	血管浸潤	再発	転機	観察期間 (月)	eEF1A2免疫染色			eEF1A2 mRNA 相対発現
										IS	PS	判定	
67	男性	Sq	2	2	あり	あり	なし	生存	138.4	2.5	3	陽性	78.845
70	男性	Sq	2	0	なし	なし	なし	生存	137.3	2	2.5	陽性	0.606
73	男性	Ad	2	1	あり	あり	なし	生存	65.8	2	3	陽性	9.873
71	男性	Sq	3	0	なし	あり	あり	生存	83.3	2	2.5	陽性	0.601
72	女性	Ad	4	0	なし	なし	なし	生存	46.7	2	2.5	陽性	2.312
81	男性	Sq	3	0	なし	あり	なし	生存	96.4	2	3	陽性	0.326
67	男性	Sq	2	1	あり	あり	なし	生存	34.8	2.5	3	陽性	0.042
76	男性	Sq	1	0	なし	なし	なし	生存	59.2	3	3	陽性	0.112
45	男性	Ad	3	2	あり	あり	なし	生存	127.5	2.5	3	陽性	0.078
57	男性	Ad	4	0	なし	あり	あり	生存	53.4	2.5	3	陽性	0.383
60	女性	Sq	2	0	なし	なし	あり	生存	127.3	3	2.5	陽性	0.090
67	男性	Sq	1	0	なし	なし	なし	生存	43.4	3	2.5	陽性	0.035
70	女性	Ad	1	0	なし	あり	なし	生存	99.7	2.5	3	陽性	0.977
52	女性	Ad	1	0	なし	なし	なし	生存	66.6	2	3	陽性	0.096
73	男性	Ad	1	0	あり	なし	なし	生存	52.8	3	3	陽性	1.678
58	男性	Ad	2	0	なし	なし	なし	生存	102.5	3	3	陽性	0.165
55	男性	Ad	1	0	なし	なし	なし	生存	44.4	3	3	陽性	59.581
63	女性	Ad	1	0	なし	なし	なし	生存	45.7	2	2.5	陽性	0.034
73	男性	Sq	4	0	なし	あり	なし	生存	31.6	2	3	陽性	0.074
54	女性	Ad	2	0	なし	なし	なし	生存	33.2	3	3	陽性	0.025
53	男性	Sq	2	0	なし	あり	なし	生存	101.9	2	2	陽性	0.639
64	男性	Ad	2	0	なし	なし	なし	生存	33.1	2.5	3	陽性	0.565
71	男性	Ad	2	0	なし	なし	なし	生存	128.4	2.5	3	陽性	6.476
71	男性	Ad	1	0	なし	あり	なし	生存	103.4	3	3	陽性	0.139
75	男性	Ad	2	0	なし	なし	なし	生存	52.5	2.5	3	陽性	0.017
49	男性	Ad	1	0	なし	なし	なし	生存	78.0	2	3	陽性	3.182
54	男性	Sq	2	1	あり	あり	なし	生存	45.5	2	2.5	陽性	0.142
72	男性	Ad	1	0	なし	なし	なし	生存	51.2	2.5	3	陽性	0.021
56	男性	Ad	1	2	あり	なし	なし	生存	51.6	2	3	陽性	0.147
61	男性	Sq	1	1	あり	なし	なし	生存	107.5	2.5	3	陽性	0.017
82	男性	Ad	1	0	なし	なし	なし	生存	30.6	2	3	陽性	348.927
79	女性	Ad	1	0	なし	あり	なし	生存	23.0	3	3	陽性	20.301
69	男性	Sq	2	0	あり	あり	なし	生存	56.8	2.5	3	陽性	0.004
76	男性	Ad	1	0	なし	なし	なし	生存	56.0	3	3	陽性	27.286
30	女性	Ad	1	1	あり	あり	あり	生存	86.8	1	1	陰性	0.107

表1A. 症例一覧, 生存例.

