

博士学位論文

肺腺癌で高発現する分泌性タンパク質 LIPH の解析

Characterization of Lipase member H (LIPH), a secreted protein,
selectively up-regulated in human lung adenocarcinomas

東京大学大学院総合文化研究科
広域科学専攻 生命環境科学系
関泰宏

目次

目次.....	1
略語.....	3
1. 要旨.....	5
2. 背景.....	5
3. 材料と方法.....	8
3-1. DNA マイクロアレイ.....	8
3-2. マイクロアレイデータ解析.....	9
3-3. 細胞培養.....	9
3-4. 肺癌臨床試料.....	10
3-5. 抗体.....	10
3-6. RT-PCR.....	11
3-7. ウェスタンブロット.....	12
3-8. サンドイッチ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	12
3-8. 免疫組織化学.....	13
3-9. プラスミド作製.....	13
3-10. LIPH 安定発現細胞株の樹立.....	14
3-11. RNA 干渉.....	15
3-12. Wound healing assay.....	15
3-13. 予後解析.....	16
4. 結果.....	16
4.1 アフリカツメガエル初期幼生の肺出芽領域で高発現する遺伝子の同定.....	16
4.2 LIPH は肺腺癌細胞株で発現する.....	17
4.3 LIPH は臨床肺癌試料で高発現する.....	18
4.4 LIPH は肺癌細胞の細胞増殖を促進する.....	20
4.5 肺癌細胞において LIPH は LPA 受容体非依存的シグナルにより増殖を促進する.....	22
4.6 血清 LIPH 高値群は切除後の予後が良好である.....	23
5. 考察.....	24
謝辞.....	28
図表.....	29
参考文献.....	73

略語

材料と化合物

AC	Adenocarcinoma
BAC	Bronchioloalveolar adenocarcinoma
BCA	Bicinchoninic Acid
BEBM	Bronchial epithelial basal medium
DAB	Diaminobenzidine
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMEM	Eagle's minimum essential medium
FCS	Fetal calf serum
GEO	Gene expression omnibus
GO	Gene ontology
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HRP	Horseradish peroxidase
LCNEC	Large cell neuroendocrine carcinoma
LPA	Lysophosphatidic acid
LPC	Lysophosphatidylcholine
MCS	Multiple cloning site
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NHBEC	Normal human bronchial epithelial cell
NP-40	Nonidet P-40
OPD	Ortho-Phenylenediamine
RPMI	Roswell park memorial institute
SABM	Small airway basal medium
SAEC	Small airway epithelial cell
PA	Phosphatidic acid
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PVDF	Polyvinylidene fluoride
SAEC	Small airway epithelial cell
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SCC	Squamous cell carcinoma

TBS-T	Tris buffered saline with Tween 20
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

遺伝子名

AGR2	Anterior gradient homolog 2
AFP	Alpha fetoprotein
AKT	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
ATX	Autotaxine
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	Extracellular signal-regulated Kinase
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
LIPH	Lipase, member H
LPAR1~6	Lysophosphatidic acid receptor 1~6
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PRDX4	Peroxyredoxine 4
TACE	Tumor necrosis factor α converting enzyme
TBP	T-box binding protein
TGF α	Transforming growth factor α

1. 要旨

肺癌は世界的に最も頻度の高い癌死の原因の一つである。しかし、早期発見、早期治療の鍵となる肺癌の分子マーカーはまだ十分に確立されていない。これまでに、癌関連遺伝子のいくつかは発生期に発現が一過的に上昇することが報告されてきた。そこで私は、肺癌の進展に関与する新規遺伝子を同定するため、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の肺形成期に一過的に発現が亢進する遺伝子を DNA マイクロアレイにより解析し、lipase member H (LIPH, PA-PLA1 α としても知られる) を肺形成期において特異的に発現する遺伝子として同定した。肺癌細胞株を用いた RT-PCR, ウェスタンブロットおよび ELISA 解析により、LIPH が肺腺癌細胞株で高発現することを見出した。また、肺癌組織を用いた免疫組織化学解析により LIPH が大部分の肺腺癌および細気管支肺胞上皮癌 (BAC) で発現することを見出した。さらに、肺腺癌より低頻度ではあるが肺扁平上皮癌においても、LIPH が発現していることを明らかにした。加えて、肺癌患者において血中 LIPH タンパク質量が早期、後期いずれに高発現することを ELISA 解析により明らかにした。興味深いことに、LIPH 遺伝子を肺腺癌細胞株でノックダウンすると細胞増殖が抑制された。このことから、LIPH が肺癌細胞の恒常的な増殖に寄与していることが示唆された。しかし、LIPH の過剰発現に寄って、LIPH が産生する lysophosphatidic acid (LPA) の受容体介在シグナルは活性化されず、LIPH は LPA 受容体非依存的シグナルによって細胞増殖を制御していることが示唆された。そのため LIPH は、肺癌、特に肺腺癌および BAC の新たなバイオマーカーとなり得ると考えられる。また、臨床検体を用いた予後解析から、LIPH は切除可能な肺癌の早期発見に有用であり、血清中の LIPH 発現量が肺癌の予後予測マーカーとして有用であることが示唆された。

2. 背景

肺癌は世界的に男性、女性で共に最も死者数の多い癌の一つである。肺癌は早期発見が

困難なために予後が非常に悪いことが知られている。その理由の一つが、適切なバイオマーカーが存在しない事による早期発見の難しさであり、早期肺癌に限れば5年生存率は70%程度と高い。そのため、肺癌の早期発見、すなわち早期発見を可能にするバイオマーカーを見出すことは、肺癌による死亡を減少させる重要な課題の一つである。また、肺癌は組織型によって非小細胞肺癌と小細胞肺癌に分類され、非小細胞肺癌はさらに肺腺癌、肺扁平上皮癌、大細胞癌等のサブタイプに分類される。非小細胞肺癌が肺癌全体の約85%を占め、その中でも肺癌全体のおよそ40%を占める肺腺癌は最も頻度の高い組織型である[2]。組織型とは腫瘍の分類の一つで、腫瘍を形成する細胞の形態的特徴を示すものである。例えば、細胞が腫瘍化することにより腺様の形態的特徴を示すものを腺癌、扁平上皮様の形態的特徴を示すものを扁平上皮癌と呼ぶ。これまでに癌細胞の遺伝子の網羅的解析等により、発癌の開始や癌の進展に関わる数多くの遺伝子が発癌によって変化することが報告されている[3-6]。また、近年のDNAマイクロアレイを用いた研究により、肺癌は組織型によって遺伝子発現パターンが異なっていることが明らかになってきた[7, 8]。肺癌は組織型により治療方針が異なるため、組織型の鑑別を行うこともまた重要な課題の一つである[9, 10]。しかし、肺癌の組織型を明確に分類することができるバイオマーカーはまだ十分に確立されていない。

現在、臨床において免疫染色に使用される肺腺癌マーカーの一つであるNkx2.1は、アフリカツメガエルを始め、マウス、ヒト等多くの生物種において肺原基、すなわち、将来、肺への分化が予定されているがまだ未分化状態である領域に発現し、肺の発生に必須であることが報告されている[11-14]。また、肝臓癌の血清腫瘍マーカーとして用いられる α -fetoprotein (AFP) も胎児の肝細胞で発現し、成体になると発現がほとんど消失することが知られている[15]。さらに最近、肝臓の器官形成に重要な機能を果たすSALL4が肝臓癌のマーカーあるいは治療ターゲットとなり得ることが報告された[16, 17]。このように、腫瘍マーカーのいくつかは発生期に発現が一過的に上昇することが知られているが、発生と発

癌の過程における遺伝子発現の相関はまだ十分に解明されていない。

発生共通の減少や遺伝子を解析するモデルとしてショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、マウスなど様々なモデル動物が使用されている。アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) は、ホルモン注射により多量の胚の入手が容易であり、また胚操作技術も歴史的に確立されていることから、発生のモデル動物として古くから用いられている。mRNA のインジェクションによる遺伝子強制発現[18] や morpholino-antisense oligo による遺伝子ノックダウン法も確立されており[19]、発生、分化過程における遺伝子解析が成されている[20, 21]。また、未分化細胞から三次元構造を持った器官への分化誘導法の研究も進んでいる[22-24]。従って、*X. laevis* は器官形成期に発現する遺伝子を解析するのに適した生物である。

Lipase member H (LIPH) は Phosphatidic acid specific lipase 1 α (PA-PLA1 α)としても知られ、トリアシルグリセリドリパーゼファミリーに属するタンパク質の一つである。LIPH は細胞外に分泌された後、細胞膜に結合して機能するリパーゼであり、ホスファチジン酸 (Phosphatidic acid, PA) を特異的に加水分解し、成長因子様の生物活性を持つ 2-アシルリゾホスファチジン酸 (2-acyl-Lysophosphatidic acid, LPA) を産生する[25-27]。最近、LIPH は先天性貧毛症の原因遺伝子として同定された。LIPH は、毛包で幹細胞の豊富に含まれる hair follicle bulge に強く発現し、体毛の成長および分化を制御している ([28], 図 1)。LIPH による体毛形成には、肺癌のイニシエーションや進展に重要な役割を果たすことが報告されている epidermal growth factor receptor (EGFR) シグナルの活性化が重要な役割を果たしていることが LIPH ノックアウトマウスを用いた解析によって報告された。LIPH の産生する LPA が LPA 受容体の一つである lysophosphatidic acid receptor 6 (LPAR6) を活性化し、LPAR6 の G タンパク質との結合に起因して Rho-ROCK シグナルが活性化する。その後、protein kinase C (PKC) により活性化された tumor necrosis factor α (TNF α) converting enzyme (TACE) によって、EGFR のリガンドである transforming growth factor α (TGF- α) の放出が促進されることで EGFR シグナルの活性化が引き起こされる[29]。また、LPA は受容体介在シグナルを通して

RAC-alpha serine/threonine-protein kinase (AKT) シグナルや Mitogen-activated protein kinase (MAPK) の活性化を引き起こし、前立腺癌や乳癌のイニシエーションや癌の進展に寄与することが報告されている[30]。しかし、LIPH と癌との関連はまだ報告されていない。

本研究では、*X. laevis* の肺形成期に特異的に発現する遺伝子の網羅的解析を行うことで、肺癌の新たなバイオマーカーの探索を試みた。*X. laevis* のマイクロアレイ解析および既存の肺癌のマイクロアレイデータベースを統合的に解析することにより、肺腺癌および細気管支肺胞上皮癌 (Bronchioloalveolar carcinoma; BAC) において特異的に高発現する遺伝子の一つとして LIPH を見出した。さらに、LIPH が外科手術で除去可能な肺癌の早期発見にも有用であることを明らかにし、血清中の LIPH 発現量が肺癌の予後予測マーカーとなり得ることを見出した。

3. 材料と方法

3-1. DNA マイクロアレイ

ステージ 43 の *X. laevis* から 消化管を摘出し、顕微鏡下で消化管から肺出芽領域を切り出した。切り出した肺出芽領域および肺出芽領域を除く消化管領域（以下、消化管領域と称する）からそれぞれ ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて total RNA を抽出した。1 µg の total RNA を用いて Quick Amp labeling キット (アジレントテクノロジー) により Cy5 あるいは Cy3 標識 cRNA の合成を行った。Cy5 標識肺出芽領域 cRNA および Cy3 標識消化管領域 cRNA あるいは Cy3 標識肺出芽領域 cRNA および Cy5 消化管領域 cRNA を混合し、*X. Laevis* whole genome マイクロアレイ (アジレントテクノロジー) に 65°C で 15 時間ハイブリダイゼーションし、マイクロアレイスキャナーによりアレイ画像を読み取った。読み取った画像を Feature Extraction ソフトウェア (アジレントテクノロジー) に取り込み、各々のスポットの蛍光強度を定量することで遺伝子発現量を定量化した。解析は Dye スワップで行い、いずれの色素の組み合わせにおいても、肺出芽領域で 2 倍以上の発現が認められた遺伝子を肺

出芽領域特異的遺伝子とした。

3-2. マイクロアレイデータ解析

Feature Extraction ソフトウェアにより定量化した遺伝子発現データを GeneSpring GX ソフトウェア（アジレントテクノロジー）により解析した。いずれの色素標識条件においても、肺出芽領域で消化管領域より 2 倍以上発現の高い遺伝子を第一段階の肺出芽領域特異的候補遺伝子とし、アフリカツメガエルアノテーションシステムによりヒトあるいはマウスオルソログに変換し、Gene Ontology (GO) term を付与した。さらに、付与した GO term に基づき、細胞内局在が extracellular あるいは membrane の遺伝子を選択した。これら遺伝子のコードするタンパク質について、Signal IP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) や SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>) のようなデータベースでシグナル配列や膜貫通領域の有無を確認することで、分泌性タンパク質をコードすることが推定される遺伝子を選択した。

3-3. 細胞培養

本研究には 16 種類の非小細胞肺癌由来細胞株を用いた。その内 9 株（PC-3, PC-14, RERF-LC-KJ, RERF-LC-MS, ABC-1, RERF-LC-Ad1, RERF-LC-Ad2, VMRC-LCD, および LC-2/Ad）は肺腺癌由来細胞株、7 株は（PC-1, LC-1 sq, RERF-LC-AI, RERF-LC-Sq1, EBC-1, HARA, および LK-2）は肺扁平上皮癌由来細胞株である。PC-1 および PC-14 細胞は免疫生物学的研究所株式会社から購入し、LC-2/Ad, RERF-LC-KJ, RERF-LC-AI, EBC-1, LK-2, および Sq-1 細胞は理化学研究所バイオリソースセンターより譲渡を受けた。ABC-1, HARA, PC-3, RERF-LC-Ad1, RERF-LC-Ad2, RERF-LC-MS, RERF-LC-Sq1, および VMRC-LCD 細胞はヒューマンサイエンス振興財団資源バンク（現・独立行政法人医薬基盤研究所 JCRB 生物資源バンク）より入手した。ABC-1, EBC-1, PC-3, RERF-LC-MS, および VMRC-LCD 細胞は EMEM

