

Up-regulation of CD40 with juxtacrine activity in human non-small lung cancer cells correlates with poor prognosis

(非小細胞肺癌細胞においてジャクスタクライン活性を伴う
CD40の発現増大は不良な予後に相関する)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 CD40 は分子量 42-50kDa の Tumor necrosis factor receptor superfamily の一つに属する膜糖タンパクであり、その Ligand となる CD154(CD40 ligand)は分子量 39kDa の膜糖タンパクである。CD40 は主に B リンパ球、CD154 は主に T リンパ球に発現することが知られ、CD40-CD154 相互作用は B リンパ球の分化・増殖に関与することが知られている。最近では肺癌を含む悪性腫瘍細胞における CD40、CD154 の発現が報告されているが、癌細胞における発現の意味や、肺癌細胞での発現と症例の生命予後などについての関係は明らかではない。以上より、本研究は非小細胞肺癌組織における CD40、CD154 の発現をしらべ、他の因子との相関を統計学的に検討することでその分子生物学的意義を推測、さらに細胞株を用いた実験系によりそれを明らかにすることを目的とし、外科切除非小細胞肺癌検体における CD40、CD154 の免疫組織学的検討と、in vitro における肺癌細胞間の CD40-CD154 相互作用に関する細胞生物学的機能解析を行った。

【材料と方法】 ヒト非小細胞肺癌細胞株（腺癌細胞株 A549, ABC-1, PC3, RERF-LCMS, RERF-LCOK, VMRC-LCD, 扁平上皮癌細胞株 H226, LC-1, LK2, PC10）10 株と正常肺組織を材料に Western blot を施行し、CD40、CD154 のタンパク発現をスクリーニングした。同様に上記 10 株の細胞株を CB17/SCID マウスに皮下移植して得られた腫瘍 (xenografts) からタンパク抽出を施行し、タンパク発現を比較検討した。非小細胞肺癌切除症例 129 症例（平均年齢 62.8 歳）の薄切切片に対して抗 CD40 抗体、抗 CD154 抗体を用いて免疫組織学的染色を施行した。CD40 の陽性対照は正常リンパ節切片を用いた。CD154 免疫染色の陽性対照、陰性対照については後述する。免疫染色の結果は 1)リンパ球において CD40 陽性群/陰性群、2)非小細胞肺癌細胞において CD40 陽性群/陰性群、3)非小細胞肺癌細胞において CD154 陽性群/陰性群に分類し、臨床病理学的因子との相関、および予後との関係について統計学的検討を行った。CD40 陽性リンパ球の数と CD40 陽性癌細胞または CD154 陽性癌細胞の関係を Mann-Whitney's U-test で評価した。臨床病理学的因子との相関はカイ二乗検定で評価した。生存曲線を Kaplan-Meier 法で作成し、上記 1)~3)の 2 群間を log-rank 法で検討した。単変量解析・多変量解析は Cox の比例ハザードモデルを用いて検討した。p<0.05 を有意差ありと判定した。細胞増殖アッセイ：ヒト非小細胞肺癌細胞株を 96 ウェルプレートに各 5×10^3 個播種し、可溶性リコンビナント (rhs) CD154、

抗 CD40 抗体、抗 CD154 抗体を加え、細胞の増殖を Cell Counting Kit-8 (WST-8)を用いて検討した。ジャクスタクライン(直接接触)細胞増殖アッセイ:96 ウェルプレートに各 5×10^3 個のドナー細胞を播種し、ホルマリン固定したのち、各 5×10^3 個のアクセプター細胞を細胞-細胞間の直接接触下で 48 時間共培養し、細胞増殖実験を試行した。同時にドナー細胞とアクセプター細胞の間にトランスウェルを用いたパラクライン環境下で 48 時間共培養し比較検討した。細胞増殖の評価は WST-8 を用いて評価した。