年齢	性別	組織型	pT	pN	リンパ管浸潤	血管浸潤	再発	転機	観察期間 (月)	eEF1A2免疫染色			eEF1A2 mRNA 相対発現
										IS	PS	判定	
69	男性	Sq	4	2	あり	なし	あり	死亡	7.3	2	2.5	陽性	0.174
57	男性	Ad	3	2	あり	あり	あり	死亡	35.9	2	3	陽性	21.016
74	男性	Ad	4	2	あり	あり	あり	死亡	19.3	3	3	陽性	3.837
50	男性	Ad	4	2	あり	あり	あり	死亡	47.8	3	3	陽性	15.708
47	女性	Sq	2	0	なし	なし	なし	死亡	22.6	2.5	3	陽性	0.086
69	女性	Ad	4	1	あり	あり	あり	死亡	7.1	3	3	陽性	0.265
69	男性	Ad	2	0	なし	あり	なし	死亡	50.2	2.5	3	陽性	1.803
74	女性	Ad	2	0	なし	なし	なし	死亡	4.3	3	3	陽性	0.039
60	男性	Ad	4	2	あり	あり	あり	死亡	7.8	2	3	陽性	0.847
52	女性	Ad	2	0	なし	なし	あり	死亡	35.3	2.5	3	陽性	1,515.012
47	女性	Ad	2	2	なし	なし	あり	死亡	59.3	3	3	陽性	5.352
60	男性	Sq	2	1	なし	なし	なし	死亡	126.3	2	3	陽性	0.003
73	男性	Ad	2	2	あり	なし	あり	死亡	80.1	3	3	陽性	116.333
43	女性	Ad	2	2	あり	あり	なし	死亡	30.6	3	3	陽性	1.954
82	男性	Sq	1	0	なし	あり	なし	死亡	16.5	2.5	3	陽性	0.023
69	男性	Ad	1	0	なし	あり	なし	死亡	97.4	2	2.5	陽性	1.398
78	女性	Ad	2	2	あり	あり	なし	死亡	61.0	2.5	3	陽性	0.321
61	男性	Ad	2	0	なし	なし	あり	死亡	29.9	3	2.5	陽性	0.545
74	男性	Ad	1	0	なし	なし	なし	死亡	22.6	3	3	陽性	59.581
62	男性	Ad	1	0	なし	なし	なし	死亡	60.1	2.5	2.5	陽性	2.149
69	男性	Ad	1	0	なし	なし	あり	死亡	83.5	2.5	2.5	陽性	2.204
77	女性	Ad	2	0	なし	なし	あり	死亡	56.8	3	3	陽性	0.067
72	男性	Ad	1	0	なし	あり	なし	死亡	108.8	2	2.5	陽性	0.181
70	女性	Ad	2	0	なし	なし	あり	死亡	80.9	2.5	2.5	陽性	24.422
75	男性	Sq	3	0	なし	なし	あり	死亡	3.8	1	2.5	陰性	0.239
58	男性	Sq	2	1	なし	あり	あり	死亡	5.5	2	1.5	陰性	4.778
60	男性	Ad	2	2	あり	なし	あり	死亡	27.9	1	3	陰性	37.769
58	男性	Ad	1	1	あり	あり	あり	死亡	7.3	1.5	2.5	陰性	0.014
78	男性	Ad	1	2	あり	あり	なし	死亡	32.1	1.5	2.5	陰性	0.181
58	男性	Ad	2	1	あり	あり	あり	死亡	69.7	1.5	3	陰性	0.060
76	女性	Ad	1	2	あり	なし	あり	死亡	66.8	1.5	1.5	陰性	10.879
72	女性	Ad	2	0	あり	あり	あり	死亡	39.3	0	0	陰性	11.960
66	男性	Ad	1	0	なし	なし	なし	死亡	85.6	1.5	3	陰性	29.313
75	男性	Ad	2	2	あり	なし	あり	死亡	8.2	1.5	2.5	陰性	0.524

表1B. 症例一覧, 死亡例.

症例数	69
年齢(歳)	30-82(中央値 69)
性別	
男性	50
女性	19
組織型	
腺癌	50
扁平上皮癌	19
pT	
1	26
2	30
3	5
4	8
pN	
0	43
1	10
2	16
リンパ管浸潤	
陽性	26
陰性	43
血管浸潤	
陽性	31
陰性	38
病理病期	
I	37
II	12
III	20
再発	27
死亡	34
観察期間(月)	3.8-138.4(中央値 52.5)
5年生存率(%)	63.5

表2. 症例のまとめ.