(Wako)+10% FCS 培地, HARA, LK-2, PC-1, PC-14, RERF-LC-Ad1, RERF-LC-Ad2, RERF-LC-AI, RERF-LC-KJ, および RERF-LC-Sq1 細胞は RPMI1640 (ナカライテスク) +10% FCS 培地, LC-1 sq 細胞は RPMI1640/Ham's F-12 (Wako) +10% FCS 培地, LC-2 Ad 細胞は RPMI1640/Ham's F-12 (Wako) +15% FCS +25mM HEPES (pH 7.2) 培地で培養を行った。正常肺上皮細胞として小気道上皮細胞 (small airway epithelial cell; SAEC) および 正常ヒト気管支上皮細胞 (normal human bronchial epithelial cells; NHBE) をタカラバイオより購入し, それぞれ SABM および BEBM (共にタカラバイオ) に各種増殖因子を添加した培地を用いて培養した。Lenti-X 293T 細胞 (タカラバイオ) は DMEM (Wako) + 10% FCS 条件下で培養した。全ての細胞培養培地はペニシリン/ストレプトマイシンを添加した。また, 全ての細胞は 37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。

3-4. 肺癌臨床試料

早期肺癌組織 (stage IA, IB, IIA および IIB), その周辺正常組織, および早期肺癌患者血清試料およびコントロール血清試料は東大医学部にて倫理委員会にて実験計画を承認後, インフォームド・コンセントを取得した 78 名の患者から取得した。その内訳は, 男性 44, 女性 34 名, 年齢の中央値は 68.0 歳で年齢範囲は 34-85 歳の間であった。また, 組織型別に見ると, 肺腺癌 51 例, 気管支上皮癌 (Bronchioloalveolar carcinoma, BAC) 10 例, 肺扁平上皮がん 13 例, 小細胞肺癌検体, 腺扁平上皮癌および神経内分泌性大細胞癌 (LCNEC) 各 1 例であった。後期肺癌組織 (stage III および IV), その周辺正常組織および血清試料はビジコムジャパンより購入した。

3-5. 抗体

ウェスタンブロットには抗 SRPX2 抗体 (Proteintech), 抗 AGR2 抗体 (Sigma), 抗 AGR3 抗体 (Abcam), 抗 LIPH 抗体 (ProteinTech), 抗 PRDX4 抗体 (Novus), 抗 FLAG 抗体 (Sigma,

FLAGM2), 抗 EGFR 抗体 (Cell signaling), 抗リン酸化 EGFR (Y1068) 抗体 (Cell Signaling), 抗 AKT 抗体 (Cell Signaling), 抗リン酸化 AKT (S473) 抗体 (Cell Signaling), 抗 ERK 抗体 (Cell Signaling), 抗リン酸化 ERK1/2 (T202/Y204) 抗体 (Cell Signaling), 抗 α -Tubulin 抗体 (Sigma) および抗 Actin 抗体 (Thermo) を用いた。ELISA には抗 SRPX2 抗体 (Abcam : 固相, ProSci : 検出), 抗 LIPH 抗体 (Proteintech : 固相, Sigma : 検出) を用いた。

3-6. RT-PCR

6 ウェルプレートで 80%コンフルエントに達するまで肺癌細胞を培養し, RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて, 製造者のプロトコールに従って total RNA を抽出した。抽出した RNA は Nanodrop を用いて定量した。肺癌組織試料からの total RNA 調整には ISOGEN (ニッポンジーン) を用いた。肺癌組織あるいはその周辺正常組織ブロック (1mm x 1mm x 3mm 程度) に 400 μ l の ISOGEN を加えて, ヒスコトロン NS-310E (マイクロテック・ニチオン) を用いて氷上で 30 秒間ホモジナイズし, 1 分間の休止の後, さらに 30 秒間ホモジナイズした。そこに 80 μ l のクロロホルム (Wako) を加え 15 秒間攪拌した後, 室温で 3 分間インキュベートし, 13000rpm, 4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心分離を行った。水層を回収し, 200 μ l のイソプロパノール (Wako) を加え攪拌後, 室温で 5 分間インキュベートし, 13000 rpm, 4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心分離を行った。上清を除き 400 μ l の 70%エタノールを加えた後, 13000 rpm, 4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心分離した。上清を除き 5 分間の風乾後, 適量の DEPC 処理水に溶解し, NanoDrop を用いて RNA 量を定量した。細胞株は 1 μ g, 肺癌試料は 500 ng の total RNA を用いて PrimeScript II 1st strand synthesis kit (タカラバイオ) を用いて cDNA 合成を行った。表 1 に示したプライマーを用い, Ex Taq (タカラバイオ) で PCR を反応を行った。また, 定量 PCR 反応には Tunderbird CYBR Mix (東洋紡) を用いて PCR 反応を行った。定量 PCR の検出には CFX96 (Bio-Rad) を用いた。

3-7. ウェスタンブロット

肺癌細胞を 10cm 培養皿で 80%コンフルエントに達するまで細胞を培養し、1ml の lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH7.4), 150mM NaCl, 1mM EDTA, complete (protease inhibitor cocktail, Roche)) で細胞を懸濁した。懸濁液を 4℃で 30 分間回転混和した後、13000rpm, 4℃で 5 分間遠心分離した上清を細胞抽出液とした。BCA アッセイにより細胞抽出液中のタンパク質濃度を定量し、10 µg のタンパク質を等量の 2xSDS-PAGE サンプルバッファーと混合した後、95℃で 5 分間煮沸することで SDS-PAGE 用試料を調製した。調製した試料を SDS-PAGE により分離した後 PVDF 膜 (Millipore) に転写し、5% スキムミルク/TBS-T で室温 30 分間ブロッキングを行った後、各抗原に対する抗体で 4℃で一晩あるいは 37℃で 1 時間抗体反応を行った。さらに TBS-T で 10 分間、3 回 PVDF 膜を洗浄した後、二次抗体反応を室温、1 時間行った。その後、TBS-T で 5 分間、5 回洗浄後、ECL 反応を行い、LAS1500 及び image ソフトウェア（富士フイルム）を用いて検出した。

3-8. サンドイッチ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

肺癌細胞を 80%コンフルエントに達するまで増殖培地で培養した後、培地を無血清培地 GIT (Wako) に交換し、さらに 72 時間培養した。その後、細胞の培養上清を回収し、1000 rpm で 5 分間遠心した上清を培養上清とした。Maxisoap (nunc) プレートに 100 ng/well の抗体を固相し、25%ブロックエース（ナカライテスク）で 4℃で一晩ブロッキングを行った。その後、100 µl/well の無希釈培養上清あるいは 20%ブロックエース/PBS で 5 倍希釈した血清試料を加えて室温で 1 時間反応させた後、検出抗体を加えさらに 1 時間の抗体反応を行った。西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗マウス IgG 抗体を加えて 1 時間反応させた後、オルトフェニルジアミン (Ortho-Phenylenediamine, OPD) 基質を加えて発色反応を適切な時間行った。3N 硫酸を添加することで発色反応を停止後、492 nm の吸光度を測定した。

3-8. 免疫組織化学

組織マイクロアレイは Shanghai Outdo および SuperBioChips より購入した。組織マイクロアレイには全部で 238 個のホルマリン固定パラフィン包埋切片のスポットが搭載されており、スポットの半径は 1mm, 切片の厚みは 4 μ m であった。これらのスポットは 18 例の肺腺癌, 18 例の BAC, 47 例の肺扁平上皮癌, 10 例の肺腺扁平上皮癌, 15 例の大細胞癌, 10 例の小細胞肺癌, 2 例の癌肉腫, およびそれら腫瘍組織と同一患者由来の周辺正常肺組織で構成されていた。スライドをキシレンに 10 分間, 2 回浸漬することで脱パラフィンを行い, 100%エタノールに 10 分間, 2 回, 90%エタノールに 10 分間, 70%エタノールに 5 分間続けて浸漬した。さらに Milli-Q 水に 10 分間浸漬することで親水化処理を行った。抗原の賦活化は 10mM クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中で 100℃で 20 分間加熱処理することで行い, 内在性ペルオキシダーゼを失活させるため, 0.3%過酸化水素/メタノールで 30 分間スライドを処理した。染色にはタイラマイドを利用したビオチンフリー免疫染色増感システム CASII (Dako) を使用し, 製造者のプロトコールに従って行った。抗体は抗 LIPH ウサギポリクローナル抗体 (Proteintech) を 1:100 希釈で使用し, 室温で 15 分間反応を行った。発色基質には diaminobenzidine (DAB) を用い, DAB 溶液で適当な時間反応させた後, ヘマトキシリンで対比染色を行なった。観察は IX59 顕微鏡 (オリンパス) を用い, EOS Kiss X6i (Canon) を用いて画像を取得した。

3-9. プラスミド作製

1xFLAG およびマルチクローニングサイト (MCS) をコードするオリゴヌクレオチド (センス鎖 : 5'-

GACTCTAGAGCTAGCGGATCCGGCGCGCCGATATCTCGAGCGGCCGCGACTACAAGGAC

GACGATGACAAGTAATCGATGTTAAC -3', アンチセンス鎖 : 5'-

GTTAACATCGATTACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCGCGGCCGCTCGAGATATCGGCGC

GCCGGATCCGCTAGCTCTAGAGTC -3') をアニーリングさせた 2 本鎖 DNA を pIRES-puro3 ベクター (タカラバイオ) の EcoRV および平滑化した NotI 切断部位にライゲーションすることで pIRES-puro3-MCS ベクターを得た。得られた pIRES-puro3-MCS ベクターの NotI および HpaI 切断部位にアニーリングさせた 3xFLAG をコードするオリゴヌクレオチド (センス鎖 : 5'-

GCGACTACAAGGACGACGATGACAAGGATTATAAAGATGATGACGATAAAGACTACAAG GACGATGATGACAAATAATCGATGTT -3', アンチセンス鎖 : 5'-

AACATCGATTATTTGTCATCATCGTCCTTGTAGTCTTTATCGTCATCATCTTTATAATCCTTG TCATCGTCGTCCTTGTAGTCGCGGCC -3') をライゲーションすることで pIRES-puro3-3xFLAG ベクターを得た。

ヒト LIPH 遺伝子は ABC-1 細胞から抽出した total RNA を鋳型として合成した cDNA より, KOD Plus ポリメラーゼ (東洋紡) を用いて取得した。下記プライマー (forward, 5'- GGAGCTAGCCACCATGCTAAGATTCTACTTATTCATCAG -3', reverse, 5'- ATAGCGGCCGCCCCAACTGCAACTCTGGGCAAAG -3') を用いてヒト LIPH 遺伝子をクローニングし, 上述の pIRESpuro3-3xFLAG ベクターの NheI および NotI 切断部位にサブクローニングすることで pIRESpuro3-LIPH・Flag ベクターを得た。

3-10. LIPH 安定発現細胞株の樹立

6 ウェルプレートで増殖培地を用いて 80% コンフルエントまで培養した RERF-LC-KJ 細胞, PC-14 細胞、あるいは VMRC-LCD 細胞に lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて pIRESpuro3-LIPH・Flag ベクターをトランスフェクションした。具体的には, 150 μ l の Opti-MEM (GIBCO) に 4 μ g のベクターを添加し室温で 15 分間インキュベートした。別のチューブに用意した 150 μ l の Opti-MEM に 1 μ l の lipofectamine 2000 を添加後, 室温で 15 分間インキュベートした懸濁液に添加し, さらに室温で 30 分間インキュベートを行った。

Lipofectamine-DNA 混合液を細胞培養液に滴下し 37℃で培養した。トランスフェクションの 2 日後から 2 µg/ml の puromycin (Sigma) を含む培地で培養することで LIPH-FLAG を安定発現した肺癌細胞株を樹立した。

3-11. RNA 干渉

24 ウェル細胞培養プレート上に 6 pmol のヒト LIPH に対する siRNA duplex と Lipofectamine RNAi MAX (invitrogen) を 1 µl 混合し 100 µl の Opti-MEM に添加した。20 分間のインキュベート後、 1×10^5 個の細胞と混合し、さらに 5 分間インキュベートした。コントロール siRNA は RNAi Inc より購入した。LIPH に対する siRNA の配列は下記に示した通りで、invitrogen より購入した。 No. 1, sense : 5'- GACUAAAUGUGAGGCUGAUGCUCUA -3', antisense : 5'- UAGAGCAUCAGCCUCACAUUUAGUC -3', No.2, sense : 5'- GAACGUAGUUGUUGUUGAUUGGAAU -3', antisense : 5'- AUUCCAAUCAACAACAACUACGUUC -3', No.3, sense : 5'- GAGGAGAGCCCAUUCUGCAUGUAUC -3', antisense : 5'- GAUACAUGCAGAAUGGGCUCUCCUC -3'.