- 【結果】 1. Western Blot : CD40 の発現は肺癌細胞株 10 株中 5 株に認められた。CD154 タンパクは同 8 株に認められた。xenograft において CD40 は LK2 以外で発現低下を認めた。CD154 の発現状況は xenograft と培養細胞株に差は見られなかった。
2. xenograft の CD40、CD154 免疫組織学的染色 : xenograft を材料とした Western blot の結果は CD40、CD154 の免疫組織学的染色の結果を反映した。xenograft LK2:CD40(+), xenograft ABC-1:CD40(-), xenograft PC10:CD154(-), xenograft LK2:CD154(-)を示したため、これらの xenograft 切片を免疫染色の陽性対照、陰性対照として使用した。
3. 肺癌患者検体 129 例による CD40,CD154 の免疫組織学的染色 : 臨床検体 129 例中、癌細胞において CD40 陽性群は 67 例(51.9%)、CD154 陽性例は 76 例(58.9%)と判定した。
4. 免疫染色の統計的解析 : 癌細胞 CD40 陽性群における CD40 陽性リンパ球の数は癌細胞 CD4 陰性群と比較して有意に多かった。癌細胞 CD40 陽性群 (n=67) の予後は陰性群に比べ有意に不良であった。さらに、癌細胞で CD40 陽性/陰性群、CD154 陽性/陰性群を組み合わせた 4 群を比較すると、CD40/154(+/+)群の予後は他の 3 群に比べ有意に不良であった。これに対して CD40/154(-/-)群の予後は他群に比べ有意に良好であった。臨床病理学的因子との相関を評価した結果、癌細胞での CD40 発現は、組織型、T 因子、N 因子、病期に相関した。癌細胞での CD154 発現は、年齢、組織型に相関した。単変量解析、多変量解析において T 因子、N 因子、癌細胞における CD40 発現の有無が独立予後規定因子であった。
5. 細胞増殖アッセイ : 3 種類の肺癌細胞株 PC10(CD40/154(-/+))、LC-1(CD40/154(+/+))、LK2(CD40/154(+/-))に対して細胞増殖実験を施行した。rhCD154 の曝露はいずれの細胞株の増殖にも影響を与えなかった。LC-1(CD40/154(+/+))の増殖は抗 CD40 抗体、CD154 抗体の存在で有意に低下した。一方で、抗 CD40 抗体、抗 CD154 抗体は PC10、LK2 の増殖に影響を与えなかった。
6. ジャクスタクラインの系による細胞増殖アッセイ : CD40 陽性細胞である LK2, LC-1 の細胞増殖について CD154 陽性細胞、CD154 陰性細胞と接触させるジャクスタクラインの系において検討した。アクセプターLK2(CD40/154(+/-))細胞は、ホルマリン固定した CD154 陽性ドナー細胞である PC10、LC-1 の存在下で有意に細胞増殖を認めた。それに対して、LC-1(CD40/154(+/+))細胞増殖はいずれのドナー細胞の存在下でも差は認められなかった。また、パラクラインの系においては、どのドナー細胞の存在においてもアクセプター LK2、アクセプターLC-1 の増殖に影響を与えなかった。

【考察】 本研究は B リンパ球の増殖にかかわる CD40 とそのリガンドである CD154 の非小細胞肺癌における発現状況と、その分子生物学的意義について検討した報告である。とくに、本研究は非小細胞肺癌細胞における CD40-CD154 のジャクスタクライン反応が肺癌細胞の増殖に関与することを示した最初の報告である。CD40 の発現状況が培養細胞株と xenograft で変化することより、CD40 の発現はその細胞周囲を取り巻く環境に影響を受ける可能性が示唆された。また免疫染色の結果より、癌細胞で CD40 陽性例は予後不良であり、細胞増殖にかかわる可能性が示唆された。癌細胞における CD40-CD154 相互反応を細胞増殖実験で確認した結果、CD40/154(+/-)の LK2 細胞が CD154 陽性細胞とジャクスタクラインの系を介して細胞増殖にかかわることが示されたが、CD40/154(+/)の LC-1

細胞は自らが CD154 を有するため、ここにさらに CD154 陽性細胞を共培養しても細胞増殖に差はみられなかった。以上より、癌細胞におけるジャクスタクリンの系における CD40-CD154 相互反応は癌の増殖に関与し、非小細胞肺癌において予後を規定することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 福 田 諭
副 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 近 藤 哲

学位論文題名

Up-regulation of CD40 with juxtacrine activity in human non-small lung cancer cells correlates with poor prognosis