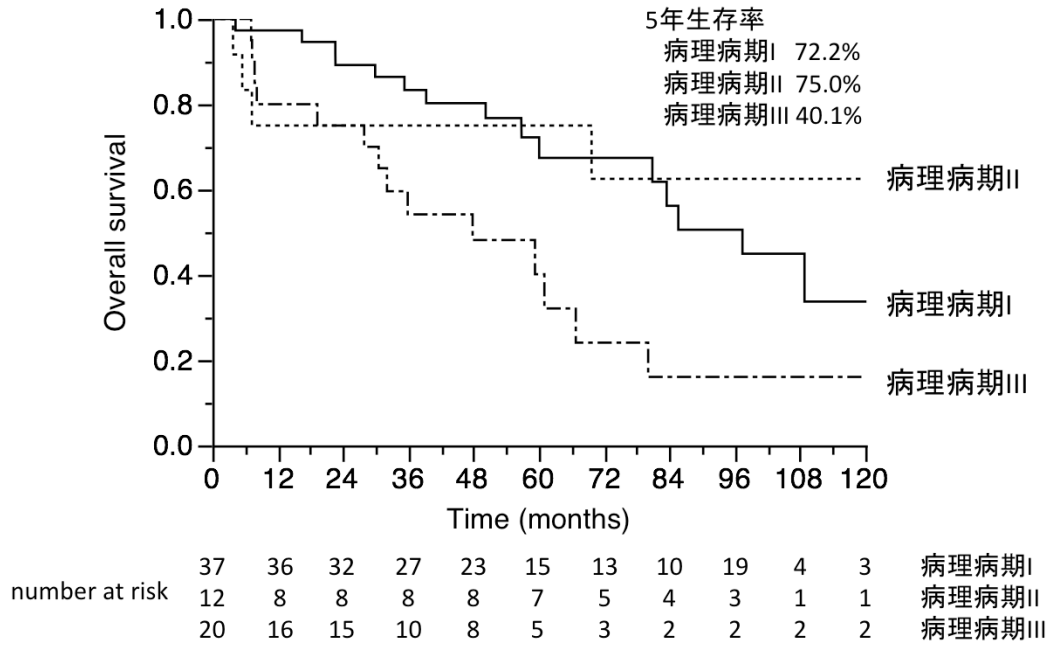


図2. 病理病期別のKaplan-Meier曲線.

病理病期II期(破線)の症例数が12例と比較的少なく、5年生存率がI期(実線)を上回っていたが、log-rank検定で統計学的有意差は認めなかった。III期(一点鎖線)の予後はI期、II期と比較して有意に不良であった。

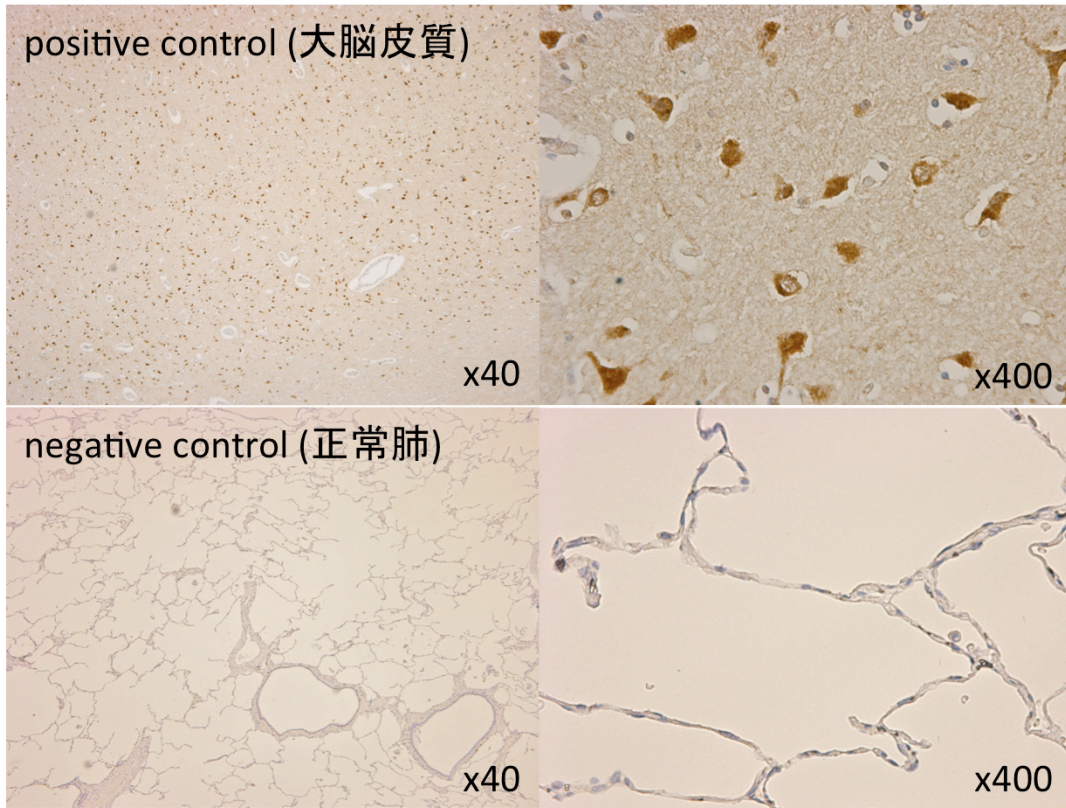


図3A. eEF1A2免疫染色. 大脳皮質では神経細胞が染色陽性を呈している. 正常肺胞は染色陰性である.