3-12. Wound healing assay

LIPH-Flag 安定発現 RERF-LC-KJ 細胞あるいは LIPH に対する siRNA をトランスフェクションした ABC-1 細胞を 80%コンフルエントになるまで培養した後、200-µl ピペットチップを用いて細胞培養面に創傷した。直後に微分干渉顕微鏡を用いて創傷領域の写真を撮影し、細胞を 37℃で培養した。6 あるいは 8 および 24 時間後に創傷領域の写真を撮影し、各画像の創傷領域の面積を Image J ソフトウェアを用いて算出した。

3-13. 予後解析

死亡を陽性として receiver operating characteristic (ROC) 解析を行った。早期肺癌患者それぞれの血清中の LIPH 発現量において、感度（全死亡者数に対する死亡者の割合）および特異度（全生存者数に対する生存者の割合）を算出した。X 軸に（1-特異度），Y 軸に感度をプロットすることで ROC 曲線を作成し，曲線下面積を算出した。また， $(1 - \text{感度})^2 + (1 - \text{特異度})^2$ が最小になる血清中の LIPH 発現量を閾値とした。さらに，患者グループを血清中の LIPH 発現量の閾値付近である 6.0 ng 以上および未満の 2 群に分類した。全生存期間は手術から原因を問わず死亡するまでの期間によって決定した。また，無再発生存期間は手術から再発あるいは死亡いずれかが起こるまでの期間によって決定した。経過観察期間終了まで生存した患者は打ち切りとみなした。最初のイベントが起こるまでの期間をログランク検定によって比較した。各グループにおけるイベントリスクの算出にはカプランマイヤー法を用いた。統計解析は JMP 10 統計解析ソフトウェア (SAS institute) を用いた。

4. 結果

4.1 アフリカツメガエル初期幼生の肺出芽領域で高発現する遺伝子の同定

肺癌が生じる際，肺の組織においては脱分化に類似した現象がおこり，いわゆる肺の初期発生において発現する遺伝子が再度上昇する可能性が考えられる。この仮説に基づいて考えると，新規の肺癌マーカーを同定する上で，初期発生における肺の分化時に発現する遺伝子は有力な候補となり得ると思われる。そこで，新規マーカーを探索する目的で，初期発生研究で実績のあるアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の初期幼生を材料に用い，肺出芽領域特異的遺伝子を解析した。まず，ツメガエルの初期幼生においては，肺芽は消化管に由来することから，肺芽が出芽する stage 43（図 2）の初期幼生から消化管を摘出し，さらに肺出芽領域とその他の消化管領域を切り分け，肺出芽領域を単離した。次に，切り出した両者における遺伝子発現をアフリカツメガエル genome DNA マイクロアレイを用い

て約 28,000 遺伝子について解析し、両組織における遺伝子の発現を比較した。その結果、肺出芽領域のみで多く発現する遺伝子を、重複を除いて 2187 種見出した。次に、アフリカツメガエルアノテーションシステムを用いてヒトあるいはマウス相同遺伝子に変換して翻訳タンパク質の機能が同定されているものを選び、更に分泌性タンパク質をコードすることが推定される遺伝子を抽出し、39 の中間候補遺伝子を選択した（表 2）。ここから肺癌で高発現が推定される遺伝子をさらに抽出するため、遺伝子発現データベースとして BioGPS (<http://biogps.org/>) および H-Inv (<http://h-invitational.jp/hinv/ahg-db/index.jsp>) , DNA マイクロアレイデータベースとして NCBI GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) および Arrayexpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>)を用い、これらの遺伝子が肺の組織で発現しているかどうかを調べた。その結果、肺癌において発現が亢進する最終候補遺伝子として Lipase member H (LIPH) を見出すことができた。そこで、以降は LIPH について解析を進めることにした。

4.2 LIPH は肺腺癌細胞株で発現する

まず初めに、肺癌における LIPH の発現を検討するため、9 種類の肺腺癌細胞株および 7 種類の肺扁平上皮癌細胞株を用いて定量 RT-PCR 解析により *LIPH* mRNA の発現量を検討した。その結果、*LIPH* が肺腺癌細胞株 9 株中 ABC-1, RERF-LC-Ad1, PC-3, RERF-LC-Ad2, RERF-LC-KJ, RERF-LC-MS の 6 株で高い発現を示すことを見出した。一方、7 株の肺扁平上皮癌細胞株は、最も発現の高かった EBC-1 細胞が肺腺癌細胞株 RERF-LC-MS よりわずかに低い発現を示したものの、他の細胞株は正常肺由来上皮細胞である SAEC, NHBE と同水準であり、肺扁平上皮癌細胞株における *LIPH* の発現は全体的に低い水準であった（図 3 A）。続いて、LIPH がタンパク質レベルで本当に分泌発現しているのかを検討するため、2 種類の抗 LIPH 抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法により培養上清中における LIPH タンパク質の発現量を解析した。その結果、定量 PCR 解析で最も高い *LIPH* の発現を示した ABC-1 細

胞が LIPH を強く分泌発現していることが観察された。しかし、その他の肺腺癌及び肺扁平上皮癌細胞株では LIPH の培養上清中への分泌発現はほとんど認められなかった (図 3 B)。さらに、これら細胞の抽出液を用いてウエスタンブロット解析を行うことで、ELISA で検出されたシグナルが LIPH のタンパク質発現量を示しているか確認した。ABC-1 細胞で LIPH の推定分子量である 55kDa 付近に強いシグナルのバンドが観察され、PC-3 細胞および RERF-LC-KJ 細胞でもわずかにバンドが検出された。一方、正常肺上皮細胞および肺扁平上皮癌細胞ではそのシグナルはほとんど検出されなかった (図 3 C)。ABC-1 細胞における LIPH の発現が、ELISA では PC-3, RERF-LC-KJ 細胞の約 2 倍であったのに対し、ウエスタンブロットではそれを大幅に上回る発現が観察されたが、これは細胞内外のタンパク質発現量が細胞株によって異なることが原因であると考えられた。以上の結果より、LIPH が肺腺癌細胞株で高発現することを明らかにした。

4.3 LIPH は臨床肺癌試料で高発現する

次に、LIPH が実際に肺癌で高発現するのか検証するため、肺癌患者より得た腫瘍組織における LIPH の発現を定量 RT-PCR によって検討した。その結果、*LIPH* mRNA は 42% (19 例中 8 例) の後期肺癌患者 (病理 stage III あるいは IV) の組織中で発現が亢進していた。さらに腺癌およびその亜型である BAC に限定するとより高頻度に発現が亢進していた (12 例中 6 例 50%) (図 4 A)。一方、肺扁平上皮癌で *LIPH* の発現上昇が認められたのは 33% (6 例中 2 例) で、肺腺癌と比較して低い頻度であった。さらに、早期肺腺癌組織 (病理 stage IA) における *LIPH* mRNA の発現量を定量 PCR 解析により検討したが、その発現上昇は 14% (2/14) の肺癌で観察されただけであった (図 5 A)。次に、後期肺癌患者 (病理 stage III あるいは IV) より取得した血清中における LIPH タンパク質の発現量をサンドイッチ ELISA により検討した。血清中の LIPH 発現量の平均値は肺癌患者 (n=48) で 7.18 ng/ml, コントロール群 (n=40) で 5.31 ng/ml であり、肺癌患者の血清中の LIPH 発現量はコントロール群と比

較して有意に高い値を示した ($p<0.05$, 図 4 B)。さらに早期肺癌患者 (病理 stage I あるいは II) においても血清中 LIPH 発現量を検討したところ、血清中の LIPH 発現量の平均値は肺癌患者 ($n=78$) で 7.21 ng/ml, コントロール群 ($n=26$) で 4.48 ng/ml であり, コントロール群と比較して肺癌患者で有意に高い血清中の LIPH 発現量を示した ($p<0.05$, 図 5 B)。そこで私は、臨床で最もよく用いられる血清腫瘍マーカーの一つである Carcinoembryonic antigen (CEA) 値との相関を検討したが、相関係数が早期肺癌では 0.0082, 後期では 0.0006 となり、いずれにおいても血清中の LIPH 発現量と血清中の CEA 発現量の間に相関は認められなかった (図 6 A および B)。

さらに私は、組織マイクロアレイを用いて、肺癌組織試料における LIPH タンパク質の発現量を免疫組織化学によって検討した。肺腺癌では 88.9% (18 例中 16 例) (図 7 A), BAC では 83.3% (24 例中 20 例) の高い割合で肺癌細胞の細胞質に陽性所見を呈し, BAC の中でも一般的に比較的予後の不良と言われる粘液産生型 (図 7 B) および予後の良好な非粘液産生型 (図 7 C) の BAC[31, 32]でいずれも陽性であった。また、肺扁平上皮癌においても肺腺癌より陽性率は低いものの、細胞質に陽性所見を呈した (47 例中 37 例, 76.6%) (図 7 D, E)。強陽性例に限ってみると、肺腺癌は 18 例中 4 例 (22.2%), BAC は 24 例中 10 例 (41.6%), 肺扁平上皮癌では 47 例中 5 例 (10.6%) となり、肺腺癌および BAC では陽性率が高いだけでなく、発現量も高いことを見出した (表 3)。小細胞肺癌において、LIPH は 10 例中 4 例では非小細胞肺癌と同様、細胞質に陽性所見を呈し (図 8 A), 10 例中 3 例では陰性所見を呈した (図 8 B)。しかし、10 例中 3 例では核等の細胞質以外に染色が見られる不明瞭な染色パターンを呈し (図 8 C), 小細胞肺癌における LIPH の発現には、典型的なパターンが存在しないことが示唆された。正常肺組織における LIPH の発現は全体的に低いものであったが、II 型肺泡上皮細胞およびクララ細胞では細胞質に弱い陽性所見が認められた (図 7 F)。これらの結果は、LIPH が非小細胞肺癌、特に肺腺癌および BAC のバイオマーカーであることを示唆していると考えられた。

4.4 LIPH は肺癌細胞の細胞増殖を促進する

続いて、肺癌細胞株を用い、LIPH の過剰発現あるいはノックダウンによって、LIPH の肺癌における機能を検討した。まず初めに、内在性 LIPH を弱く発現する肺腺癌細胞株の一つである RERF-LC-KJ 細胞 (図 3 C) を用いて、C 末端に FLAG タグを付加した LIPH (LIPH-Flag, 図 9 A) を安定発現する細胞株を樹立した (図 9 B)。 1×10^5 個の LIPH 安定発現細胞あるいはコントロール細胞を播種後、72 時間後にそれぞれ細胞数を計測したところ、LIPH 安定発現細胞は 1.94×10^5 個、コントロール細胞は 1.69×10^5 個であり、2 つの細胞の間に細胞増殖の有意な差は見られなかった (図 10 A)。次に LIPH の細胞遊走へ与える影響を検討するため、wound healing assay を行った。創傷から 8 時間後には LIPH 安定発現細胞およびコントロール細胞のいずれにおいても創傷領域への遊走細胞が観察されたが、観察された遊走細胞数に差は見られなかった (図 10 B)。また、各細胞の創傷領域の面積を計測したが、いずれの細胞も創傷から 8 時間後には 93% まで縮小し、創傷領域の減少率に差は認められなかった (図 10 C)。次に、内在性 LIPH を発現しない肺腺癌細胞株 PC-14 細胞 (図 3 A) を用いて LIPH-Flag 安定発現細胞を樹立し (図 11 A)、同様の解析を行った。 1×10^5 個の細胞を播種後 72 時間後の細胞数は、LIPH 安定発現細胞が 2.56×10^5 個、コントロール細胞が 2.46×10^5 個となり、2 つの細胞の間に細胞増殖の差は認められなかった (図 11 B)。また、wound healing assay の結果、LIPH 安定発現細胞、コントロール細胞のいずれも、創傷領域への遊走細胞が少数確認されたが、2 つの細胞の間に遊走細胞数の差は認められなかった (図 11 C)。創傷領域の面積を計測したところ、LIPH 安定発現細胞、コントロール細胞のいずれも創傷から 8 時間後に創傷領域の面積が 80% まで縮小しており、両者の間に差は見られなかった (図 11 D)。さらに、内在性 LIPH を発現しない第 3 の肺腺癌細胞株 VMRC-LCD でも LIPH-Flag 安定発現細胞を樹立し (図 12 A)、細胞増殖能の差を検討した。 1×10^5 個の細胞を播種後 72 時間後の細胞数は、LIPH 安定発現細胞で 1.56×10^5 個、コントロール細胞で 1.66×10^5 個であり、これら細胞の間に細胞増殖の差は見られなかった (図 12 B)。次

に私は、内在性 LIPH を高発現する ABC-1 細胞において (図 3 A-C), siRNA を用いた LIPH の一過的なノックダウンによる細胞増殖および細胞遊走能への影響を検討した。本実験のため、異なる 3 つの領域を認識する siRNA を設計し、各 siRNA の LIPH ノックダウン効率を検討したところ、3 番の siRNA (siLIPH3) が最もノックダウン効率が高く、1 番の siRNA (siLIPH1) が次にノックダウン効率が高かった (図 1 3 A)。そこでまず、siLIPH3 を用いて細胞増殖能、遊走能の検討を行った。1×10⁵ 個の細胞を播種後 72 時間後の細胞数は、siLIPH3 トランスフェクション細胞で 1.68×10⁵ 個、コントロール siRNA (siControl) トランスフェクション細胞で 2.62×10⁵ 個であり、siLIPH3 のトランスフェクションにより、ABC-1 細胞の増殖が有意に抑制された (p<0.05, 図 1 3 B)。続いて、wound healing assay により細胞の遊走能を検討した。コントロール細胞は創傷から 8 時間後に創傷面積が 95.6%, 24 時間後には 84.8% まで縮小したのに対し、LIPH ノックダウン細胞は創傷から 8 時間後に 99.1%, 24 時間後にも 90.3% まで縮小するに留まり、LIPH ノックダウン細胞で有意に創傷領域の縮小が抑制された (p<0.05, 図 1 3 C, D)。このことから、LIPH が細胞増殖あるいは遊走に必要であることが示唆された。しかし、詳細な観察ではいずれの細胞でも創傷領域への顕著な遊走細胞を観察するには至らず、LIPH のノックダウンは細胞遊走でなく増殖を抑制することが示唆された (図 1 3 C)。次に、細胞増殖の抑制が LIPH のノックダウンによるものであることを再確認するため、ターゲット配列の異なる LIPH に対する siRNA (siLIPH1) を用いて同様の解析を行った。1×10⁵ 個の細胞を播種後 72 時間後の細胞数は、siLIPH1 トランスフェクション細胞で 0.63×10⁵ 個、siControl トランスフェクション細胞で 2.62×10⁵ 個であり、siLIPH1 のトランスフェクションにより、ABC-1 細胞の増殖が有意に抑制された (p<0.05, 図 1 4 A)。続いて、wound healing assay による検討を行った。コントロール細胞は創傷から 8 時間後に創傷面積が 95.6%, 24 時間後には 84.8% まで縮小したのに対し、LIPH ノックダウン細胞は創傷から 8 時間後に 99.1%, 24 時間後にも 94.6% まで縮小しただけであり (図 1 4 B, C), siLIPH3 により LIPH をノックダウンした際と同様の結果を得た。従って、LIPH の

