Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

High expression level of serpin peptidase inhibitor clade E member 2 is associated with poor prognosis in lung adenocarcinoma

堂國, 良太

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2022-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第8325号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1008325

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

High expression level of serpin peptidase inhibitor clade E member 2 is associated with poor prognosis in lung adenocarcinoma

肺腺がんにおいて SERPINE2 の高発現は予後不良因子となる

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

呼吸器内科学

(指導教員：平田　健一 教授)

堂國 良太

【背景】

Serine proteinase inhibitor clade E member 2(SERPINE2)は神経膠腫細胞で神経突起促進因子として同定され、セリンプロテアーゼ活性を有し、SERPINE ファミリーに分類される。SERPINE2 は血管内皮細胞、線維芽細胞、マクロファージ、血小板、平滑筋細胞、軟骨細胞、星状細胞の他、乳がん、膵がん、胃がん、大腸がんなどの腺がん細胞で発現し、がん細胞の悪性度との関連があると報告されている。腸管上皮細胞において、SERPINE2 は RAS、BRAF、MEK1 により発現が誘導され、MAPK 経路を介した腫瘍形成促進に寄与することが報告されている。

肺腺がんにおいては、SERPINE2 の高発現例があることが報告されているが、その予後や悪性度との関連は明らかにされていない。今回我々は肺腺がん手術検体における SERPINE2 の発現と予後の検討を行い、非小細胞肺がん細胞株を用いて、SERPINE2 発現が細胞増殖、アポトーシスに与える影響を検証した。

【方法】

2014 年 1 月から同年 12 月までの間に神戸大学医学部附属病院呼吸器外科で治癒切除された肺腺がんの全 74 例について、スパイラルアレイを作成し、SERPINE2 の免疫染色を行い、その発現と予後との関連を調べた。手術検体の

パラフィンブロックからがん組織部分を 50-100 μm 厚で切り出し、その切片をロール状に巻いてブロックに包埋しスパイラルアレイを作製した。抗ヒト SERPINE2 抗体(Proteintech Inc、Lot:00014298)を一次抗体として ImmPact DAB(Vector Laboratories Inc)を用いて免疫染色を行い、正常組織部分に比して腫瘍細胞において 50%以上の陽性割合である症例を SERPINE2 高発現群、50%未満の症例を低発現群と定義し、患者背景因子の検討と予後解析を行った。また、がんゲノムデータベースである The Cancer Genome Atlas(TCGA)の肺腺がんデータセットを用いて、腫瘍組織中 SERPINE2 TPM が第一四分位の群を高 SERPINE2 TPM 群、第四四分位の群を低 SERPINE2 TPM 群として予後解析を行った。

細胞実験では、SERPINE2 の発現量が比較的多い非小細胞肺がん細胞株を用いて、siRNA による SERPINE2 のノックダウンを行い、Cell Counting Kit-8 (CCK-8)(Dojindo Inc)による細胞数アッセイおよび Fas リガンド刺激によるアポトーシス関連蛋白の変化を評価した。細胞数アッセイでは、siRNA 処理した非小細胞肺がん細胞株を 96 ウェル培養プレートに細胞数 5000/ウェルとなるように播種し、6 時間の前培養の後、0 時間、24 時間、48 時間、72 時間後の細胞数を、CCK-8 を用いて評価した。アポトーシス関連蛋白の評価では、siRNA 処理した細胞株を 6 ウェル培養プレートに播種し、6 時間の前培養の後、200 ng/ml の可溶性 Fas リガンド(Wako Inc)で処理し、0 時間、2 時間、6 時間、12 時間、24 時間、48 時間後の Caspase-9、Caspase-7、Bax、Bcl-2 の発現量の変化を Western blotting により評価した。

【結果】

外科的完全切除例 74 例のうち、SERPINE2 免疫染色では 19 例(26%)が高発現群であった。高発現群において有意にリンパ管浸潤を来している割合が高かった($p<0.02$)が、他の背景因子には有意な差はみられなかった。予後解析では SERPINE2 高発現群において生命予後が悪く($P<0.02$)、Cox 比例ハザード解析による多変量解析でも同様の結果であり(HR 9.05、95%CI 1.20-68.0、$P<0.05$)、独立した予後不良因子であると考えられた。TCGA データセットを用いた解析では、高 SERPINE2 TPM 群において対照群と比べて生命予後が悪く(HR 1.5、$P<0.05$)、免疫染色を用いた予後解析と同様の結果であった。

