

学位論文

Prognostic significance of MYH9 expression
in resected non-small cell lung cancer

(和文：非小細胞肺癌手術症例における MYH9 発現の臨床病理
学的特徴と予後に関する検討)

平成 27 年度 医療系研究科論文博士

北里大学医学部呼吸器内科学

指導教授名 益田 典幸

申請者氏名 上遠野 健

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことここに宣言する。

1. 背景

Myosin-9 (MYH9) はアクチン結合性のモータータンパク質であるミオシンスーパーファミリーに属する。近年、MYH9 は癌細胞における移動、浸潤、転移に関与すると考えられている。本研究では免疫組織化学的手法を用いて非小細胞肺癌切除症例の腫瘍細胞膜における MYH9 の発現および臨床病理学的特徴と予後に関して検討を行った。

2. 方法

完全切除された連続した非小細胞肺癌 266 例を対象とし免疫組織化学的手法を用いて MYH9 の発現と臨床病理学的因子との関連の評価を行った。予後における MYH9 発現との関連については kaplan-Meier 曲線と Cox 比例ハザードモデルを用いて検討を行った。

3. 結果

MYH9 陽性症例は 266 症例中、102 症例 (38.3%) であった。MYH9 陽性症例は腺癌 ($p = 0.014$)、低分化度 ($p = 0.033$)、血管侵襲 ($p = 0.013$)、リンパ管侵襲 ($p = 0.045$)、予後不良 ($p = 0.032$) との関連が認められた。さらに多変量解析において MYH9 の発現は独立した予後不良因子であることが示された (HR, 2.15; 95%CI, 1.17-3.92; $p = 0.01$)。

5. 考察

今回の結果より一部の非小細胞肺癌の腫瘍細胞膜に MYH9 が発現しており、MYH9 陽性症例は前述の各臨床病理学的因子との間に相関が認められた。さらに、MYH9 の発現が予後不良因子である可能性が示された。

MYH9 は細胞辺縁先端における仮足形成や細胞の移動、細胞質分裂などに関連しており、これらのことから腫瘍内脈管侵襲や低分化度などの臨床的悪性度と相関していると考えられた。

しかしながら、非小細胞肺癌における MYH9 発現の機序についてはさらに検討が必要であると考ええる。

6. 将来展望

本研究から非小細胞肺癌手術症例において、MYH9 の発現が予後不良因子であることが示されたが、今後はさらなる多数症例で、MYH9 の発現と予後に関して検討を行いたい。

また本研究にて着目した MYH9 はシスプラチン耐性細胞株にて著しい発

現を認めている。このことは MYH9 がシスプラチンにおける治療効果予測因子となり得る可能性があり、今後はシスプラチンを用いた術後化学療法施行症例での MYH9 発現と再発率や予後に関する検討、進行非小細胞肺癌における MYH9 発現とシスプラチンを用いた化学療法の奏効率、予後に関する検討を行いたい。

目次

	頁
1. 序論 -----	1
2. 方法	
2-1. 倫理規定 -----	2
2-2. 細胞株の作製 -----	2
2-3. シスプラチン耐性細胞株の作製 -----	2
2-4. 単クローン性抗体の作製 -----	3
2-5. 抗体の isotype の決定 -----	3
2-6. 免疫沈降法 -----	3
2-7. 抗原タンパク質の同定 -----	4
2-8. 患者選択と組織学的診断 -----	5
2-9. KU-Lu-6 抗体の免疫組織化学染色法 -----	5
2-10. 免疫組織化学染色の評価方法 -----	6
2-11. 統計解析 -----	6
3. 結果	
3-1. KU-Lu-6 抗体の特徴 -----	6
3-2. 非小細胞肺癌における MYH9 の発現 -----	7
3-3. 対象患者と臨床病理学的背景 -----	7
3-4. MYH9 の発現と臨床病理学的特徴 -----	7
3-5. MYH9 の発現と生存分析 -----	8
3-6. MYH9 の発現と生存に関する単変量および多変量解析 --	8
4. 考察 -----	8
5. 総括 -----	9
6. 将来展望 -----	10
7. 謝辞 -----	10

8. 引用文献	-----	11
9. 業績目録	-----	14
10. 図表	-----	14

本文

1. 序論

原発性肺癌は欧米およびわが国で癌死亡数の第1位をしめる予後不良の疾患であり、非小細胞肺癌は死亡の約80%を占めている。¹ 非小細胞肺癌症例における予後は主に遠隔転移と関連している。腫瘍における転移は腫瘍細胞の移動、原発巣からの分離、周囲組織への浸潤、血管やリンパ管への侵入や播種、二次的部位への血管外遊走などを含んだ複雑な過程からなる。² 非小細胞肺癌における新規の予後因子や治療標的の確立においても腫瘍の移動、浸潤、転移に関連したタンパク質の検討は有用である。またヒトにおけるさまざまな癌腫において転移と化学療法抵抗性はしばしば関連して認められ、いくつかの分子においては転移と化学療法抵抗性の関連が報告されている。^{3,4,5} 以上を背景に非小細胞肺癌における臨床的悪性度の分子的マーカーを同定するため、今回我々はシスプラチン耐性細胞株から得られたタンパク質に着目した。

本研究では、我々はシスプラチン耐性細胞株において発現の増加が認められた Myosin-9 (MYH9) に着目した。ミオシンスーパーファミリーは15種類に分類され、そのなかの Myosin-II は通常2つの頭部をもち双極性のフィラメントを形成しており、非筋肉細胞における分裂、運動、形態維持を直接的に調節している。脊椎動物においては myosin-IIA や myosin-IIB といった少なくとも2つ以上の non-muscle myosin II heavy chain isoforms を有している。myosin-IIA は2つずつの MYH9 と同義である non-muscle myosin IIA heavy chains と regulatory light chains、essential light chains から構成される。⁶ MYH9 は細胞における極性、接着、分裂、移動に寄与しており、^{7,8} 癌細胞における移動、浸潤、転移にも重要な役割を果たすことが複数の研究で報告されている。^{9,10} ヒト乳癌細胞株である MCF-7 において、浸潤能を有する MCF-7/6 では非浸潤性の MCF-A/Z に比べて高い MYH9 の発現が報告されている。また MCF-7/6 の浸潤能は MYH9 の抑制により減弱することが報告されており、このことは癌細胞の移動や浸潤において MYH9 が密接に関連していることを示している。さらに食道癌、¹¹ 膀胱癌、¹² 胃癌¹³ においては MYH9 の高発現と予後不良が関連することが報告されている。原発性肺癌においては、Maeda らは肺腺癌 stage I 期症例において MYH9 と vimentin の両者の発現が認められない群では術後化学療法を行わなくても良好な予後を示すことを報告している。¹⁴ しかしながら扁平上皮癌やさまざまな病期を含んだ多数の非小細胞肺癌症例での MYH9 の発現と臨床病理