ノックダウンは肺癌細胞の細胞増殖を抑制することが示され、LIPH は肺癌細胞の増殖に必要なタンパク質であることが示唆された。

4.5 肺癌細胞において LIPH は LPA 受容体非依存的シグナルにより増殖を促進する

LIPH が肺癌細胞において細胞増殖を制御する分子メカニズムを明らかにするため、毛包への分化時に LIPH の産生する LPA および LPA 受容体介在シグナルによる活性化が報告されている EGFR シグナル分子[29]の解析を行った (図 1 5 A)。siRNA により LIPH をノックダウンした ABC-1 細胞, LIPH-Flag を過剰発現した RERF-LC-KJ 細胞を用いて EGFR のリン酸化をウエスタンブロットにより検討した。しかし, LIPH ノックダウン ABC-1 細胞における EGFR のリン酸化状態はコントロール細胞と差が見られなかった。また, RERF-LC-KJ 細胞は LIPH-Flag の発現に関わらず EGFR の発現が観察されなかった (図 1 5 B)。次に, LPA 受容体介在シグナルにより活性化することが報告されている MAPK および AKT シグナル分子[30]の解析をウエスタンブロットにより行った (図 1 6 A)。ところが, AKT, ERK いずれのタンパク質も LIPH ノックダウン ABC-1 細胞, LIPH 安定発現 RERF-KC-KJ 細胞とコントロール細胞の間にリン酸化状態の差は観察されなかった (図 1 6 B)。そこで私は, LIPH による細胞増殖の制御が, これまで癌との関連が報告されてこなかった LPA 受容体介在シグナルにより引き起こされているのではないかと考え, 肺腺癌細胞株における 6 つの LPA 受容体遺伝子 (*LPAR1~6*) の発現を検討した。その結果, *LIPH* を高発現した ABC-1 細胞は *LPAR2* の発現のみが観察された。一方, *LIPH* の発現レベルが低かった PC-3 細胞および RERF-LC-KJ 細胞では *LPAR1, 2* および *6* の発現が主に観察され, *LIPH* を発現していなかった SAEC では 6 種全ての LPA 受容体遺伝子の発現が観察された (図 1 7)。従って, 肺癌細胞における *LIPH* の発現量は LPA 受容体遺伝子の発現と相関しないことが示唆された (図 3 A, 図 1 7)。さらに, *LIPH* をノックダウンした ABC-1 細胞および LIPH-Flag を安定発現した RERF-LC-KJ 細胞において LPA 受容体遺伝子の発現を検討した。その結果, LIPH ノ

ックダウン ABC-1 細胞においても, LIPH-Flag 安定発現 RERF-LC-KJ 細胞においても, コントロール細胞と比較して LPA 受容体遺伝子の発現量に差は認められず (図 1 8), 肺癌細胞において LIPH の発現は LPA 受容体遺伝子の発現を制御していないことが示唆された。以上の結果より, 肺癌細胞における LIPH は, LPA 受容体非依存的シグナルによって細胞増殖を制御している可能性が示唆された。

4.6 血清 LIPH 高値群は切除後の予後が良好である

血清中の LIPH 発現量の予後予測能を評価するため, 死亡を陽性として ROC 解析を行った。各試料の血清 ELISA 値における感度, 特異度を求め, ROC 曲線を作成した結果, 曲線下面積は 0.683 となった (図 1 9)。また, $(1 - \text{感度})^2 + (1 - \text{特異度})^2$ が最小になる値が最も診断精度が高くなるため, ROC 曲線よりこの値を求めたところ, 閾値は 6.27 ng/ml であった。そこでさらに血清中の LIPH 発現量と予後の関係を明らかにするため, 暫定カットオフ値を 6.0 ng/ml に設定し, 早期肺癌患者を高値群 (6.0 ng/ml 以上, n=46) および低値群 (6.0 ng/ml 未満, n=32) に分けて後ろ向き予後解析を行った。外科手術後の無再発生存期間について検討した結果, LIPH 高発現群は低値群と比較して有意差はないが予後が良好な傾向を示した (図 2 0 A)。また全生存期間について検討した結果, 血清中 LIPH 高発現群は低発現群と比較して有意に予後が良好であった ($p < 0.05$) (図 2 0 B)。さらに, 術後補助化学療法が行なわれた 16 例を除外して解析を行ったところ, 血清中 LIPH 高発現群 (6.0 ng/ml 以上, n=37) が低発現群 (6.0 ng/ml 未満, n=25) と比較して有意に予後が良好であることを見出した ($p < 0.05$) (図 2 0 C)。以上の結果は, 早期肺癌患者の外科手術後の良好な予後が血清中 LIPH の高発現と相関していることを示唆しており, LIPH が予後予測マーカーとして有用であることを示唆していると考えられた。

5. 考察

最近、癌胎児性タンパク質 SALL4 が肝臓癌のがん遺伝子でありかつ治療ターゲットとなりうることが報告された[16]。SALL4 は ES 細胞の未分化性の維持に重要な役割を果たす遺伝子で[33, 34]、また肝臓の発生時に一過的に発現が亢進することが知られている[17]。さらに、現在最もよく用いられる腫瘍マーカーの一つである CEA と比較して血液診断マーカーとして肺癌の診断精度が高いことも報告された AGR2 についても[35]、本研究で肺出芽領域特異的遺伝子として再発見されている。加えて本研究においても、肺発生期に特異的に発現する遺伝子 LIPH が、非小細胞肺癌、その中でも特に、肺腺癌および BAC のバイオマーカーであることを見出した。LIPH の分子機能については、ノックダウン実験から LIPH が肺癌細胞の細胞増殖に必要なタンパク質であることが示唆されたが、過剰発現による細胞増殖促進効果はほとんど見られないことから、肺癌細胞の細胞増殖を協力に促進する癌形成促進因子とは考えにくく、むしろ LIPH の肺癌細胞における貢献は限定的であると考えられた。一方、臨床サンプルを用いた解析から、血清中の LIPH 発現量が肺癌の早期発見に有用であることを明らかにし、また、外科手術で除去可能な肺癌の予後予測マーカーとなり得ることを示した。これらの知見を総合すると、*X. laevis* を始めとしたモデル生物の器官形成期の遺伝子発現に基づくバイオマーカーの探索という本研究の手法は、従来のアプローチで見落とされてきた新たな腫瘍マーカーを発見するのに有効な手法であると考えられる。

LIPH 遺伝子は 3q.27 に位置しており、3 番染色体の長腕は肺扁平上皮癌で最も高頻度に遺伝子増幅の見られることが報告されている領域の一つである[6, 36]。この領域には p63, phosphatidylinositol 3-kinase C catalytic subunit isoform- α (PI3KCA), and sex-determining region Y-box 2 (Sox2) 等の肺扁平上皮癌ドライバー遺伝子がコードされている[37-39]。また、肺扁平上皮癌における 3q.27 の増幅は約 30%の頻度で発生することが報告されている[40, 41]。本研究において、定量 PCR 解析によって LIPH 遺伝子の発現亢進が同等の頻度で観察されたことから、本解析結果は肺扁平上皮癌における LIPH 遺伝子の発現亢進は染色体上の遺伝

子増幅によって引き起こされている可能性を支持するものであると考えられる。一方、肺腺癌における 3q.27 の遺伝子増幅の頻度は肺扁平上皮癌と比較して低いことが報告されている[42, 43]。しかし、本研究や公共データベースに登録された DNA マイクロアレイデータにおいて、肺腺癌および BAC における LIPH 遺伝子の発現亢進は遺伝子増幅の報告されているより高頻度に観察された。そのため、肺腺癌における LIPH の発現亢進は遺伝子増幅ではなく転写の活性化により起こっている可能性が示唆される。

LIPH は LPA 産生酵素である[25-27]。毛包細胞において、LIPH の産生する LPA が LPAR6 を活性化し、受容体介在シグナルにより EGFR シグナルを活性化することも報告されている[29, 44-48]。他に LPA 産生酵素として知られている Autotaxine (ATX) は前立腺癌、乳癌、メラノーマで発現することが報告されており[27, 49-52]、受容体介在性 ATX-LPA シグナルは発癌の開始や癌の進展に関与することが報告されている[30, 53-56]。ATX の活性化した腫瘍では、ATX-LPA シグナルが mitogen-activated protein kinase (MAPK) あるいは PI3K/Akt 経路を活性化することにより細胞増殖や遊走を促進することが知られている[53, 57]。また、大腸癌細胞において、LPA 介在シグナルは EGFR シグナルを活性化し細胞増殖を促進することが報告されている[58]。しかし本研究では、LIPH の過剰発現、ノックダウンのいずれによってもこれらシグナルの活性化は観察されなかった (図 1 5, 1 6)。また、LIPH 発現量依存的な LPA 受容体の発現制御も観察されなかった (図 1 7, 1 8)。その一方で LIPH のノックダウンは細胞増殖を抑制したことから、LIPH は肺癌細胞においてある程度の細胞増殖に寄与していることが示唆された。以上の結果より、LIPH は LPA 受容体非依存的経路によって基底レベルの肺癌細胞の増殖維持に必要とされている可能性が示唆された。LIPH が基底レベルの癌細胞の増殖に寄与するしくみについては、今後、詳細を検討する必要がある。

免疫組織化学の結果、LIPH タンパク質は肺腺癌や BAC 等の非小細胞肺癌において非常に高い頻度で観察された。定量 PCR 解析の結果に比べてはるかに高頻度に LIPH の発現が

観察されたが、これは、定量 PCR に用いた試料がレーザーマイクロダイセクション等を行ったものではないために、試料中に LIPH の発現していない細胞も多く含まれており、定量 PCR 用サンプルが LIPH 陰性サンプルで希釈されていることが原因であると考えられる。また、免疫組織化学陽性であっても全ての癌細胞において LIPH が検出される訳ではないため、LIPH 陽性細胞を定量 PCR で検出するのはその検出感度に限界があると考えられた。特に早期肺癌では、用いた組織中に肺癌細胞数が少なかった可能性は高く、そのために定量 PCR による発現頻度が低かった可能性が高いと考えられる。そのため、LIPH の検出には免疫組織化学を用いたほうが高感度に検出できると考えられた。正常肺組織において LIPH は II 型肺胞上皮細胞およびクララ細胞でその発現が観察された。肺サーファクタントを構成するタンパク質の一つである肺サーファクタントタンパク質 A (pulmonary surfactant protein A, SP-A) は、正常肺細胞において II 型肺胞上皮細胞、クララ細胞および肺マクロファージでの発現が報告されており [59]、本研究で解析した LIPH の発現パターンが SP-A のそれと類似していた。SP-A は肺腺癌の免疫染色マーカーとしても用いられており [60, 61]、LIPH が肺腺癌マーカーとして有用である可能性を示していると考えられた。肺腺癌における LIPH と SP-A の発現の相関は解明されていないが、肺腺癌の腫瘍形成において協調して機能している可能性があると考えられる。また、他に有用な肺腺癌の免疫染色マーカーとして Napsin A が知られている。Napsin A の肺腺癌における陽性率は 85% 程度であることが報告されており [62]、本研究で示した LIPH の肺腺癌における陽性率と同等であることから、LIPH は Napsin A と同程度の検出能があることが期待される。さらに LIPH は血清中で検出可能であり、免疫染色に限らない広い用途での応用が期待できると考えられ、Napsin A と比較しても有用な肺癌マーカーであることが示唆された。

また本研究の結果から、血清中の LIPH 発現量は肺癌症例で上昇しており、肺癌の早期発見に有用であると考えられた。しかし、コントロール群にも血清中の LIPH を高発現する例が観察され、また、それら症例に共通の臨床的背景が見出だすことはできなかった。さら

に症例数を増やすことに加え、高発現した症例の経過観察を行うことにより、コントロール群で LIPH を高発現する機序について検討を行う必要があると考えられる。腫瘍マーカーは、単独で用いずいくつかの組み合わせにより診断精度を向上させることが一般的である。血清中の LIPH 発現量は、血清中の CEA 発現量と明確な相関がなく、血清中 CEA 発現量が低いサンプルの中にも血清中の LIPH 発現量が高いサンプルが存在したことから、これらマーカーを組み合わせることで肺癌検出の陽性率が上昇することが期待される。さらに、血清中の LIPH 発現量が 6.0 ng/ml 以上の症例は 6.0 ng/ml 未満の症例と比較して予後が良好であった。血清中の LIPH 発現量が高値症例で良好な予後を示した理由についてさらに検討を行う必要があるが、今回私が発見したマーカーは肺癌の早期発見に有用であり、かつマーカー高値例では切除後予後が良好であることより、治療する肺癌症例の早期発見に有用であろうと期待される。近年胸部 CT を用いた肺癌検診はレントゲンと比較して肺癌死亡率の減少を認めており肺癌の早期発見に有用であるとされているが、CT を用いた検診は放射線被曝やコスト負担の問題があることから、本研究で同定した新たな血清マーカーを用いた早期肺癌の発見は臨床的にも有用性が高いと考えられる[63]。

本研究で私は、LIPH が肺癌の早期発見および予後予測に有効なバイオマーカーであることを示したが、その分子メカニズムが十分に明らかになったとは言えない。LIPH は腫瘍で高発現する一方で、LIPH が高発現する症例は良好な予後を示すことから、LIPH は腫瘍の原因であるというよりはむしろ、腫瘍化した結果起こる炎症や腫瘍に対する免疫応答に機能している可能性があると考えられる。そこで今後は、LIPH の発現が肺癌で亢進するメカニズム、また、LIPH が肺癌細胞の増殖に寄与するメカニズムの解明をより詳細に行っていきたい。さらに、血清中の LIPH 高発現群が外科手術後に良好な予後を示した理由について、患者の臨床的背景や病理組織学的な特徴の同定などを解析することにより明らかにすることが必要であると考えられる。