(非小細胞肺癌細胞においてジャクスタクライン活性を伴う
CD40の発現増大は不良な予後に相関する)

CD40は分子量42-50kDaのtumor necrosis factor receptor superfamilyの一つに属する膜糖タンパクであり、そのligandとなるCD154は分子量39kDaの膜糖タンパクである。CD40は主にBリンパ球、CD154は主にTリンパ球に発現することが知られ、CD40-CD154相互作用はBリンパ球の分化・増殖に関与することが知られている。免疫細胞のマーカーであるこれらの分子が最近では悪性腫瘍においても発現していることが報告されているが、癌細胞における発現の意味や、肺癌細胞での発現と患者の生命予後などについての関係は明らかではない。本研究では非小細胞肺癌組織におけるCD40、CD154の発現と他の因子との相関を統計学的に検討することでその分子生物学的意義を推測し、さらに細胞株を用いた実験系によりそれを明らかにすることを目的とした。

はじめにヒト非小細胞肺癌細胞株10株(腺癌細胞株A549、ABC-1、PC3、RERF-LCMS、RERF-LCOK、VMRC-LCD、扁平上皮癌細胞株H226、LC-1、LK2、PC10)と正常肺組織を材料にWestern blotを施行し、CD40、CD154のタンパク発現を検討した。同様に上記10株の細胞株をCB17/SCIDマウスに皮下移植して得られた腫瘍(xenograft)からタンパク抽出を施行し、タンパク発現を比較検討した。CD40の発現は肺癌細胞株10株中5株に認められ、CD154タンパクは同8株に認められた。XenograftにおいてCD40はLK2以外で発現低下を認めた。CD154の発現はxenograftと培養細胞株において差は見られなかった。

次に非小細胞肺癌129切除症例の薄切片に対して抗CD40抗体、抗CD154抗体を用いて免疫組織学的染色を施行した。対象群を1)腫瘍浸潤リンパ球におけるCD40陽性群/陰性群、2)癌細胞におけるCD40陽性群/陰性群、3)癌細胞におけるCD154陽性群/陰性群に分類し、統計学的に検討した結果、癌細胞CD40陽性群の転帰は陰性群に比べ有意に不良であった。単変量および多変量解析において癌細胞のCD40発現の有無が独立予後規定因子であった。臨床病理学的因子との検討で癌細胞CD40の発現はT因子、N因子に相関し、CD40は

癌の増殖に関連すると考えられ、細胞増殖実験を施行した。CD40/154(+/+)である LC-1 の増殖は抗 CD40 抗体、CD154 抗体の存在で著明に低下した。また、異なる 2 種類の細胞を直接接触させる *juxtacrine* の系においては CD40/154(+/-)であるアクセプター-LK2 細胞は、ホルマリン固定した CD154 陽性ドナー細胞である PC10、LC-1 の存在下で有意に細胞増殖を認め、CD154 陽性ドナー細胞に抗 CD154 抗体を加えるとアクセプター-LK2 細胞の増殖抑制を認めた。以上より肺癌細胞における CD40 発現は不良な予後に相関し、CD40-CD154 相互作用は腫瘍細胞の増殖に関与すると考えられた。

口頭発表に続き、副査福田諭教授より非小細胞肺癌における報告で組織型による CD40 発現状況の違いの有無、染色性の分類の決定法、癌における CD40 の臨床応用についての質問があった。次に副査秋田弘俊教授より *in vitro* において可溶性 CD154 を加えても CD40 陽性細胞株の増殖が認められなかった理由、正常気管支上皮における CD40、CD154 の発現状況、癌化と CD40、CD154 の発現機序、これらの発現に関わる転写因子の存在と扁平上皮癌において発現が多く見られる理由についての質問があった。次に副査近藤哲教授より臨床検体においては CD40 陽性の癌で CD154 発現の有無と予後に関連が見られなかった理由についての質問があった。最後に主査今村雅寛教授より CD40、CD154 の癌細胞における発現は非小細胞肺癌に限った現象であるのか否か、*juxtacrine* の実験系で抗 CD40 抗体を用いたか否か、ホルマリン固定の抗原性変化への影響についての質問があった。

いずれの質問に対しても申請者はその主旨をよく理解し、自らの研究内容と文献的考察を混じえて適切に回答した。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。