学的因子や予後との関連についてはさらなる検討が必要である。本研究では扁平上皮癌を含んだ stageI-III 期の非小細胞肺癌切除症例における MYH9 の発現と臨床病理学的因子と予後との関連を検討した。

2. 方法

2-1. 倫理規定

本研究は北里大学医学部病院倫理委員会（B13-53）により承認を得たプロトコールに基づき、過去の診療記録および手術検体を用いることから、「手術・検査等で採取された組織の寄贈及び診断、教育・研究のための使用についての説明および同意書」を用いて、研究利用に対して包括的に同意を得た患者を対象とした。

2-2. 細胞株の作製

神経内分泌腫瘍由来の LCN1 については我々の研究室にて確立された。¹⁵ 肺腺癌由来の LC-2/ad と A549 については理化学研究所バイオリソースセンター（茨城）、JCRB 細胞バンク（東京）からそれぞれ購入した。これらの細胞株は RPMI1640 培地（SIGMA, Steinheim, Germany）に 10%ウシ胎児血清（FBS; Biowest, Miami, FL, USA）、100 units/ml のペニシリン、100µg/ml のストレプトマイシン（GIBCO, Auckland, New Zealand）を添加して発育を行った。採取後に二価イオン不含リン酸緩衝生理食塩水（PBS(-)）で 2 回洗浄し、サブコンフルエントになった細胞はタンパク質解析のために -80℃ で貯蔵され、免疫組織化学のため 10%ホルマリン固定とパラフィン包埋が行われた。LCN1 細胞株は免疫組織化学スクリーニングのために AMeX-fixed が行われた。¹⁶ マウスの骨髄腫由来の SP2/O-Ag14 細胞は理化学研究所バイオリソースセンターから購入し、1×8-azaguanine（50× Hybri-Max, SIGMA）、10%FBS、100 units/ml のペニシリン、100µg/ml のストレプトマイシンを添加した RPMI1640 培地にて発育を行った。

2-3. シスプラチン耐性細胞株の作製

シスプラチン耐性細胞株（LCN1-cis, LC-2/ad-cis, A549-cis）はシスプラチン（日本化薬）添加を 25ng/ml の濃度から開始し、3,200 ng/ml まで上昇させて 6 ヶ月培養を行い確立された。これらのシスプラチン耐性株は我々の研

研究室において 3,200 ng/ml のシスプラチン濃度においても 12 ヶ月以上の安定した発育が認められている。¹⁷

2-4. 単クローン性抗体の作成

LCN1-cis 細胞に PBS(-)を加え、超音波破碎装置 (UH-50;SMT Company, 東京) を用いて蛋白質を抽出した。LCN1-cis 細胞 50mg (湿重量) 分の蛋白抽出液を PBS(-)で 500 μ L に調整し、BALB/c マウス (5 週齢♀) の腹腔に 2 週間毎に 3 回の免疫を行った。抗体価は免疫に用いた LCN1-cis 細胞の AMeX 固定切片に対し、100 倍希釈した免疫マウス尾静脈血を一次抗体に用いた免疫染色により評価した。細胞融合の 3 日前に、最も高い抗体価を示したマウスに対し、同量の LCN1-cis 細胞の蛋白質抽出液を腹腔に免疫することでブーストを行った。抗体産生ハイブリドーマの作製方法と免疫染色によるスクリーニングについては Nagashio らの過去の報告に従った。^{18,19}

2-5. 抗体の isotype の決定

作製した抗体の中で LCN-cis 細胞で細胞膜における染色性を示し、親株である LCN1 細胞では染色性を示さない KU-Lu-6 抗体に着目し、以降の実験に用いた。KU-Lu-6 抗体の isotype を決定するために、我々は IsoStrip™ Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を用いて能書に従い施行した。

2-6. 免疫沈降法

免疫沈降法は Pierce Protein L Agarose (Thermo Scientific Rockford, IL, USA) を用いて能書に従い施行した。以下に簡単に示す。LC-2/ad-cis 細胞を PBS(-)で洗浄後、蛋白分解酵素阻害剤 (Complete-mini EDTA-free, Roche Diagnostics) を含む radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer を加え、氷上で 30 分間の蛋白抽出処理を行った。蛋白質抽出検体は 15000 rpm, 4°C, 30 分間遠心後、その上清を新たなチューブに回収した。一次抗体をプロテイン L 結合アガロースビーズに結合させるため、KU-Lu-6 ハイブリドーマの培養上清を 200 μ L と 50 μ L のプロテイン L 結合アガロースビーズを RIPA バッファー中に懸濁後、室温で 30 分間、回転させながら反応させた。遠心し、上清を除去した後、抗体結合アガロースビーズに LC-2/ad-cis 細胞から抽出した蛋白質抽出液 (500 μ g 相当量) を加え、室温で 30 分間、

回転させながら反応させた。検体は 15000 rpm, 4°C, 5 分間の遠心により、上清をできる限り除去した後、1×Laemmli's バッファを 20 μ L 加え、100°C、5 分間の熱処理後、氷冷することで SDS-PAGE 用のサンプルとした。SDS-PAGE 法は 10% アクリルアミドゲルを用いて行い、蛋白質分離後のゲルは Negative Gel Stain MS Kit (和光純薬、東京) を用いて能書に従い亜鉛染色を行った。

2-7. 抗原タンパク質の同定

抗原タンパク質バンドは亜鉛染色したゲルより 1 立方ミリメートル角の大きさに切り出し、脱染色 (和光純薬) を用いて脱色した。脱色後のゲルは HPLC グレードの水にて洗浄を行った後、100% アセトニトリルにて脱水し、さらにバキューム遠心機を用いて完全に乾燥状態にした。ゲルに 10 ng/ μ L のトリプシン (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega, Madison, WI, USA) 溶液を吸収させた後、25mM NH_4HCO_3 溶液中で 37°C、24 時間の条件でトリプシン消化を行った。反応終了後の溶液を新たなチューブに移した後、ゲルに 5% trifluoroacetic acid/50% アセトニトリルを加え、残存するペプチドを洗浄後、先ほどと同じチューブに溶液を回収した。