謝辞

貴重な肺癌臨床検体の供与、病理診断の指導、予後解析のための情報提供、臨床的見地からの意見など多大なご支援を頂きました東京大学医学部深山正久教授，中島淳教授，牛久綾博士，旭中央病院吉田幸弘博士に御礼申し上げます。

産業総合技術研究所幹細胞工学研究センター伊藤弓弦博士には *X. laevis* マイクロアレイを，伊藤由真博士，石嶺久子氏には免疫組織化学をご指導頂きました。また，日々実りあるディスカッションをさせて頂きました産業総合技術研究所幹細胞工学研究センター栗崎晃博士に深謝致します。最後に，研究の場を与えてくださった産業総合技術研究所幹細胞工学研究センター浅島誠センター長，道上達男准教授に深く御礼申し上げます。

表 1 . RT-PCR に用いたプライマー

遺伝子名	Forward primer	Reverse primer
GAPDH	3'-ATTTGGCTACAGCAACAGGGTG-5'	3'-CAAGGGGTCTACATGGCAAC-5'
LIPH	3'-TCTGGGTTTGTGAGAGATG-5'	3'-TCAGTGTCGGAATGGATGAC-5'
LPAR1	3'-ATTCACAGCCCCAGTTCAC-5'	3'-ACATAGATTGCCACCATGAC-5'
LPAR2	3'-ACCCAACCAACAGGACTGAC-5'	3'-GAAGAGCCAGATTCCTGCAC-5'
LPAR3	3'-TGCTCATTTTGCTTGTCTGG-5'	3'-CACAACCATGATGAGGAAGG-5'
LPAR4	3'-GTGCGCTCCCAAGCTATTAC-5'	3'-AGGCTTTGTGGTCAAAGGTG-5'
LPAR5	3'-TGCACTTGGTGGTCTACAGC-5'	3'-GGTGCAGTGCGTAGTAGGAG-5'
LPAR6	3'-TGTATGGGTGCATGTTTCAGC-5'	3'-GCCAATTCCGTGTTGTGAAG-5'
TBP	3'-AATCTTGGTTGTAACTTGACCTA -5'	3'-CTTGGGATTATATTCGGCGT-5'

表 2. *X. laevis* stage 43 における肺特異的な分泌性タンパク質をコードする遺伝子

ID	Title	Gene	LogRatio:O/L	LogRatio:L/O
Xl.353	Collagenase-3	gene A	-1.55E+00	1.63E+00
Xl.21626	Collagenase 3	MMP-13	-1.50E+00	1.52E+00
Xl.23810	CDNA clone IMAGE:6873521		-1.43E+00	1.65E+00
Xl.368	Cerberus	cer	-1.41E+00	1.14E+00
Xl.1076	Hypothetical protein MGC52564	MGC52564	-9.70E-01	9.87E-01
Xl.872	P-domain peptide pS2 gene product homolog	p1-A-prov	-8.83E-01	6.35E-01
Xl.18850	Transcribed locus		-8.29E-01	8.17E-01
Xl.29420	Collectin sub-family member 11	colec11-prov	-8.20E-01	7.08E-01
Xl.16623	Tissue inhibitor of metalloproteinases-3	timp3-A	-7.63E-01	8.50E-01
Xl.415	Interleukin-1-beta	il1b-A	-7.49E-01	6.92E-01
Xl.999	Cephalic hedgehog protein	chh-A-prov	-7.48E-01	1.01E+00
Xl.32643	MGC80621 protein	MGC80621	-7.41E-01	6.67E-01
Xl.1000	Desert hedgehog homolog (<i>Drosophila</i>), hedgehog protein 4	dhh-A	-6.98E-01	5.40E-01
Xl.47623	MGC80724 protein	MGC80724	-6.48E-01	5.07E-01
Xl.1589	Np77	LOC397989	-6.05E-01	5.98E-01
Xl.332	Xwnt-8b protein	Xwnt-8b	-5.49E-01	6.21E-01
Xl.9836	Hypothetical protein MGC68721	MGC68721	-5.34E-01	5.33E-01
Xl.10653	Transcribed locus		-5.28E-01	4.85E-01
Xl.841	Platelet-derived growth factor A chain, long form	PDGFA	-5.19E-01	4.79E-01
Xl.2243	Fibronectin protein	fibronectin	-4.76E-01	4.98E-01

Xl.866	Morphogen	LOC398047	-4.73E-01	4.16E-01
Xl.193	Proglucagon I	gcg-A	-4.57E-01	3.88E-01
Xl.34510	Hypothetical LOC495679	LOC495679	-4.55E-01	4.70E-01
Xl.868	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A	wnt5a-B	-4.48E-01	3.27E-01
Xl.3275	Pancreatic elastase 1	LOC398300	-4.48E-01	6.19E-01
Xl.53651	Transcribed locus, weakly similar to XP_425706.1 PREDICTED: similar to Laminin alpha-5 chain precursor [Gallus gallus]		-4.48E-01	4.18E-01
Xl.49496	R-spondin 2	Rspo2	-4.44E-01	5.11E-01
Xl.53226	Transcribed locus, weakly similar to XP_416688.1 PREDICTED: similar to secretory protein containing thrombospondin motifs [Gallus gallus]		-4.18E-01	4.32E-01
Xl.21495	Spondin 1, (f-spondin) extracellular matrix protein	spon1-A	-3.98E-01	4.22E-01
Xl.54052	Leptin precursor (ob)		-3.53E-01	4.70E-01
Xl.53038	Transcribed locus, weakly similar to XP_520065.1 PREDICTED: similar to MAM domain containing 2; MAM domain containing 1 [Pan troglodytes]		-3.52E-01	3.88E-01
Xl.14787	Hypothetical protein MGC68672	MGC68672	-3.42E-01	3.41E-01
Xl.29373	Preprosomatostatin 1a	LOC398676	-3.42E-01	3.43E-01
Xl.195	Proglucagon II	MGC64426	-3.32E-01	3.60E-01
Xl.1922	Transcribed locus, moderately similar to XP_422284.1 PREDICTED: similar to laminin, gamma 1 precursor; formerly LAMB2 [Gallus gallus]		-3.31E-01	3.60E-01
Xl.380	Wingless-type MMTV integration site family, member 2B	wnt2b-A	-3.29E-01	6.98E-01
Xl.289	Neuregulin 1	nrg1-A	-3.23E-01	3.54E-01
Xl.23153	Transcribed locus, weakly similar to XP_444652.1 PREDICTED: prolactin [Gallus gallus]		-3.14E-01	4.13E-01
Xl.1001	Banded hedgehog protein	bhh-A-prov	-3.05E-01	3.11E-01

表 3. 免疫染色による各組織型における LIPH 陽性率

図 7 および 8 で示した 126 例の肺癌試料に対する抗 LIPH 抗体での免疫組織化学の結果から、各組織型における陽性率を算出した。

組織型	計	強陽性 ^a	陽性 ^b	不明瞭	陰性	a, %	a+b, %
肺腺癌	18	4	12	0	2	22	89
BAC	24	10	10	3	1	42	83
扁平上皮癌	47	5	31	5	6	11	77
腺扁平上皮癌	10	3	7	0	0	30	100
大細胞癌	15	3	11	0	1	20	93
小細胞肺癌	10	1	3	3	3	10	40
癌肉腫	2	0	2	0	0	0	100
合計	126	26	76	11	13		

図 1 . LIPH の作用機序の概略 (A. Inoue et al., LPA-producing enzyme PA-PLA(1)alpha regulates hair follicle development by modulating EGFR signalling, Embo J 30 (2011) 4248-4260.より改変)

図1

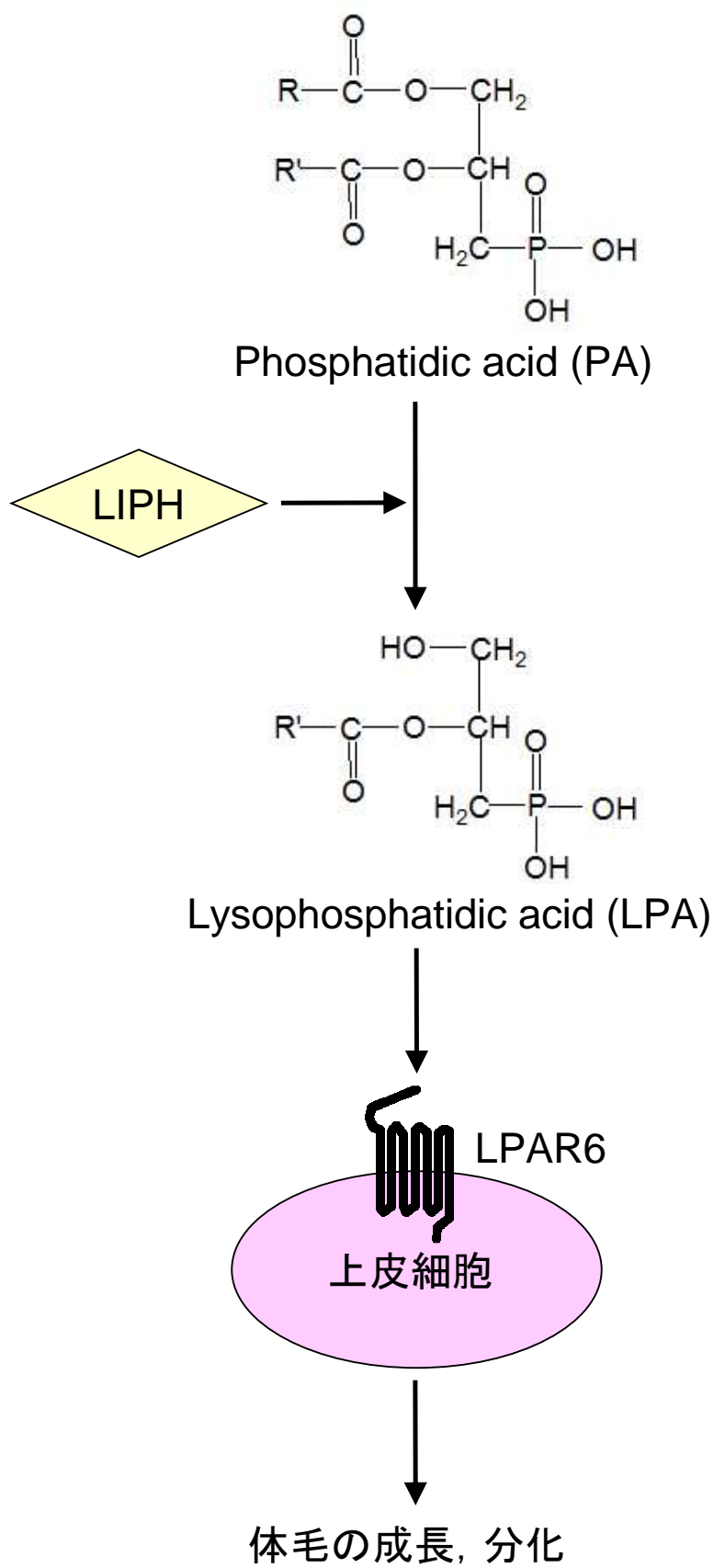


図 2. 新規肺癌マーカー探索の概略

図2

Xenopus laevis (stage43) 肺・咽頭部位vs他の消化管 で
マイクロアレイによる遺伝子発現解析



肺・咽頭部位で発現が2倍以上の遺伝子を選択



ツメガエルアノテーションデータを用いてヒトオルソログに変換



上記より分泌性タンパク質をコードする遺伝子を選択



各種データベースで肺における発現を確認

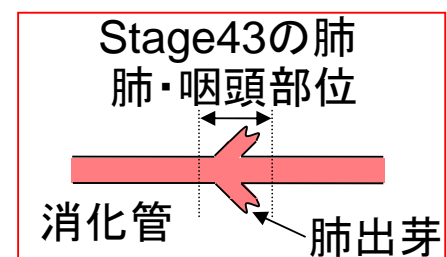


図 3. LIPH は肺腺癌細胞株で高発現していた。(A) ヒト肺癌細胞株, 正常ヒト小気道上皮細胞 (SAEC) および正常ヒト気管支上皮細胞 (NHBE) における *LIPH* mRNA 発現量を定量 PCR により定量した。*LIPH* mRNA は *GAPDH* mRNA の発現量により補正し, PC-3 細胞における発現量を 1 としたときの相対値を示した。(B) 肺腺癌および肺扁平上皮癌細胞株における LIPH タンパク質の分泌発現量を ELISA により定量した。肺癌細胞株を 80% コンフルエントに達するまで培養後, 無血清培地である GIT 培地に交換しさらに 72 時間培養した培養上清を試料として用いた。(C) 肺癌細胞株, SAEC および NHBE における LIPH タンパク質の発現をウエスタンブロットにより解析した。全てのグラフのエラーバーには標準偏差を示した。