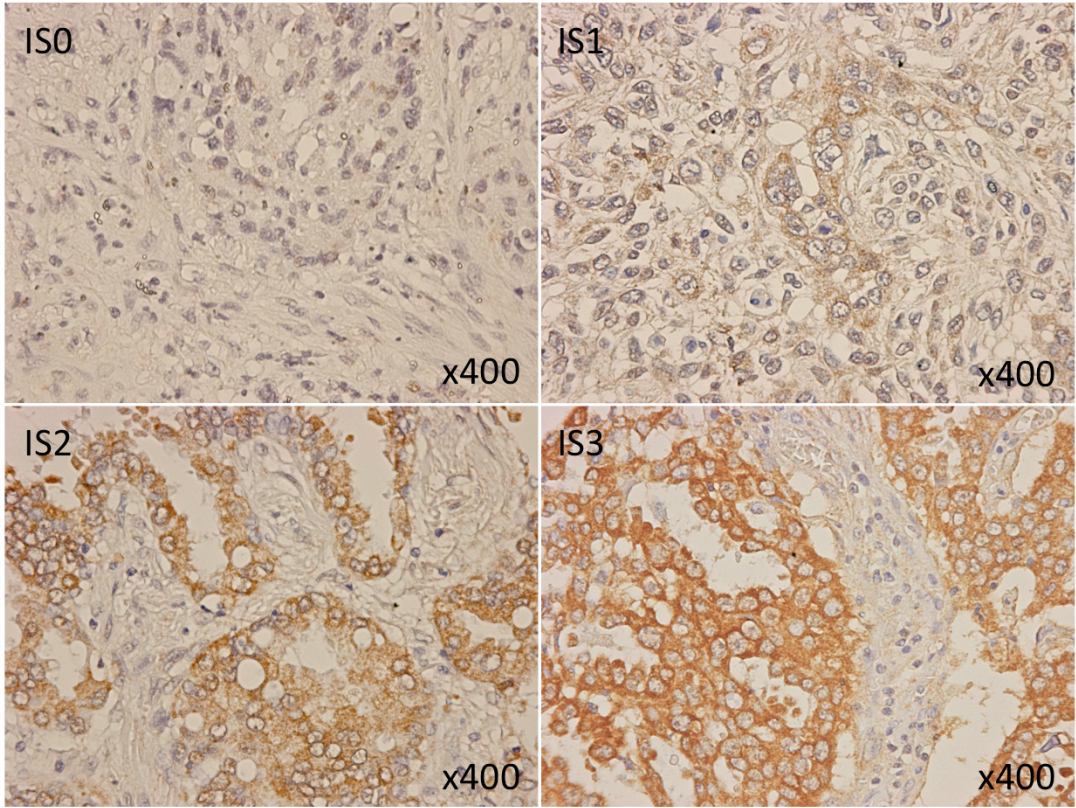


图3B. eEF1A2免疫染色, Intensity Score.

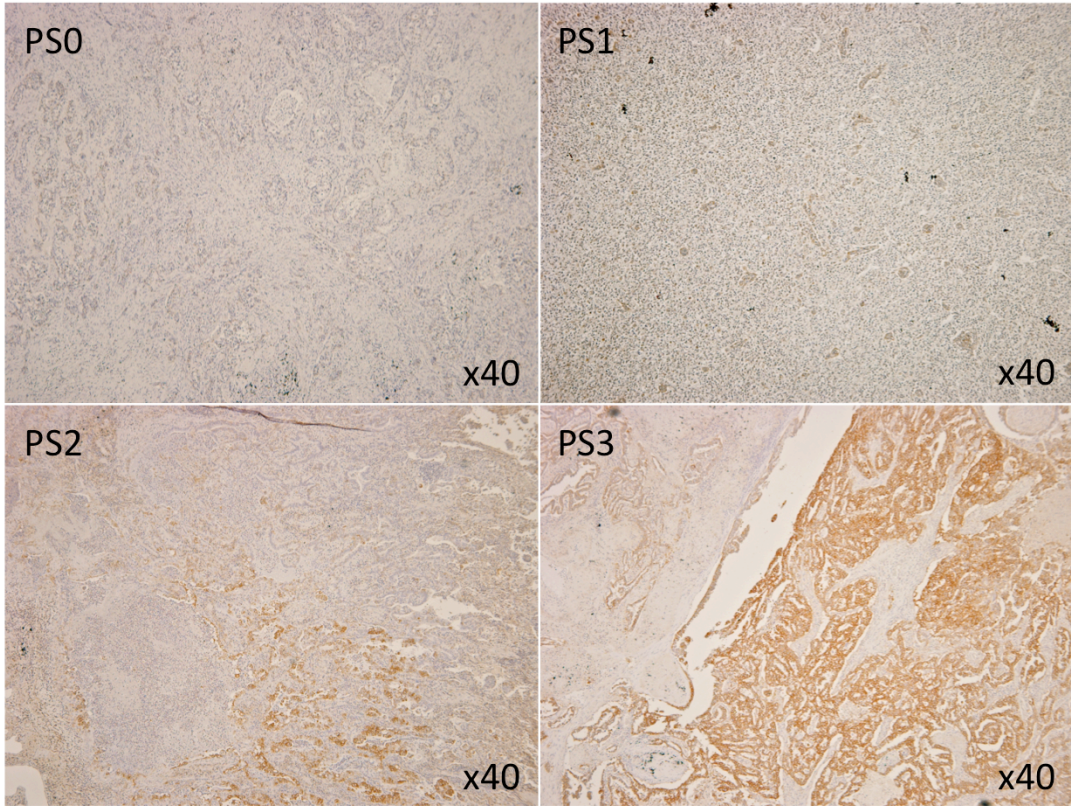


图3C. eEF1A2免疫染色, Proportion Score.