回収したペプチド断片は autoflex III matrix-associated laser desorption/ionization time of flight/time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF MS, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) を用いて解析した。解析プレートはマトリックスに α -cyano-4-hydroxycinnamic Acid matrix を使用し、キャリブレーション試薬には PAC Peptide Calibstandard が予めスポッティングされている Prespotted AnchorChip 96 set for Proteomics (Bruker Daltonik GmbH) を用いた。ペプチド断片は Peptide mass fingerprints (PMF) を解析後、PMF の数本のピークを選択し、タンデム MS 解析を施行した。得られたデータは IPI Human 3.85 database (89,952 配列, 36,291,020 残基) を用いた MASCOT 検索により、PMF とタンデム MS データから蛋白質を同定した。KU-Lu-6 抗体は免疫ブロット法には使用できない抗体のため、合成蛋白質を使用した免疫吸収試験にて抗原の確認を行った。合成蛋白質は Gateway system (Life Technologies) を用いた CU013414 clone と pINSOL20 destination vector で構成された MYH9 発現クローンを使用し、蛋白質の合成は Goshima らの報告に従い施行した。²⁰ 合成蛋白質の濃度は BSA を標準試料として用いた SDS-PAGE 法を行い CBB 染色したゲルのバンド濃度から算出した。

ハイブリドーマの培養上清 100 μ L に対して、合成 MYH9 蛋白質を 0.12、0.24、0.48 μ g をそれぞれ加え、室温で 2 時間反応させた後、4°C で一昼夜、吸収操作を行った。20,000 g で 10 分間の遠心後、回収した上清を一次抗体として用いた。免疫染色については 2-9. に記す。

2-8. 患者選択と組織学的診断

2002 年 1 月から 2005 年 12 月の期間に当院呼吸器外科で完全切除術を施行された非小細胞肺癌、連続 266 例を対象に後ろ向きコホート研究を行った。術前に化学療法や放射線療法が施行された症例は除外した。外科切除標本はホルマリン固定パラフィンブロックから腫瘍組織と周囲の正常肺組織を含む切片を 3 μ m にて薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行って腫瘍細胞を確認し、WHO/IASLC の分類に基づき、病理組織診断を行った。²¹ 研究対象患者については、手術施行時の年齢、性別、喫煙歴、組織型、分化度、病理学的病期、脈管侵襲、リンパ管侵襲、胸膜浸潤、術後化学療法の有無、術後生存期間に関して診療記録に基づき、調査をおこなった。また、病理学的病期については、IASLC staging system (7th edition)²² に基づいて再分類をおこなった。

2-9. KU-Lu-6 抗体の免疫組織化学染色法

外科切除標本はホルマリン固定、パラフィン包埋された腫瘍組織と周囲の正常肺組織を含む切片を 3 μ m に薄切し、キシレンで脱パラフィン後、100～70%の下降エタノール系列で脱キシレンを行い、流水水洗した。次に、内因性ペルオキシダーゼの不活化のため、3%過酸化水素水で室温、10 分間の処理を行った。次に 0.01M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) と 0.1% Tween20 を用いて 10 分間のオートクレーブ処理にて抗原賦活化処理を行った。

一次抗体の非特異的吸着を防ぐため、2% normal swine serum/Tris-buffered saline (0.01 M Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) を切片に滴下し、室温で 10 分間のブロック処理を行った。その後、切片に KU-Lu-6 抗体を希釈せずに滴下し室温で 1 晩反応させた。その後に TBS で 5 分間洗浄を 3 回行い、ChemMate ENVISION reagent (DAKO, Glostrup, Denmark) を室温で 30 分間反応させ、再度、TBS で 5 分間洗浄

を3回行った。次に、Stable DAB 溶液（Invitrogen; Carlsbad, CA）を用いて抗原抗体反応産物を可視化し、流水水洗後、マイヤーのヘマトキシリンで核染色を行った。最後に、70～100%の上昇エタノール系列で脱水を行い、キシレンで透徹後、非水溶性封入剤を用いて封入した。

2-10. 免疫組織化学染色の評価方法

KU-Lu-6 抗体に対して細胞膜が染色される腫瘍細胞を陽性とした。腫瘍細胞の染色強度を 0=陰性、1=弱陽性、2=強陽性の3グループに分類し、スコア2の腫瘍細胞を陽性とした。切片の全ての腫瘍細胞を観察し、陽性腫瘍細胞が全腫瘍細胞の25%以上を占める症例を陽性症例とした。

2-11. 統計解析

MYH9 の発現と各臨床病理学的因子との相関について、Pearson's χ^2 test もしくは Fisher's exact test を用いて検証した。また、MYH9 発現の有無による2群の全生存期間を Kaplan-Meier 曲線にて示し、群間差を log-rank test で評価した。さらに、生存に関する、複数因子の影響を単変量解析および多変量解析（比例ハザード分析）を用いて解析した。

3.結果

3-1. KU-Lu-6 抗体の特徴

AMeX固定LCN1-cis細胞を用いた免疫染色によるスクリーニングの結果、LCN1-cis細胞の細胞膜に染色性を示すが、親株であるLCN1細胞には染色性を示さないKU-Lu-6抗体に着目した（図1）。

ホルマリン固定細胞切片を用いたKU-Lu-6抗体の免疫染色によるスクリーニングの結果、シスプラチン耐性株においてMYH9の強い染色性が得られ、特に強い染色性がLC-2/ad-cis細胞に認められた（図2A）。

KU-Lu-6抗体が認識する抗原を同定するため、LC-2/ad-cis細胞の蛋白質抽出液を用いて免疫沈降法を行った。免疫沈降法の結果を図3に示す。レーン2の約250kDaの位置に抗原タンパク質と考えられるバンドが認められ、一方、陰性コントロールであるレーン3、レーン4には明らかなバンドは認められなかった（図3）。KU-Lu-6抗体が認識する抗原タンパク質を同定するために、亜鉛染色したゲルより目的のバンドを切り出し、トリプシ

ンを用いたゲル内消化を行った。回収したペプチド断片を MALDI-TOF/TOF MS にて測定し、MASCOT 検索を行った結果、1960 のアミノ酸で構成される分子量 226,532 Da の myosin-9 (MYH9, accession: IPI00019502) であると同定された。KU-Lu-6 抗体の isotype は IgM, κ であった。抗体吸収試験の結果、KU-Lu-6 抗体の染色性は合成 MYH9 蛋白質の濃度依存性に減少し、0.48 μ g の合成 MYH9 蛋白質を使用したばあいでは KU-Lu-6 抗体の染色性が完全に消失した (図 2)