图3

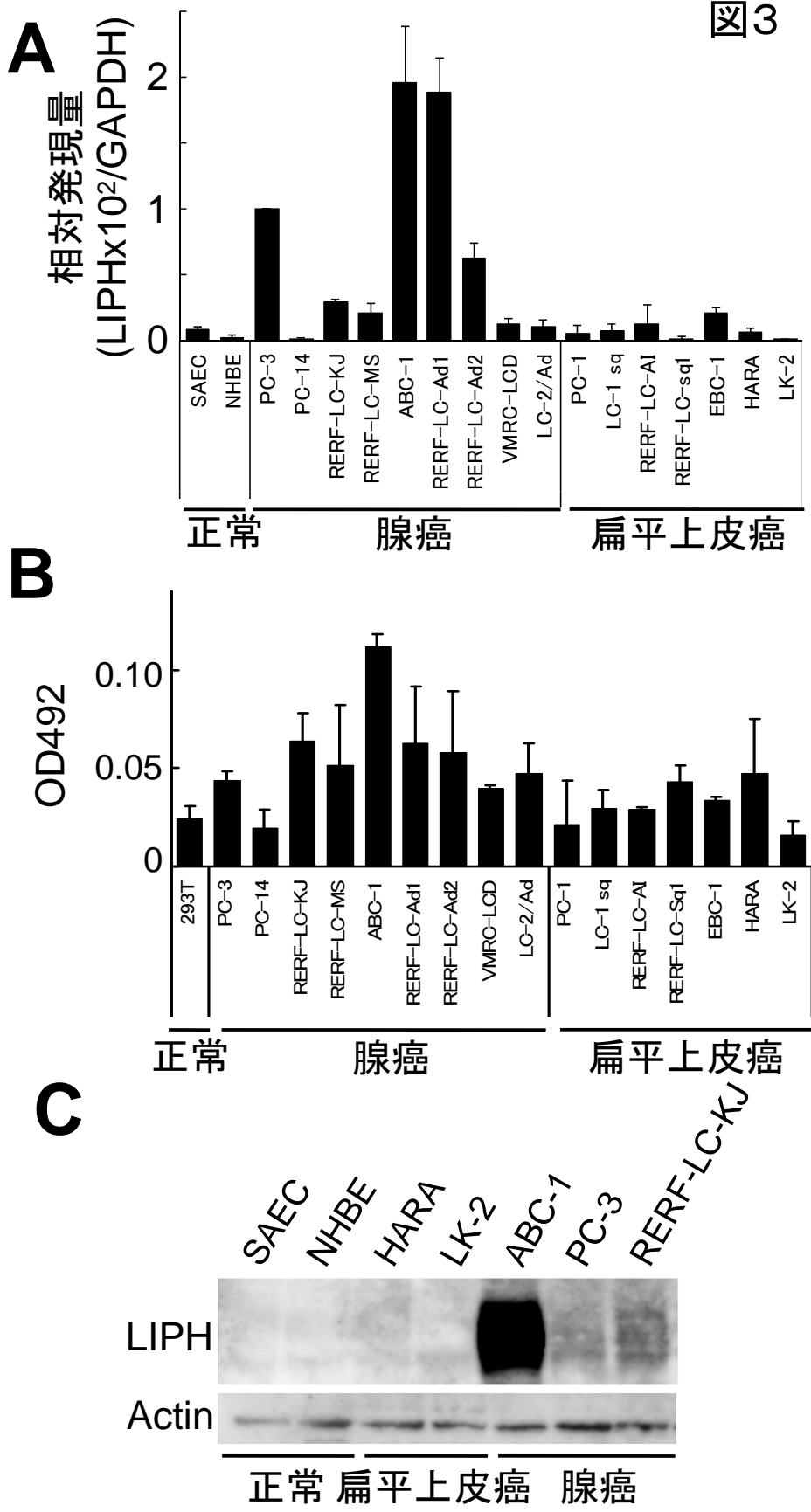


図 4. LIPH は進行肺癌で高発現した。(A) 病理 stage III あるいは IV の患者由来の肺癌組織およびその周辺正常組織における *LIPH* mRNA の発現量を定量 PCR により定量した。*LIPH* の発現量は *TBP* mRNA の発現量で補正した。エラーバーには標準偏差を示した (n=3)。AC は肺腺癌, SCC は肺扁平上皮癌, LCNEC は大細胞神経内分泌癌を表している。(B) 病理 stage III, IV の肺癌患者から取得した血清中 LIPH タンパク質量を ELISA により定量した。

図4

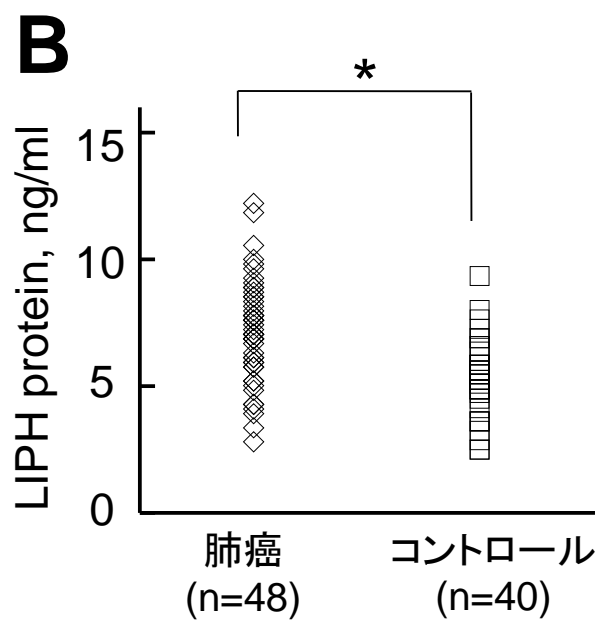
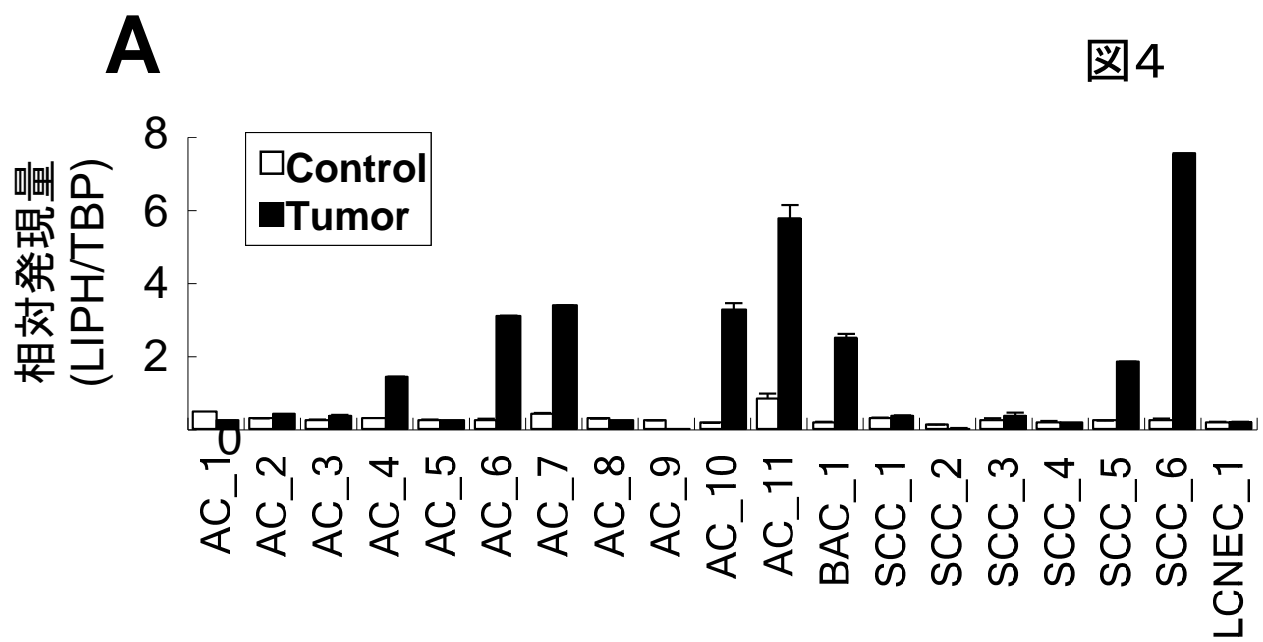


図 5 . LIPH は早期肺癌で高発現した。(A) 病理 stage IA の患者由来の肺癌組織およびその周辺正常組織における *LIPH* mRNA の発現量を定量 PCR により定量した。*LIPH* の発現量は *TBP* mRNA の発現量で標準化した。エラーバーには標準偏差を示した (n=3)。AC は肺腺癌を表している。(B) 病理 stage I あるいは II の肺癌患者から取得した血清中 LIPH タンパク質量を ELISA により定量した。

図5

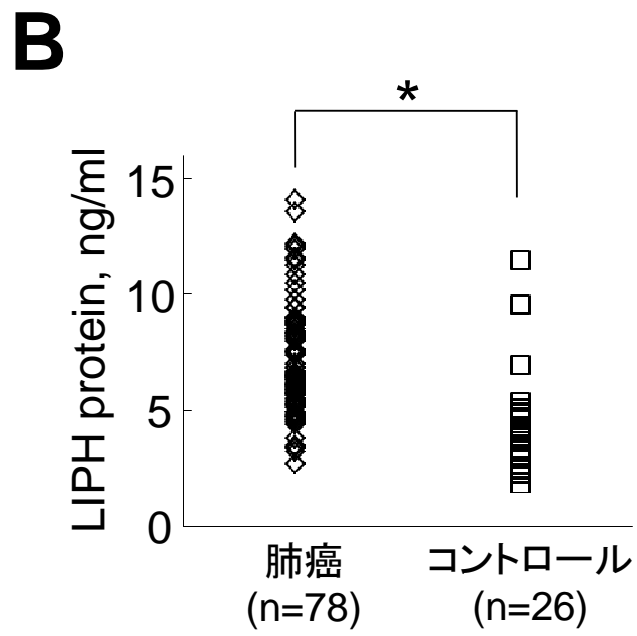
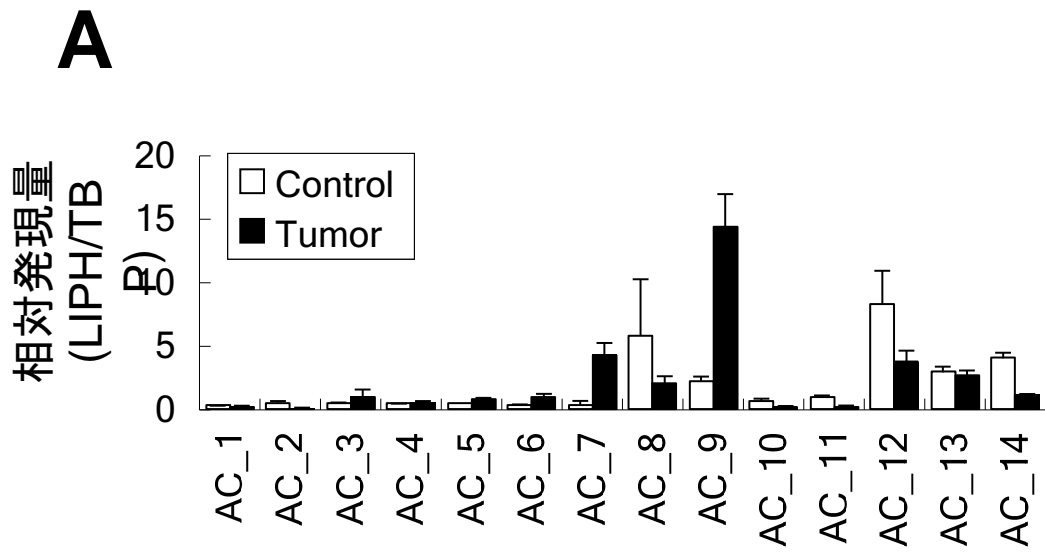
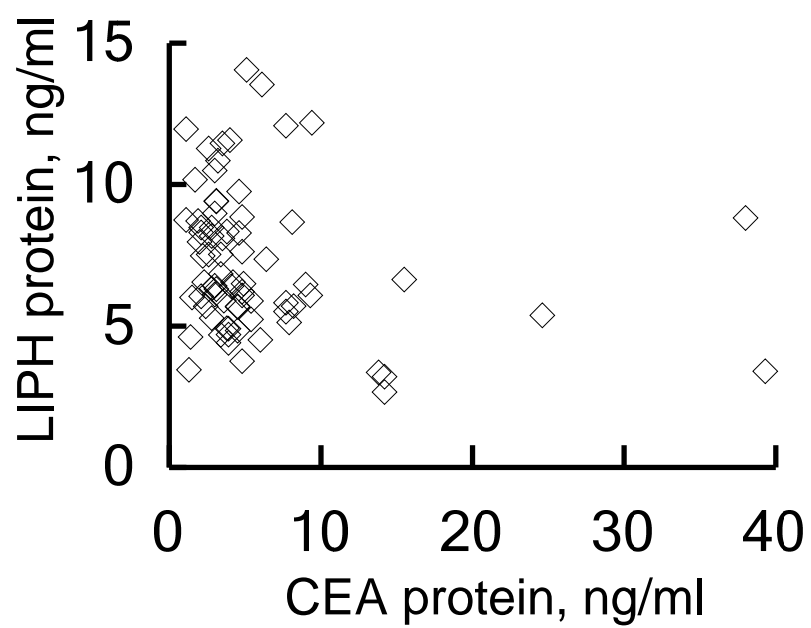


図 6 . 血清中の LIPH 発現量は血清中の CEA 発現量と相関しない。(A) 図 3B および (B) 図 4B で示した試料中における LIPH タンパク質発現量と CEA タンパク質発現量の相関を示した。CEA 値は検体情報に付与されていた値を使用した。

图6

A



B

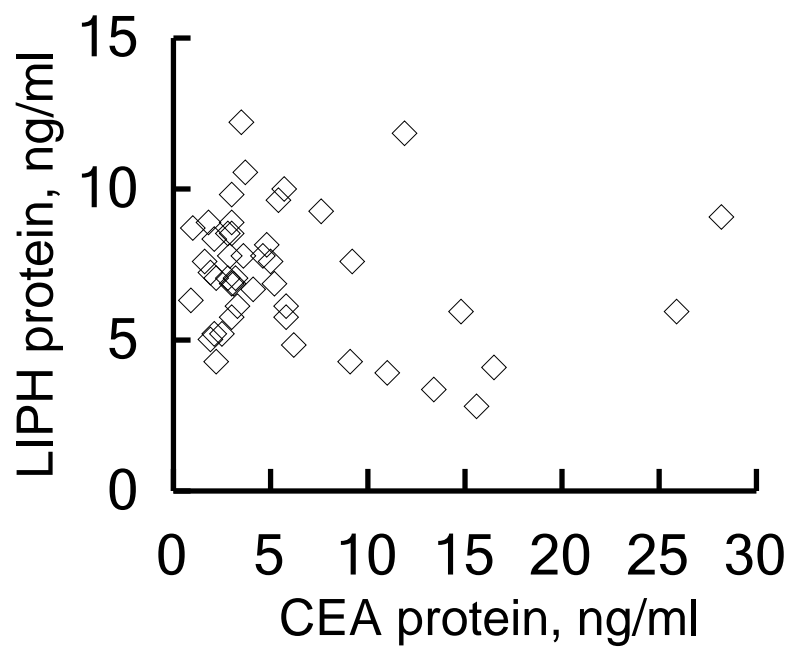
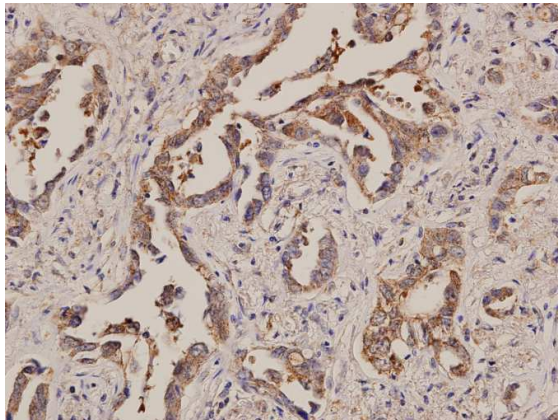