非小細胞肺がん細胞株における、SERPINE2 の mRNA 発現量を RT-PCR で解析したところ、気管支上皮細胞株 BEAS-2B と比較して、H460、A549、PC9 においてそれぞれ 1030 倍、401 倍、46.5 倍の発現があり、腺がん細胞株である A549、PC9 をノックダウン解析に用いることとし、siRNA によるノックダウンが行えていることを RT-PCR および Western Blotting で確認した。CCK-8 を用いた細胞数アッセイでは、A549 および PC9 において陰性コントロールと比較

し、ノックダウン#1、#2 では 72 時間後の細胞数が有意に少なかった($p<0.05$)。A549、PC9 に対する Fas リガンド刺激では SERPINE2 ノックダウンによりアポトーシスがより強く誘導された。特に A549 においてはノックダウンにより抗アポトーシス蛋白である Bcl-2 の発現が抑制されていた。

【考察】

手術検体を用いた解析では、がん組織中の SERPINE2 発現量がリンパ管浸潤と生命予後不良と関連のあることが判明し、高発現群において予後が不良であることは、乳がん、胃がん、骨肉腫における既報と同様の結果であった。A549、PC9 を用いた細胞実験では、SERPINE2 が抗アポトーシスに働き、その発現量が多ければがん細胞の悪性度が高まる可能性が示唆された。

上皮成長因子(EGF)が MEK/ERK の活性化を介して SERPINE2 発現を誘導し、SERPINE2 のノックダウンが EGF による細胞増殖を抑制することが報告されており、SERPINE2 は EGF が細胞増殖を引き起こすためのエフェクター分子であると考えられた。また、CHO-K1 細胞において SERPINE2 がプラスミノーゲン誘導性アポトーシスを抑制したという報告がある一方で、前立腺がん細胞においては SERPINE2 がアポトーシスを誘導するという報告もあり、がん種によってその働きが異なると考えられた。我々の研究では肺腺がん細胞において SERPINE2 はアポトーシスを抑制しており、肺がんの治療分子となる可能性があると考えられた。食道がんにおいては、SERPINE2 は BMP4 の発現を介して細胞遊走、浸潤を誘導することが報告されているが、今回肺腺がん細胞株においては SERPINE2 ノックダウンにより BMP4 の発現量は変化せず、細胞遊走、浸潤の程度に変化は見られなかった。

今回の研究においては症例数が比較的少なく、その為 T 因子、N 因子など他の予後不良因子については有意な結果が得らなかったと考えられた。

【結語】

SERPINE2 は肺腺がんにおいてアポトーシスの抑制を介して、その独立した予後不良因子となることを明らかにした。今回の知見から、SERPINE2 は肺腺がんの治療標的となりうると考えられた。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3176 号	氏 名	堂國 良太
論文題目 Title of Dissertation	肺腺がんにおいて SERPINE2 の高発現は予後不良因子となる High expression level of serpin peptidase inhibitor clade E member 2 is associated with poor prognosis in lung adenocarcinoma		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 副 査 Vice-examiner 副 査 Vice-examiner	児玉裕三 福本巧 菊地博信	

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

【背景】

Serine proteinase inhibitor clade E member 2(SERPINE2)は神経膠腫細胞で神経突起促進因子として同定され、セリンプロテアーゼ活性を有し、SERPINE ファミリーに分類される。SERPINE2 は血管内皮細胞、線維芽細胞、マクロファージ、血小板、平滑筋細胞、軟骨細胞、星状細胞の他、乳がん、膵がん、胃がん、大腸がんなどの腺がん細胞で発現し、がん細胞の悪性度との関連があると報告されている。肺腺がんにおいては、SERPINE2 の高発現例があることが報告されているが、その予後や悪性度との関連は明らかにされていない。今回研究者らは肺腺がん手術検体における SERPINE2 の発現と予後の検討を行い、非小細胞肺がん細胞株を用いて、SERPINE2 発現が細胞増殖、アポトーシスに与える影響を検証した。