3-2. 非小細胞肺癌における MYH9 の発現

MYH9 は腫瘍細胞の細胞膜や細胞質に発現を認め、特に細胞膜に著明な発現を認めた。203 例の腺癌、51 例の扁平上皮癌、10 例の大細胞癌、2 例の腺扁平上皮癌を含んだ 266 例において MYH9 陽性症例は 102 例であった (38.3%) (図 4)。MYH9 は腫瘍間質における線維芽細胞と正常気管支上皮においても発現が認められた。また正常肺胞上皮においては、発現は認められなかった。

3-3. 対象患者と臨床病理学的背景

男性 168 例、女性 98 症例であり、年齢は 34 歳から 85 歳まで (中央値 64 歳)、166 例 (62.4%) が喫煙者であった。観察期間は 3 から 129 カ月 (中央値 84 カ月) であった。142 症例が観察終了期間まで生存しており、88 症例が肺癌による死亡、19 症例が他病死、17 症例が追跡不能であった。他病死の内訳としては肺炎が 11 例、胆管細胞癌が 2 例、慢性閉塞性肺疾患が 1 例、敗血症が 1 例、脳梗塞が 1 例、急性心筋梗塞が 1 例、胃癌が 1 例、白血病が 1 例であり、手術療法関連死の患者はいなかった。追跡不能であった 17 症例は全て通院の中断を理由に生存状態の追跡調査が不能であり、これらの患者の追跡期間は 15 カ月から 92 カ月 (中央値 61 カ月) であった (表 1)。

3-4. MYH9 の発現と臨床病理学的特徴

MYH9 発現と臨床病理学的因子との関連について、MYH9 の発現は腺癌 ($P=0.014$)、低分化度 ($P=0.033$)、腫瘍内血管侵襲 ($P=0.013$)、腫瘍内リンパ管侵襲 ($P=0.045$) との間に相関が認められた。一方、年齢、

性別、喫煙歴、病理病期、リンパ節転移および胸膜浸潤との間には相関は認められなかった（表 2）。

3-5. MYH9 の発現と生存分析

266 症例全てにおいて生存分析を行った。他病死および追跡不能症例については死亡日あるいは最終生存確認日までを観察期間とし、打ち切り症例とした。全症例の 5 年生存率は 70%であり、また生存率 50%に到達しておらず、生存期間中央値の算出は不可能であった。5 年生存率は、MYH9 陽性症例では 66%、MYH9 陰性症例では 78%であった。全症例における、MYH9 陽性症例と陰性症例の Kaplan-Meier 曲線を示す(図 5A)。log-rank test において、MYH9 陽性症例は統計学的有意差をもって予後不良であった ($P=0.029$)。

さらに、腺癌症例、扁平上皮癌症例それぞれに関して生存分析を行った結果、腺癌症例（5 年生存率；MYH9 陽性症例は 69%、MYH9 陰性症例は 85%、 $P=0.007$ 図 5B）および扁平上皮癌症例（5 年生存率；MYH9 陽性症例は 43%、MYH9 陰性症例は 74%、 $P=0.032$ 図 5C）のいずれにおいても MYH9 陽性症例は統計学的有意差をもって予後不良であった。

3-6. MYH9 の発現と生存に関する単変量および多変量解析

Cox proportional hazards model を用いて、生存に関する MYH9 の発現の影響を分析した結果、単変量解析では MYH9 の発現は予後不良因子であった (hazard ratio (HR), 1.57; 95% confidence interval (CI), 1.03-2.39)。さらに、各臨床病理学的因子の影響を加えた多変量解析では、MYH9 の発現は生存に関して独立した予後不良因子であった (HR, 2.15; 95% CI, 1.17-3.92) (表 3)。

4. 考察

本研究では MYH9 は 266 症例の非小細胞肺癌において 102 例 (38.3%) で発現が認められ、MYH9 の発現は腺癌、低分化度、腫瘍内血管侵襲、腫瘍内リンパ管侵襲と有意に相関していた。また食道癌、¹¹ 膀胱癌、¹² 胃癌¹³ における過去の報告と同様に、本研究においても非小細胞肺癌切除症例における MYH9 の発現は予後不良と相関し、独立した予後予測因子である可能性が示された。過去に Maeda らは MYH9 と vimentin 両者

とも発現を認めない肺腺癌 I 期切除症例においては術後補助化学療法を行わなくても良好な予後を示すことを報告しているが、¹⁴ 本研究においては病理病期 I-III 期の扁平上皮癌を含んだ非小細胞肺癌切除症例において MYH9 の発現が生存に関する独立した予測因子となり得る可能性を示した。

本研究においては MYH9 の染色は一部の腫瘍細胞における細胞膜と細胞質に認められたが、特に細胞膜においてより強度な染色を認めた。フィブロネクチンにて伸展された MDA-MB-231 乳癌細胞株では MYH9 の発現が伸展部のより辺縁に局在することが報告されている。⁹ また MYH9 は細胞辺縁先端の極性、仮足形成への関与が報告されており、細胞膜における強度な染色は腫瘍細胞の移動、浸潤における MYH9 の活性を反映していると考えられる。

腫瘍内における脈管侵襲などの局所微小環境浸潤は腫瘍の転移における早期段階として重要である。MYH9 は局所微小環境浸潤に必要な細胞の移動に関与しており、*Vitro* においては MYH9 を抑制することで細胞の移動能が低下することが複数報告されている。^{10,11} さらに細胞辺縁における仮足形成も細胞の移動に必要であり、²³ このようなフォーメーションは Rac、WAVE complex、Arp2/3 complex によりコントロールされている。²⁴ Morimura らは MYH9 も WAVE2 に結合することにより仮足形成に関与することを報告している。²⁵ これらのことから MYH9 の発現は腫瘍細胞における移動能、浸潤能の獲得と関連し、本研究における高率な腫瘍内脈管侵襲や予後不良の結果と関連したと考えられる。

本研究では MYH9 の発現と低分化度が有意に相関して認められた。低分化腫瘍は細胞質分裂の促進により特徴づけられる。細胞質分裂においては細胞質橋により連結した 2 つの娘細胞の発生のために収縮環が形成される。MYH9 は収縮環の収縮に寄与し、細胞質分裂に重要な役割を果たしている。^{26,27} さらには MYH9 阻害剤である blebbistatin により、細胞質分裂の抑制が導かれることが報告されている。²⁸ これらのことから本研究における MYH9 の発現と低分化度が相関していると考えられる。