	eEF1A2免疫染色				eEF1A2 mRNA相対発現			
	陽性	陰性	陽性率 (%)	p値†	第1四分位点	中央値	第3四分位点	p値††
症例全体	58	11	84.1		0.09	0.55	5.91	
年齢				0.6265				0.4314
中央値未満	27	6	81.8		0.07	0.38	5.06	
中央値以上	31	5	86.1		0.15	0.60	9.02	
性別				0.9830				0.9571
男性	42	8	84.0		0.10	0.56	5.20	
女性	16	3	84.2		0.09	0.32	10.88	
組織型				0.4487				0.0078*
腺癌	41	9	82.0		0.14	1.54	12.90	
扁平上皮癌	17	2	89.5		0.04	0.11	0.60	
pT				0.9921				0.9900
1	21	4	84.0		0.07	0.98	12.07	
2-4	37	7	84.1		0.09	0.53	6.19	
pN				0.0097*				0.8575
0	40	3	93.0		0.09	0.57	3.18	
1-2	18	8	69.2		0.10	0.42	10.12	
リンパ管浸潤				0.0097*				0.8868
陽性	18	8	69.2		0.10	0.42	11.15	
陰性	40	3	93.0		0.09	0.57	4.78	
血管浸潤				0.4843				0.6995
陽性	25	6	80.6		0.11	0.38	3.84	
陰性	33	5	86.8		0.08	0.56	14.26	
死亡				0.0026*				0.0807
あり	10	24	29.4		0.18	1.60	12.90	
なし	34	1	97.1		0.07	0.17	2.31	

† カイ二乗検定, †† Wilcoxon順位和検定

表3. eEF1A2免疫染色およびmRNA相対発現と臨床病理所見, 予後の相関.

非小細胞肺癌におけるeEF1A2免疫染色の結果, 陽性率は84.1% (58/69)であった. 免疫染色陰性群ではリンパ節転移, リンパ管浸潤および死亡が多かった. 一方, それらとmRNA相対発現との間には相関はみられなかった.

因子	5年生存率 (%)	p値 ^{†††}
年齢		0.5127
中央値未満	62.9	
中央値以上	64.0	
性別		0.3007
男性	68.8	
女性	51.7	
組織型		0.0755
腺癌	59.9	
扁平上皮癌	73.7	
pT		0.3556
1	79.5	
2-4	55.0	
pN		0.0244*
0	73.4	
1-2	48.2	
リンパ管浸潤		0.0750
陽性	52.8	
陰性	70.2	
血管浸潤		0.8554
陽性	58.6	
陰性	66.8	
eEF1A2免疫染色		0.0010*
陽性	69.7	
陰性	22.2	

††† log-rank検定

表4. 生存に関する単変量解析.

eEF1A2免疫染色陰性群は陽性群と比較して5年生存率に有意差を認め、症例全体の平均63.5%と比較して予後が不良であった.