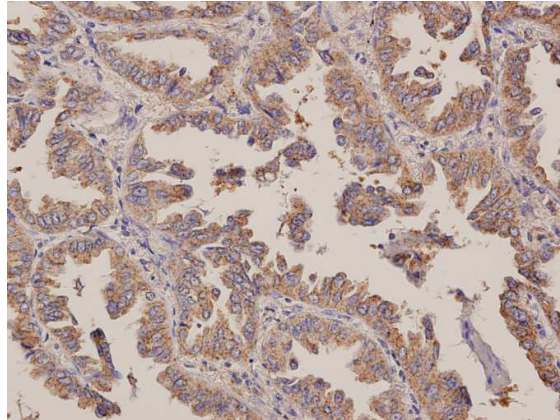
図 7. 肺癌組織マイクロアレイにおける LIPH タンパク質の免疫組織化学解析。(A) 肺腺癌, (B) non-mucinous BAC, (C) mucinous BAC, (D, E) 肺扁平上皮癌, および (F) 正常肺組織における LIPH タンパク質の発現を免疫組織化学により解析した。画像は材料と方法に記した試料のうち代表的なものを示した。観察倍率は 400 倍, スケールバーは 100 μm を示した。

图7

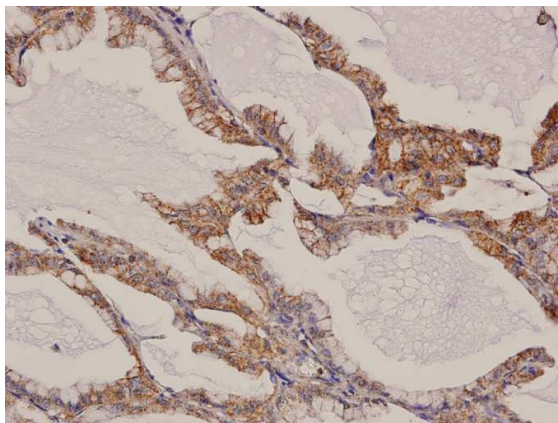
A



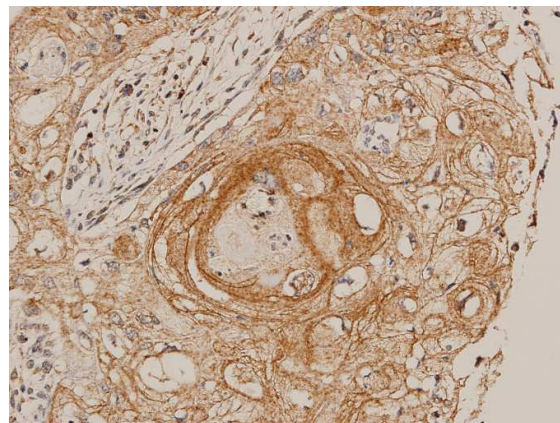
B



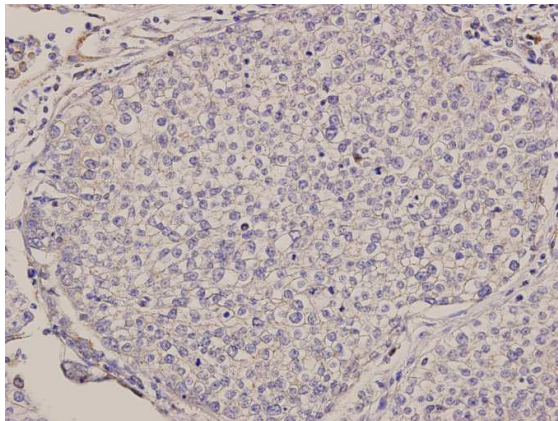
C



D



E



F

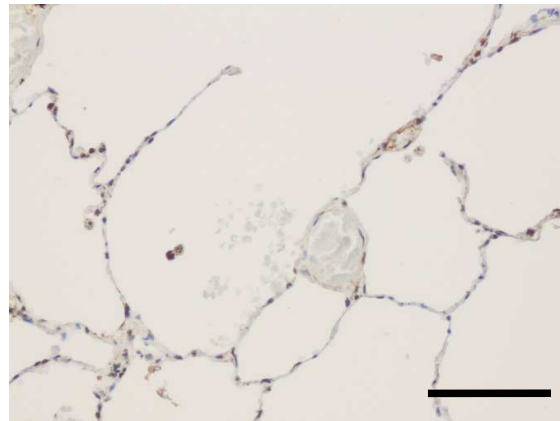
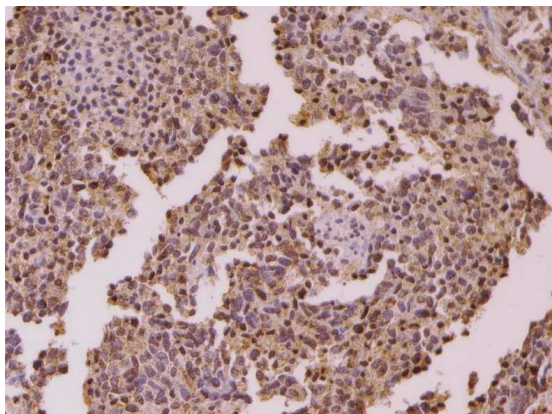
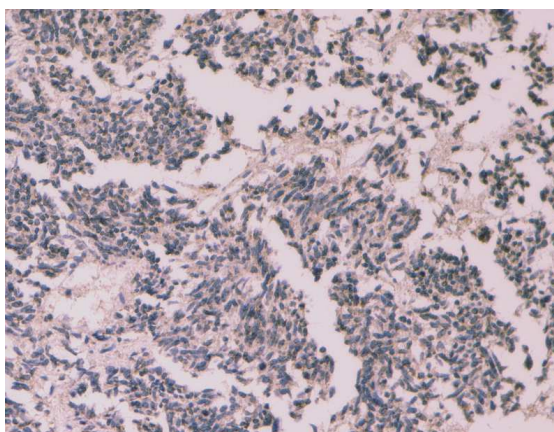


図 8. 小細胞肺癌において LIPH は明瞭な発現パターンを示さない。小細胞肺癌における LIPH タンパク質の発現を免疫組織化学により解析した。(A) LIPH 陽性 (B) LIPH 陰性 (C) 不明瞭症例。観察倍率は 400 倍，スケールバーは 100 μm を示した。

A



B



C

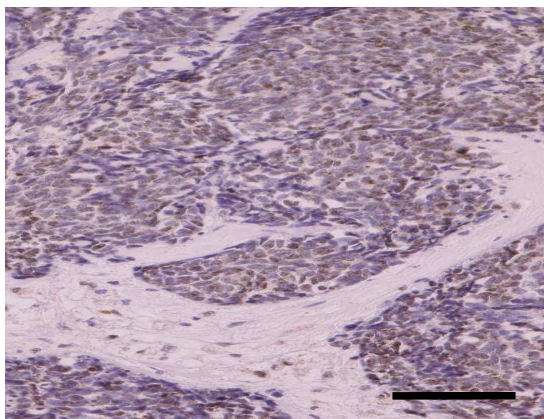
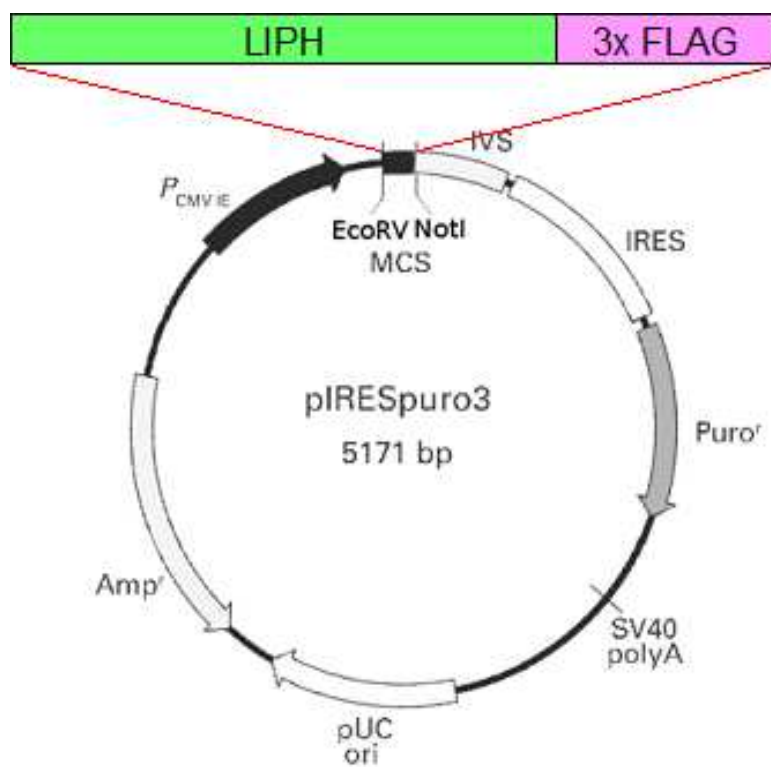


図 9 . LIPH 安定発現細胞の樹立。 (A) pIRESpuro3-LIPH・3Flag ベクター作製の概要。 (B) LIPH-Flag 安定発現 RERF-LC-KJ 細胞における外来性 LIPH の発現を抗 FLAG 抗体でウェスタンブロットすることにより検出した。抗 Actin 抗体はローディングコントロールとして用いた。

A



B

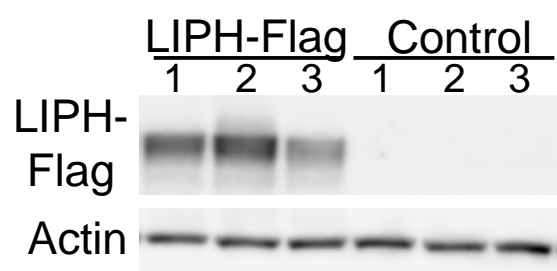


図 10. LIPH の過剰発現は RERF-LC-KJ 細胞の細胞増殖に影響を与えない。(A) LIPH-Flag を安定発現した RERF-LC-KJ 細胞の細胞増殖。細胞の播種から 72 時間後に総細胞数を計測した。(B) LIPH-Flag を安定発現した RERF-LC-KJ 細胞の wound healing assay 解析。創傷直後 (0h), 8 時間後に画像を取得した。スケールバーは 500 μm を示した。(C) (B)で示した創傷領域の面積を Image J ソフトウェアを用いて計測した (n=3)。