5.総括

非小細胞肺癌の一部において、MYH9 の発現を認め、腺癌、低分化度、腫瘍内血管侵襲、腫瘍内リンパ管侵襲、予後不良との相関が認められた。さらに、MYH9 の発現は独立した予後不良因子であることが示された。しかしながら MYH9 の発現と予後に関してはさらに多数症例、前向きコホート研究での検討が必要であると考えられる。また、非小細胞肺癌における MYH9

発現の機序の解明には、さらなる検討が必要であると考ええる。

6.将来展望

本研究から非小細胞肺癌手術症例において、MYH9 の発現が予後不良因子であることが示されたが、今後は更なる多数症例で、MYH9 の発現と予後に関して検討を行いたい。

また本研究にて着目した MYH9 はシスプラチン耐性細胞株にて著しい発現を認めている。このことは MYH9 がシスプラチンにおける治療効果予測因子となり得る可能性があり、今後はシスプラチンを用いた術後化学療法施行症例での MYH9 発現と再発率や予後に関する検討、進行非小細胞肺癌における MYH9 発現とシスプラチンを用いた化学療法の奏効率、予後に関する検討を行いたい。

7.謝辞

本研究にあたり、ご指導いただきました益田典幸教授に心から深謝致します。また、本研究の実行、論文作成にあたりご指導頂きました北里大学医療衛生学部 佐藤雄一教授、ならびにご協力いただきました北里大学医学部呼吸器内科の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

8. 参考文献

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007; 57: 43-66.
2. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2009; 28: 15-33.
3. Acharyya S, Oskarsson T, Vanharanta S, Malladi S, Kim J, Morris PG, et al. A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. *Cell* 2012; 150: 165-178.
4. Wei Y, Hu G, Kang Y. Metadherin as a link between metastasis and chemoresistance. *Cell Cycle* 2009; 8: 2132-3.
5. Xu J, Yue CF, Zhou WH, Qian YM, Zhang Y, Wang SW, et al. Aurora-A contributes to cisplatin resistance and lymphatic metastasis in non-small cell lung cancer and predicts poor prognosis. *J Transl Med* 2014; 12: 200.
6. Bresnick AR. Molecular mechanisms of nonmuscle myosin-II regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 26-33.
7. Conti MA, Adelstein RS. Nonmuscle myosin II moves in new directions. *J Cell Sci* 2008; 121: 11-8.
8. Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: 778-790.
9. Betapudi V, Licate LS, Egelhoff TT. Distinct roles of nonmuscle myosin II isoforms in the regulation of MDA-MB-231 breast cancer cell spreading and migration. *Cancer Res* 2006; 66: 4725-33.
10. Derycke L, Stove C, Vercoutter-Edouart AS, De Wever O, Dolle L, Colpaert N, et al. The role of non-muscle myosin IIA in aggregation and invasion of human MCF-7 breast cancer cells. *Int J Dev Biol* 2011; 55: 835-40.
11. Xia ZK, Yuan YC, Yin N, Yin BL, Tan ZP, Hu YR. Nonmuscle myosin IIA is associated with poor prognosis of esophageal squamous cancer. *Dis Esophagus* 2012; 25: 427-36.
12. Xiong D, Ye YL, Chen MK, Qin ZK, Li MZ, Zhang H, et al. Non-muscle myosin II is an independent predictor of overall survival for cystectomy candidates with early-stage bladder cancer. *Oncol Rep* 2012; 28: 1625-32.
13. Liu D, Zhang L, Shen Z, Tan F, Hu Y, Yu J, et al. Clinicopathological significance of NMIIA Overexpression in Human Gastric Cancer. *Int J Mol Sci* 2012; 13:

15291-304.

14. Maeda J, Hirano T, Ogiwara A, Akimoto S, Kawakami T, Fukui Y, et al. Proteomic analysis of stage I primary lung adenocarcinoma aimed at individualisation of postoperative therapy. *Br J Cancer* 2008; 98: 596-603.
15. Jiang SX, Kameya T, Asamura H, Umezawa A, Sato Y, Shinada J, et al. hASH1 expression is closely correlated with endocrine phenotype and differentiation extent in pulmonary neuroendocrine tumors. *Mod Pathol* 2004; 17: 222-9.
16. Sato Y, Mukai K, Watanabe S, Goto M, Shimosato Y. The AMeX method. A simplified technique of tissue processing and paraffin embedding with improved preservation of antigens for immunostaining. *Am J Pathol* 1986; 125: 431-5.
17. Kageyama T, Nagashio R, Ryuge S, Matsumoto T, Iyoda A, Satoh Y, et al. HADHA is a potential predictor of response to platinum-based chemotherapy for lung cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011; 12: 3457-63.
18. Nagashio R, Sato Y, Matsumoto T, Kageyama T, Satoh Y, Shinichiro R, et al. Expression of RACK1 is a novel biomarker in pulmonary adenocarcinomas. *Lung Cancer* 2010; 69: 54-9.
19. Kivela A, Parkkila S, Saarnio J, Karttunen TJ, Kivela J, Parkkila AK, et al. Expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase isozyme XII in normal human gut and colorectal tumors. *Am J Pathol* 2000; 156: 577-84.
20. Goshima N, Kawamura Y, Fukumoto A, Miura A, Honma R, Satoh R, et al. Human protein factory for converting the transcriptome into an in vitro-expressed proteome. *Nat Methods* 2008; 5: 1011-7.
21. Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, Harris CC. *World Health Organization Classification of Tumors; Pathology and Genetics of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. Lyon, France IARC Press; 2004
22. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* 2007; 2: 706-14.
23. Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J. Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17: 559-64.
24. Ridley AJ. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol* 2006; 16: 522-9.
25. Morimura S, Suzuki K, Takahashi K. Nonmuscle myosin IIA is required for lamellipodia formation through binding to WAVE2 and phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 404: 834-40.

26. Matsumura F. Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. Trends Cell Biol 2005; 15: 371-7.
27. Glotzer M. The molecular requirements for cytokinesis. Science 2005; 307: 1735-9.
28. Guha M, Zhou M, Wang YL. Cortical actin turnover during cytokinesis requires myosin II. Curr Biol 2005; 15: 732-6.