【方法】

2014 年 1 月から同年 12 月までの間に神戸大学医学部附属病院呼吸器外科で治癒切除された肺腺がんの全 74 例について、スパイラルアレイを作成し、SERPINE2 の免疫染色を行い、その発現と予後との関連を調べた。正常組織部分に比して腫瘍細胞において 50%以上の陽性割合である症例を SERPINE2 高発現群、50%未満の症例を低発現群と定義し、患者背景因子の検討と予後解析を行った。また、がんゲノムデータベースである The Cancer Genome Atlas(TCGA)の肺腺がんデータセットを用い予後解析を行った。細胞実験では、非小細胞肺がん細胞株を用い、siRNA による SERPINE2 のノックダウンを行い、細胞数アッセイおよび Fas リガンド刺激によるアポトーシス関連蛋白の変化を評価した。アポトーシス関連蛋白の評価では、Caspase-9、Caspase-7、Bax、Bcl-2 の発現量の変化を Western blotting により評価した。

【結果】

外科的完全切除例 74 例のうち、SERPINE2 免疫染色では 19 例(26%)が高発現群であった。高発現群において有意にリンパ管浸潤を来している割合が高かった($p<0.02$)が、他の背景因子には有意な差はみられなかった。予後解析では SERPINE2 高発現群において生命予後が悪く($P<0.02$)、Cox 比例ハザード解析による多変量解析でも同様の結果であり(HR 9.05、95%CI 1.20-68.0、$P<0.05$)、独立した予後不良因子であると考えられた。TCGA データセットを用いた解析では、高 SERPINE2 TPM 群において対照群と比べて生命予後が悪く(HR 1.5、$P<0.05$)、免疫染色を用いた予後解析と同様の結果であった。

非小細胞肺がん細胞株における、SERPINE2 の mRNA 発現量を RT-PCR で解析したところ、気管支上皮細胞株 BEAS-2B と比較して、H460、A549、PC9 においてそれぞれ 1030 倍、401 倍、46.5 倍の発現があり、腺がん細胞株である A549、PC9 をノックダウン解析に用いることとし、siRNA によるノックダウンが行えていることを RT-PCR および Western Blotting で確認した。CCK-8 を用いた細胞数アッセイでは、A549 および PC9 において陰性コントロールと比較し、ノックダウン#1、#2 では 72 時間後の細胞数が有意に少なかった($p<0.05$)。

A549、PC9 に対する Fas リガンド刺激では SERPINE2 ノックダウンによりアポトーシスがより強く誘導された。特に A549 においてはノックダウンにより抗アポトーシス蛋白である Bcl-2 の発現が抑制されていた。

【考察および結論】

手術検体を用いた解析では、がん組織中の SERPINE2 発現量がリンパ管浸潤と生命予後不良と関連のあることが判明し、高発現群において予後が不良であることは、乳がん、胃がん、骨肉腫における既報と同様の結果であった。A549、PC9 を用いた細胞実験では、SERPINE2 が抗アポトーシスに働き、その発現量が多ければがん細胞の悪性度が高まる可能性が示唆された。

上皮成長因子(EGF)が MEK/ERK の活性化を介して SERPINE2 発現を誘導し、SERPINE2 のノックダウンが EGF による細胞増殖を抑制することが報告されており、SERPINE2 は EGF が細胞増殖を引き起こすためのエフェクター分子であると考えられた。また、CHO-K1 細胞において SERPINE2 がプラスミノーゲン誘導性アポトーシスを抑制したという報告がある一方で、前立腺がん細胞においては SERPINE2 がアポトーシスを誘導するという報告もあり、がん種によってその働きが異なると考えられた。我々の研究では肺腺がん細胞において SERPINE2 はアポトーシスを抑制しており、肺がんの治療分子となる可能性があると考えられた。食道がんにおいては、SERPINE2 は BMP4 の発現を介して細胞遊走、浸潤を誘導することが報告されているが、今回肺腺がん細胞株においては SERPINE2 ノックダウンにより BMP4 の発現量は変化せず、細胞遊走、浸潤の程度に変化は見られなかった。今回の研究においては症例数が比較的少なく、その為 T 因子、N 因子など他の予後不良因子については有意な結果が得らなかったと考えられた。

SERPINE2 は肺腺がんにおいてアポトーシスの抑制を介して、その独立した予後不良因子となることを明らかにした。今回の知見から、SERPINE2 は肺腺がんの治療標的となりうると考えられた。

本研究は、肺腺がんにおける SERPINE2 の発現と予後との関連について検討したものであるが、SERPINE2 が抗アポトーシスに働くことにより予後不良因子となることを示した価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があるものと認める。