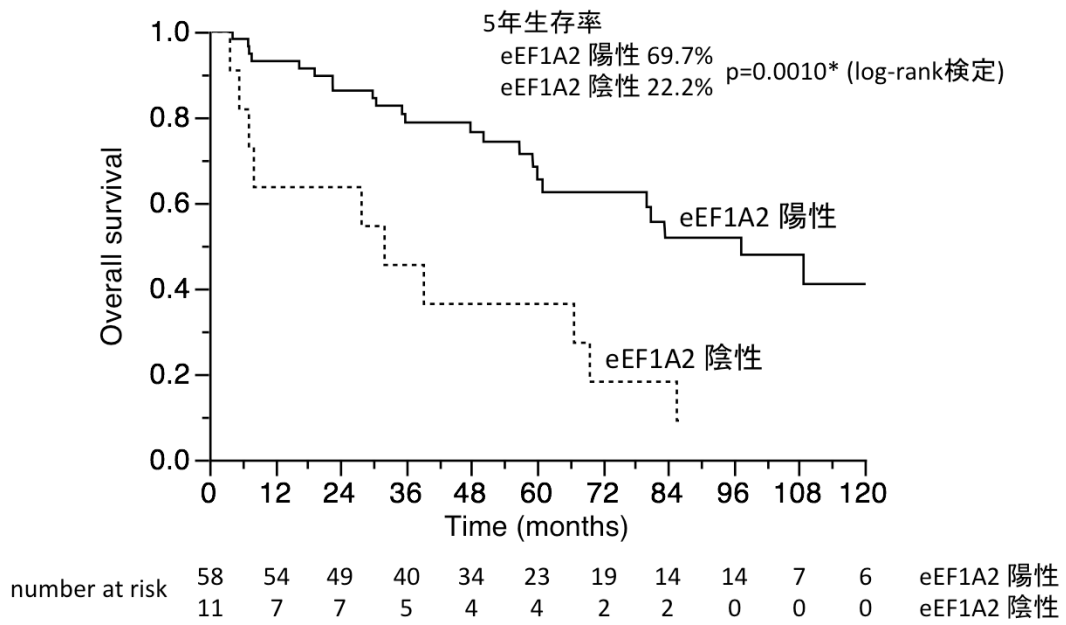


図4. eEF1A2免疫染色結果別のKaplan-Meier曲線.

eEF1A2免疫染色陰性群(破線)は陽性群(実線)と比較し有意に予後不良であった.

共変量	ハザード比	95% 信頼区間	p値 ^{†††}
eEF1A2免疫染色			0.0335*
陽性	1.00		
陰性	2.71	1.08-6.66	
pN			0.0408*
0	1.00		
1-2	4.07	1.06-14.63	
年齢			0.1117
中央値未満	1.00		
中央値以上	1.84	0.87-4.04	
組織型			0.2075
扁平上皮癌	1.00		
腺癌	1.84	0.73-5.40	
リンパ管浸潤			0.2286
陰性	1.00		
陽性	2.30	0.59-8.56	

†††† Coxの比例ハザードモデルによる多変量解析.

表5.生存に関する多変量解析.

eEF1A2免疫染色陰性は独立した予後不良因子であった.

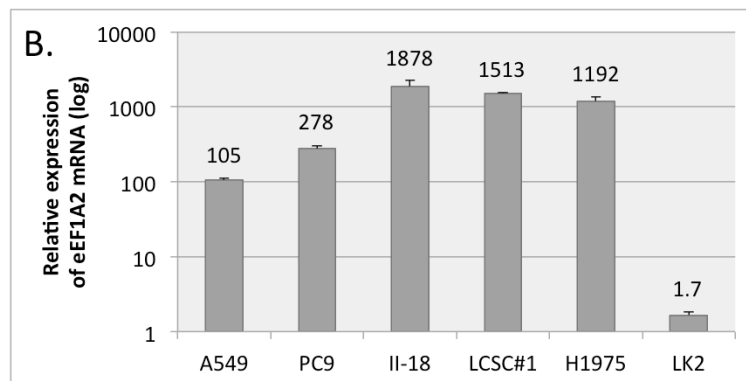
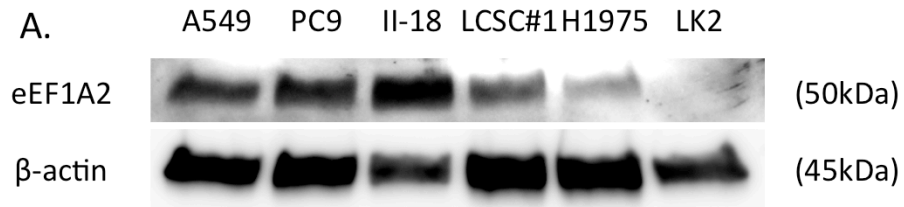


図5. 肺癌細胞株におけるeEF1A2タンパクおよびmRNA発現.

A: 腺癌細胞株の5種全てでeEF1A2シグナルを認める一方, 扁平上皮癌細胞株LK2ではeEF1A2シグナルを認めなかった. B: 腺癌細胞株の5種全てで100倍以上のmRNA発現亢進を認めた. 扁平上皮癌細胞株LK2では1.7倍と比較的低値であった. 縦軸は常用対数である.