9. 業績目録

(I) 原 著

- ◎1. Katono K, Sato Y, Jiang SX, Kobayashi M, Nagashio R, Ryuge S, Fukuda E, Goshima N, Satoh Y, Saegusa M, Masuda N. Prognostic significance of MYH9 expression in resected non-small cell lung cancer. PLoS ONE 2015; 10: e0121460
- 2. Igawa S, Kasajima M, Ishihara M, Kimura M, Hiyoshi Y, Niwa H, Kusuhara S, Harada S, Asakuma M, Otani S, Katono K, Sasaki J, Masuda N. Evaluation of gefitinib efficacy according to body surface area in patients with non-small cell lung cancer harboring an EGFR mutation. Cancer Chemother Pharmacol 2014; 74: 939-46.
- 3. Ryuge S, Sato Y, Jiang SX, Wang G, Kobayashi M, Nagashio R, Katono K, Iyoda A, Satoh Y, Masuda N. The clinicopathological significance of Lgr5 expression in lung adenocarcinoma. Lung Cancer 2013; 82:143-8.
- 4. Ryuge S, Sato Y, Jiang SX, Wang G, Matsumoto T, Katono K, Inoue H, Iyoda A, Satoh Y, Yoshimura H, Masuda N. Prognostic impact of nestin expression in resected large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. Lung Cancer 2012; 77: 415-20.
- 5. Ryuge S, Sato Y, Wang GQ, Matsumoto T, Jiang SX, Katono K, Inoue H, Satoh Y, Masuda N. Prognostic significance of nestin expression in resected non-small cell lung cancer. Chest 2011; 139: 862-9.

(II) 著 書

な し

(III) 総説・講座

な し

(IV) 症例・臨床治験・その他

- 1. 上遠野 健、木村 美智子、龍華 慎一郎、井川 聡、矢那瀬 信雄、益田 典幸. 肺大細胞癌術後再発に対してペメトレキセド長期治療中に肺扁平上皮癌の出現を認めた1例. 肺癌 2013; 56: 29-34.

10. 図表

表 1 — *Characteristics of the Patients*

Characteristics	Patients, N (%) (N = 266)
Age, y	
Median age (range)	64 (34-85)
< 65	129 (48.5)
≥ 65	137 (51.5)
Gender	
Male	168 (63.2)
Female	98 (36.8)
Smoking habit	
NS	100 (37.6)
S	166 (62.4)
Histological type	
AD	203 (76.3)
SQ	51 (19.2)
Others	12 (4.5)
Tumor differentiation	
Well/Moderately	204 (79.7)
Poorly	52 (20.3)
p-TNM stage*	
Stage I	153 (57.5)
Stage II	52 (19.6)
Stage III	61 (22.9)
Receiving adjuvant chemotherapy	
Yes	37 (13.9)
No	229 (86.1)
Vital status	
Alive	142 (53.4)
Lung cancer-related death	88 (33.1)
Other causes of death	19 (7.1)
Unknown	17 (6.4)

AD = adenocarcinoma; NS = never smoker; p-TNM = pathological TNM; S = smoker
SQ = squamous cell carcinoma

*Each case was reassigned to a pathological stage on the basis of the IASLC
Lung Cancer Staging Project (seventh edition).

表 2—*Relationships between MYH9 Expression and Clinicopathological parameters*

Clinicopathological Parameters	MYH9 Expression		Total	P-Value
	Positive (N = 102)	Negative (N = 164)		
Age, y; N (%)				.906
< 65	49 (38.0)	80 (62.0)	129	
≥ 65	53 (38.7)	84 (61.3)	137	
Gender; N (%)				.527
Male	62 (36.9)	106 (63.1)	168	
Female	40 (40.8)	58 (59.2)	98	
Smoking habit; N (%)				.865
NS	39 (39.0)	61 (61.0)	100	
S	63 (38.0)	103 (62.0)	166	
Histological type; N (%)				.014
AD	86 (42.6)	117 (57.4)	203	
Non-AD	16 (25.4)	47 (74.6)	63	
Tumor differentiation; N (%)				.033
Well/Moderately	73 (35.8)	131 (64.2)	204	
Poorly	27 (51.9)	25 (48.1)	52	
p-TNM stage*; N (%)				.050
Stage I	51 (33.3)	102 (66.7)	153	
Stage II/III	51 (45.1)	62 (54.9)	113	
Nodal status; N (%)				.093
N0	64 (35.0)	119 (65.0)	183	
N1/N2/N3	38 (45.8)	45 (54.2)	83	
Vascular invasion; N (%)				.013
Yes	55 (48.2)	59 (51.8)	114	
No	34 (29.6)	81 (70.4)	115	
Lymphatic invasion; N (%)				.045
Yes	40 (44.0)	51 (56.0)	91	
No	35 (30.4)	80 (69.6)	115	
Pleural invasion; N (%)				.490
Yes	41 (41.0)	59 (59.0)	100	
No	61 (36.7)	105 (63.3)	166	

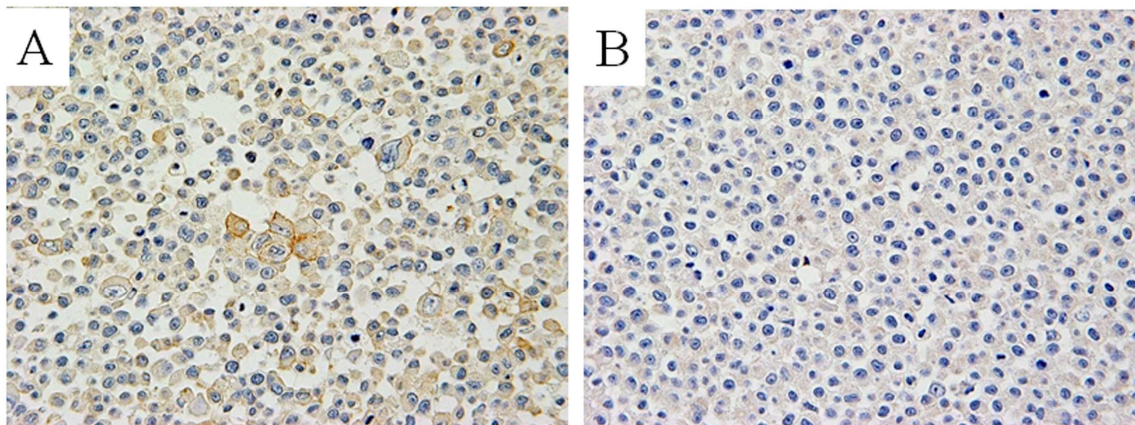
See Table 1 for explanation of abbreviations and note on asterisk.