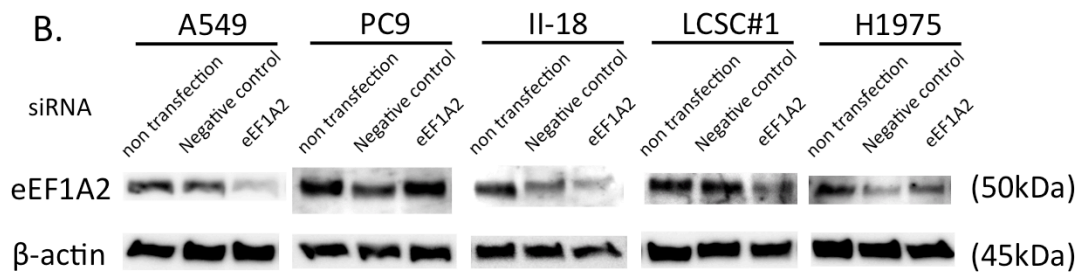
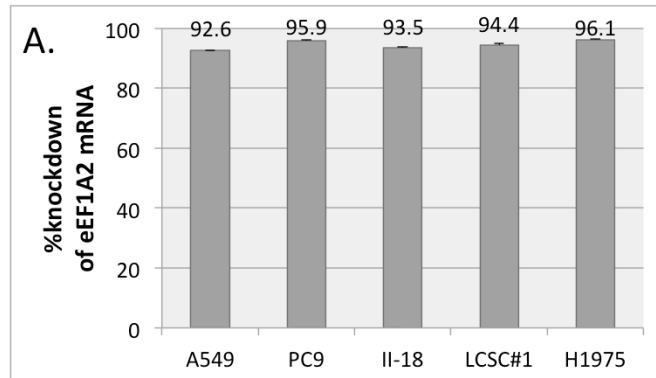


図6. RNA干渉法の効果.

A: 5種全ての細胞株で90%以上のeEF1A2 mRNAノックダウン効率が得られた。B: タンパクレベルではA549, II-18, LCSC#1では発現が抑制されたが, PC9とH1975では抑制効果が認められなかった。

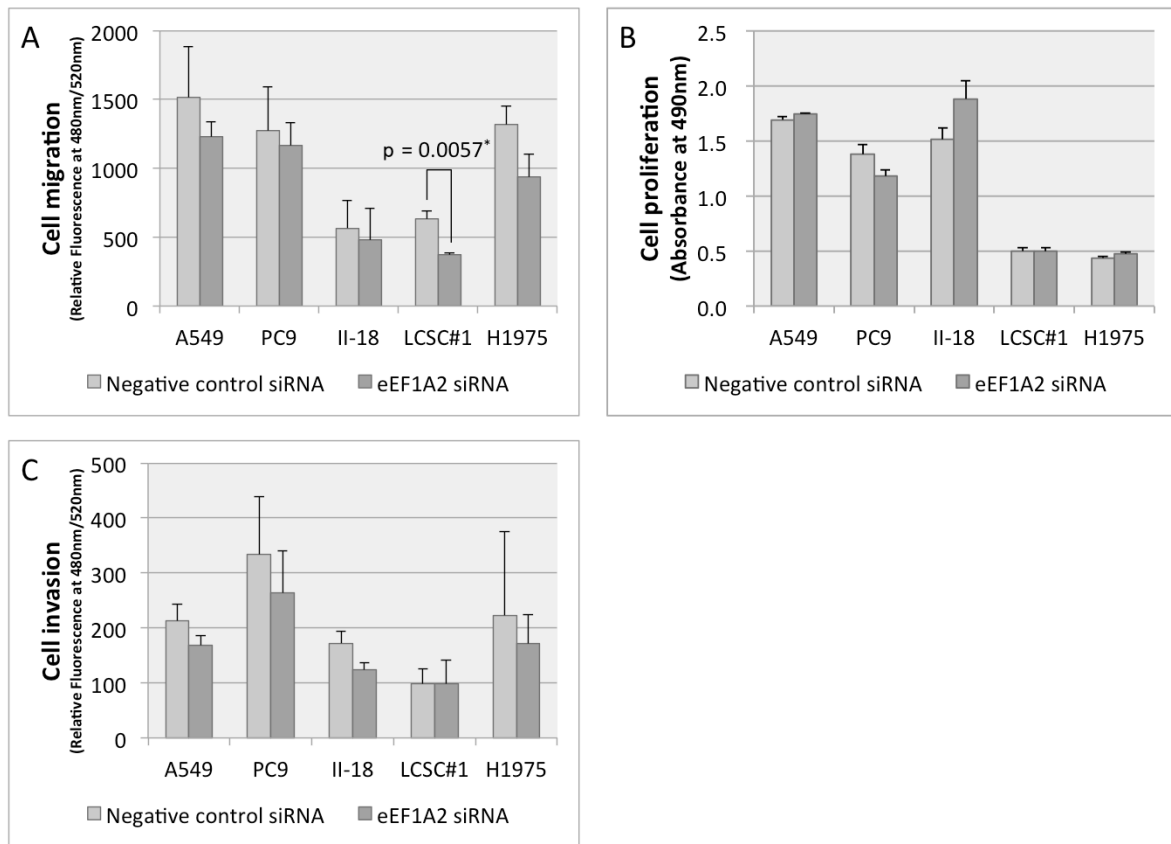


図7. eEF1A2抑制による肺癌細胞株の機能変化.

A: 遊走能アッセイ. RNA干渉によりeEF1A2タンパクの低下がみられた3細胞株のなかで, LCSC#1のみ遊走能
 が低下した. B: 増殖能アッセイ, C: 浸潤能アッセイ. 増殖能, 浸潤能ではeEF1A2抑制による変化を認めな
 かった.