表 3—Uni- and Multivariable Analyses of the Effect of MYH9 Expression on Survival

Factors	Univariable Analysis			Multivariable Analysis		
	HR	95% CI	P-Value	HR	95% CI	P-Value
MYH9 expression Positive vs. Negative	1.57	1.03-2.39	0.03	2.15	1.17-3.92	0.01
Age ≥ 65 vs. < 65	1.11	0.73-1.69	0.60	—	—	—
Gender Male vs. Female	1.39	0.89-2.18	0.14	—	—	—
Smoking habit Smokers vs. Never Smokers	1.41	0.91-2.20	0.12	—	—	—
Histological type Non-AD vs. AD	1.94	1.23-3.06	0.004	0.50	0.23-1.09	0.08
p-TNM stage Stage II/III vs. Stage I	4.58	2.89-7.26	< 0.001	2.23	1.13-4.40	0.02
Adjuvant chemotherapy No vs. Yes	2.81	1.73-4.57	< 0.001	3.55	1.78-7.07	<0.001
Tumor differentiation Poorly vs. Well/Moderately	2.45	1.53-3.92	< 0.001	2.21	1.14-4.26	0.01
Vascular invasion Yes vs. No	5.67	3.25-9.90	< 0.001	1.62	0.70-3.72	0.25
Lymphatic invasion Yes vs. No	4.43	2.65-7.40	< 0.001	1.46	0.72-2.94	0.28
Pleural invasion Yes vs. No	2.64	1.73-4.03	< 0.001	1.99	1.09-3.64	0.02

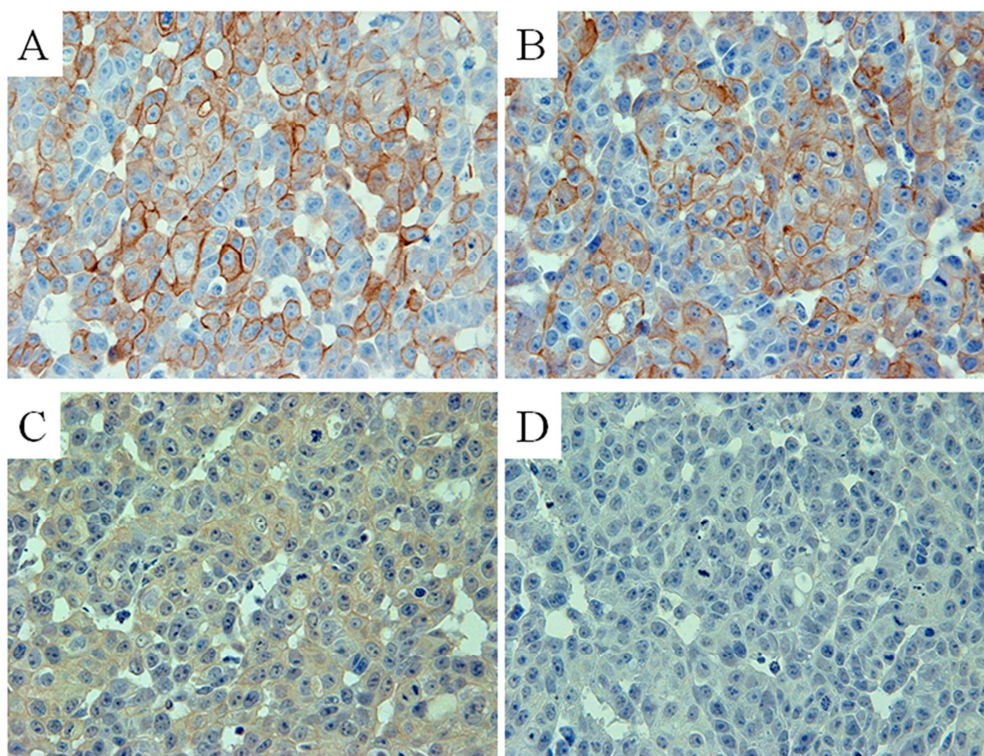
Analyses were performed using Cox proportional hazard regression. AD = adenocarcinoma;
HR = hazard ratio

图 1



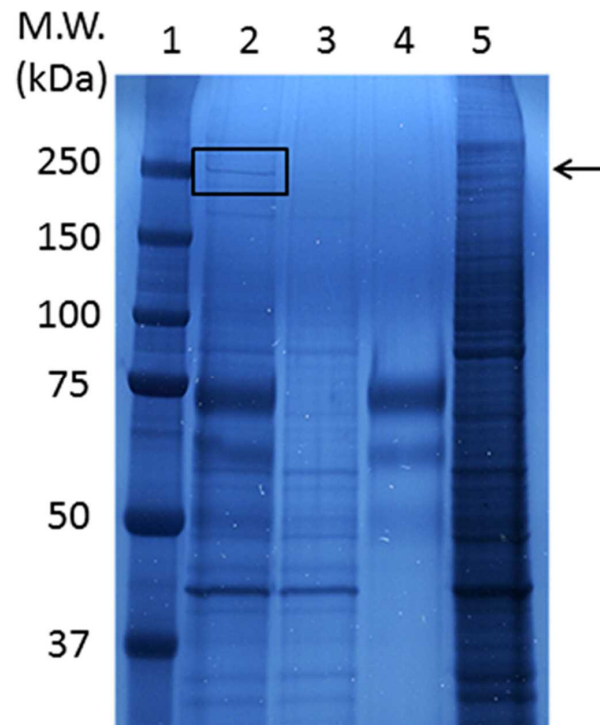
Immunohistochemical screening of the Ku-Lu-6 antibody with AMeX-fixed LCN1-cis (A) and LCN1 (B) cells. Membranous staining was observed in LCN1-cis cells, but not in LCN1 cells. (original magnification: A, B $\times 400$)