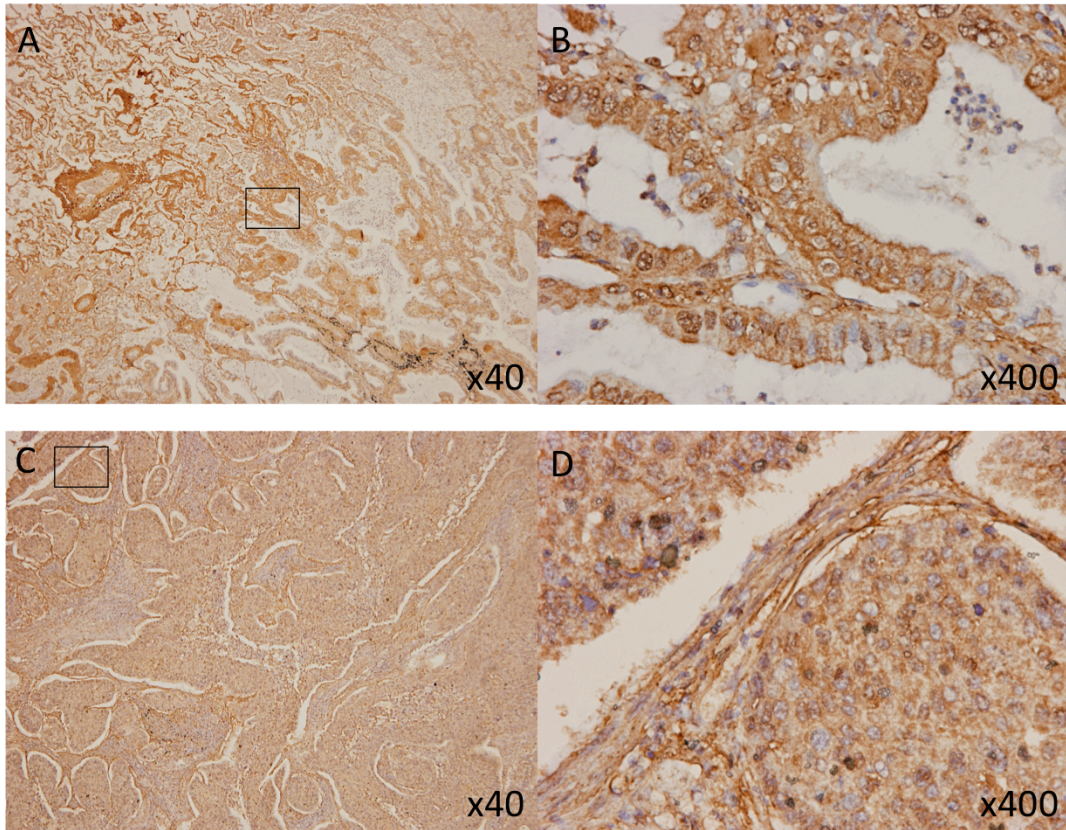


図8. 非小細胞肺癌におけるMMP9免疫染色陽性例. AおよびB: 乳頭腺癌. 癌細胞の細胞質が強く染色されており, 腫瘍間質の染色強度は比較的弱い. CおよびD: 扁平上皮癌. 癌細胞と腫瘍間質の両方が同程度に染色されている. B,DはそれぞれA,Cの箱で囲んだ部分を拡大した像である.

	MMP9免疫染色			p値†
	陽性	陰性	陽性率 (%)	
症例全体	59	10	85.5	
eEF1A2免疫染色				0.7118
陽性	50	8	86.2	
陰性	9	2	81.8	
年齢				0.4040
中央値未満	27	6	81.8	
中央値以上	32	4	88.9	
性別				0.8515
男性	43	7	86.0	
女性	16	3	84.2	
組織型				0.8515
腺癌	43	7	86.0	
扁平上皮癌	16	3	84.2	
pT				0.6537
1	22	3	88.0	
2-4	37	7	84.1	
pN				0.1213
0	39	4	90.7	
1-2	20	6	76.9	
リンパ管浸潤				0.3908
陽性	21	5	80.8	
陰性	38	5	88.4	
血管浸潤				0.7278
陽性	26	5	83.9	
陰性	33	5	86.8	
死亡				0.5244
あり	30	4	88.2	
なし	29	6	82.9	

† カイ二乗検定

表6. MMP9免疫染色とeEF1A2免疫染色,

臨床病理所見および予後の相関. 非小細胞肺癌におけるMMP9免疫染色の結果, 陽性率は85.5% (59/69例)であった. eEF1A2免疫染色の結果とは統計学的有意な相関を認めなかった. 臨床病理所見, 予後との間にも相関は認められなかった.