图 2



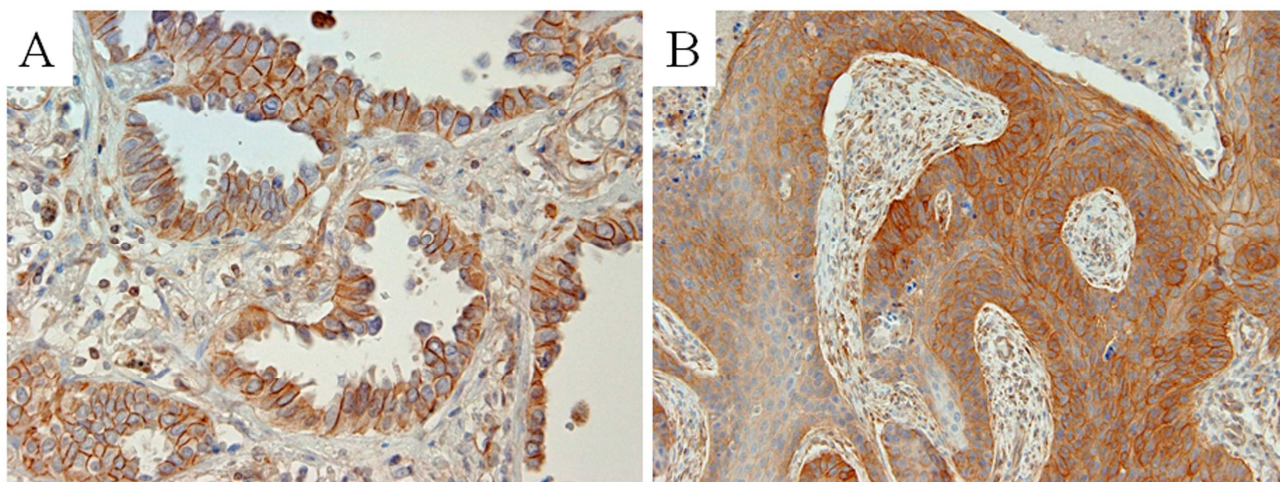
Antibody absorption test for MYH9. KU-LU-6 antibody supernatant was pre-absorbed with none (A), 0.12 ug (B), 0.24 ug (C), and 0.48 ug (D) of synthetic MYH9 proteins. Each absorbed antibody was immunostained with formalin-fixed LC2/ad-cis cells. The stainability of KU-Lu-6 antibody was gradually reduced depending on the concentration of MYH9 protein.

图 3



Immunoprecipitation with KU-Lu-6 antibody. Lane 1: molecular weight marker, lane 2: LC-2/ad-cis lysate combined with KU-Lu-6 antibody, lane 3: LC-2/ad-cis lysate combined with protein L, lane 4: KU-Lu-6 antibody combined with protein L, lane 5: LC-2/ad-cis lysate. Lanes 3 and 4 are negative controls, and specific immunoprecipitated product with KU-Lu-6 antibody was detected in lane 2 (arrow).

图 4



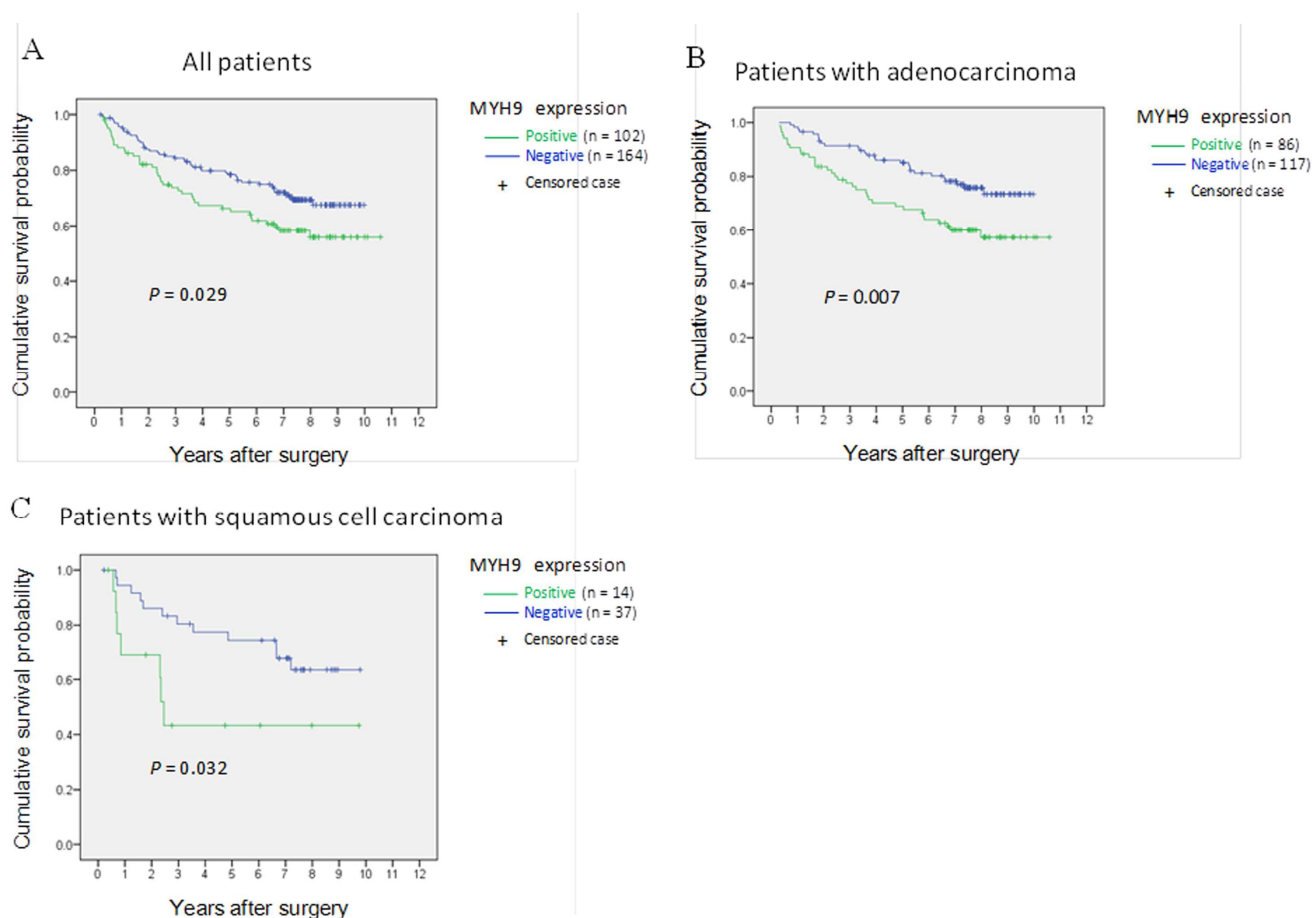
Representative immunohistochemical staining for MYH9 in NSCLC.

A: MYH9 was strongly expressed in the membrane of tumor cells in adenocarcinoma.

B: MYH9 was strongly expressed in the membrane and cytoplasm of tumor cells in

squamous cell carcinoma. (original magnification: A, B $\times 400$)

Figure 5



Cumulative survival of patients with NSCLC according to MYH9 expression estimated by the Kaplan-Meier method. (A) for all patients; (B) for patients with adenocarcinoma; (C) for patients with squamous cell carcinoma, treating all other causes of death and lost to follow-up as censored cases. MYH9 expression was significantly correlated with poorer survival in resected NSCLCs.