図10

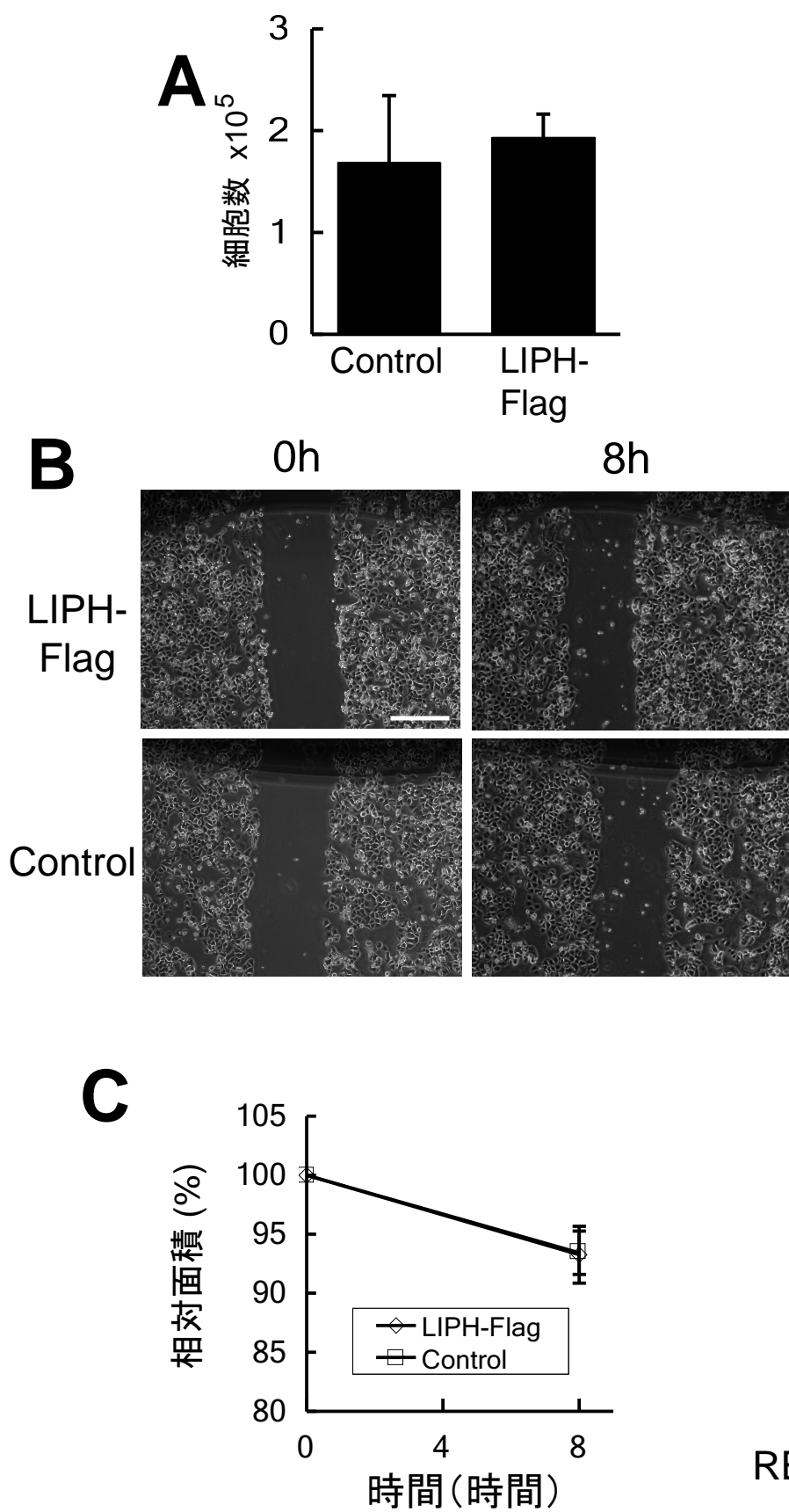
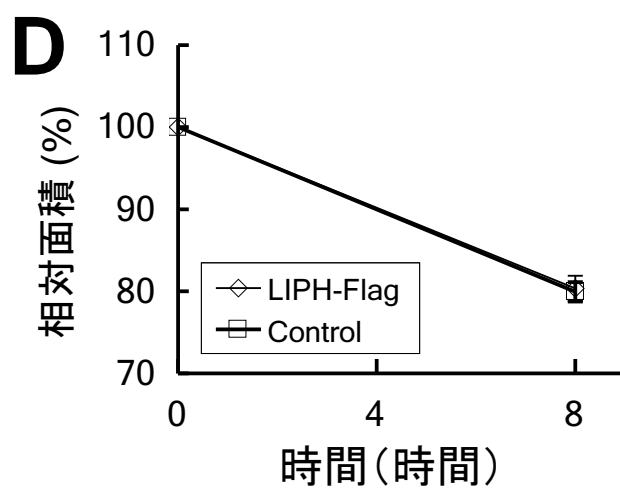
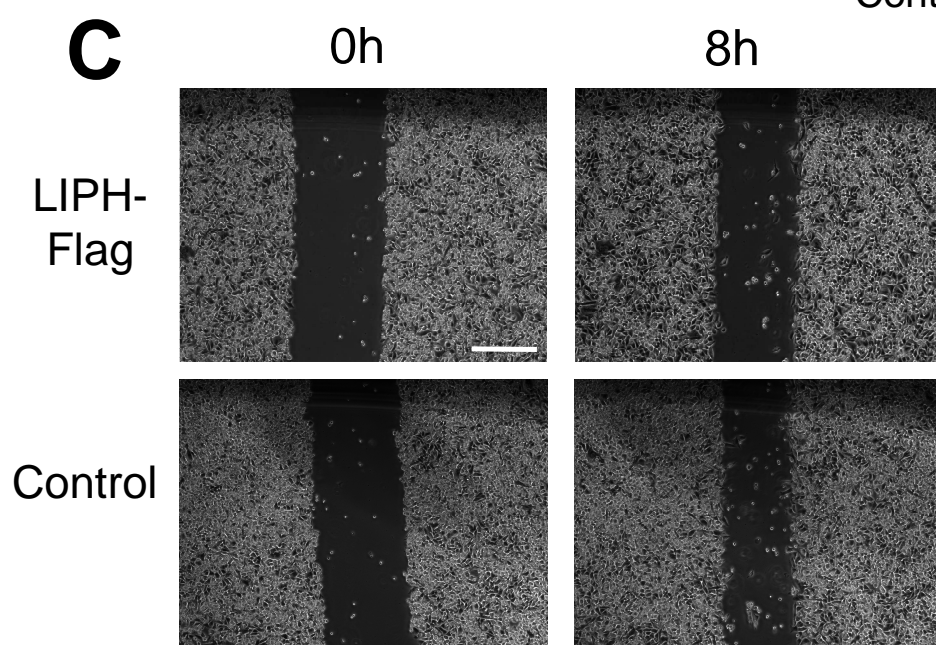
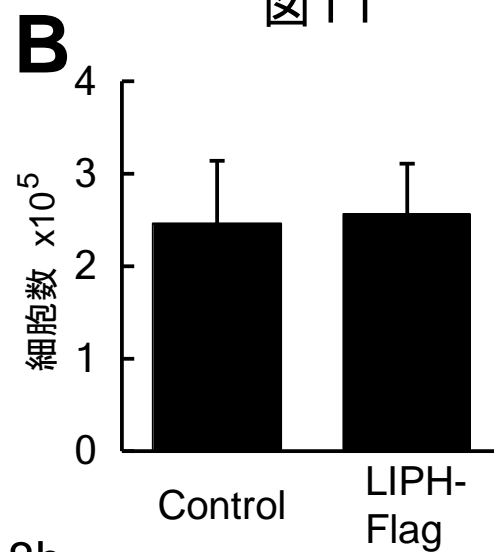
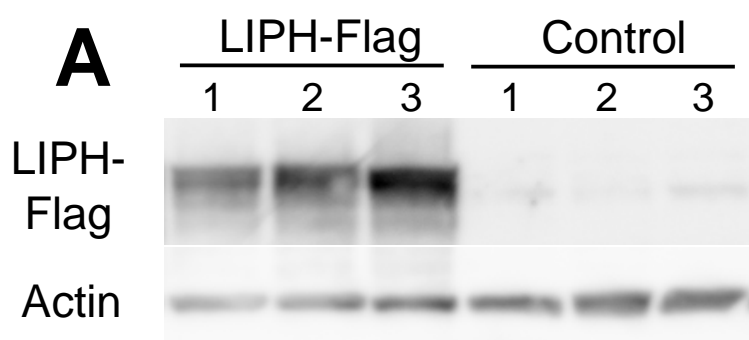


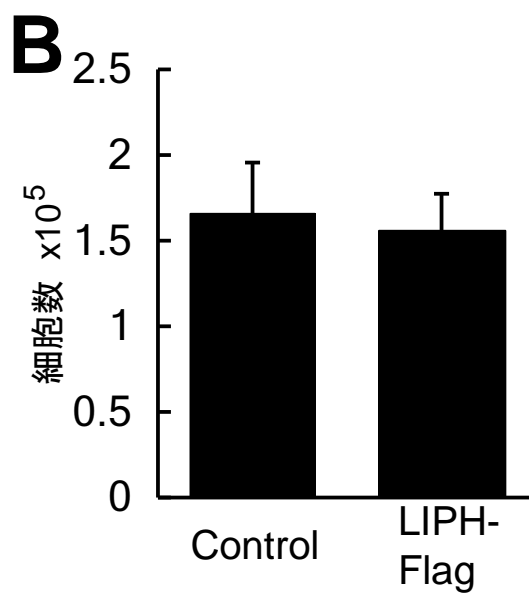
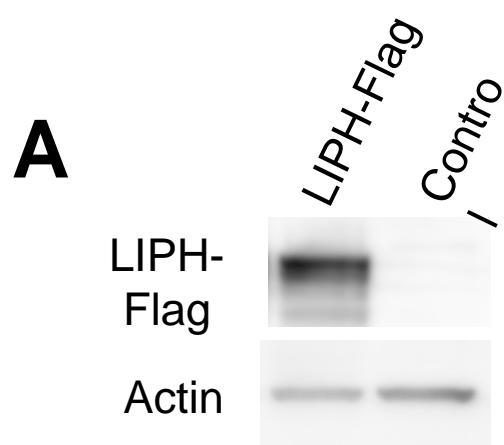
図 1 1 . LIPH の過剰発現は PC-14 細胞の細胞増殖に影響を与えない。(A) LIPH-Flag 安定発現 PC-14 細胞における外来性 LIPH の発現。抗 FLAG 抗体あるいは抗 Actin 抗体によるウェスタンブロットで各タンパク質を検出した。(B) LIPH-Flag を安定発現した PC-14 細胞の細胞増殖。細胞の播種から 72 時間後に総細胞数を計測した。(C) LIPH-Flag を安定発現した PC-14 細胞の wound healing assay 解析。創傷直後 (0h), 8 時間後に画像を取得した。スケールバーは 500 μm を示した。(D) (C)で示した創傷領域の面積を Image J ソフトウェアを用いて計測した (n=3)。

図 11



PC-14

図 1 2. LIPH の過剰発現は VMRC-LCD 細胞の細胞増殖に影響を与えない。(A) LIPH-Flag 安定発現 VMRC-LCD 細胞における外来性 LIPH の発現。抗 FLAG 抗体あるいは抗 Actin 抗体によるウェスタンブロットで各タンパク質を検出した。(B) LIPH-Flag を安定発現した VMRC-LCD 細胞の細胞増殖。細胞の播種から 72 時間後に総細胞数を計測した。



VMRC-LCD

図 1 3. LIPH のノックダウンは肺腺癌細胞 ABC-1 の細胞増殖を抑制する。(A) siRNA による内在性 LIPH のノックダウンのウェスタンブロットによる解析した。トランスフェクションから 72 時間後にタンパク質抽出液を回収し, 抗 LIPH 抗体あるいは抗 Actin 抗体でのウェスタンブロットにより評価した。(B) LIPH に対する siRNA (siLIPH) No. 3 (siLIPH3) をトランスフェクションした ABC-1 細胞の細胞増殖。トランスフェクションから 72 時間後に総細胞数を計測した。(C) siLIPH3 をトランスフェクションした ABC-1 細胞の wound healing assay 解析。創傷直後 (0h), 6 時間後, 24 時間後に画像を取得した。図は創傷直後と 24 時間後の画像を示した。スケールバーは 500 μm を示した。(D) (C)で示した創傷領域の面積を Image J ソフトウェアを用いて計測した (n=3, *p<0.05)。

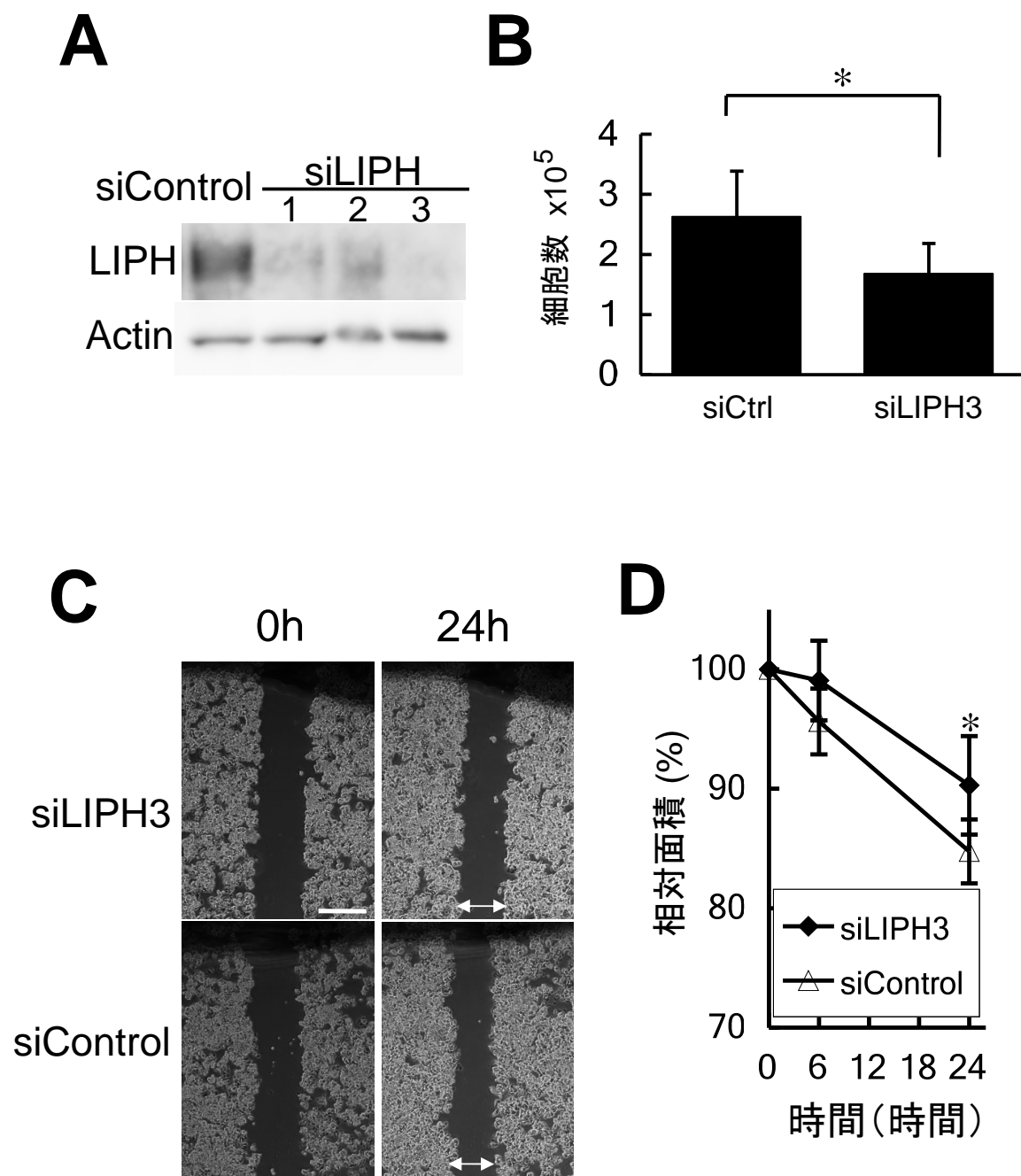
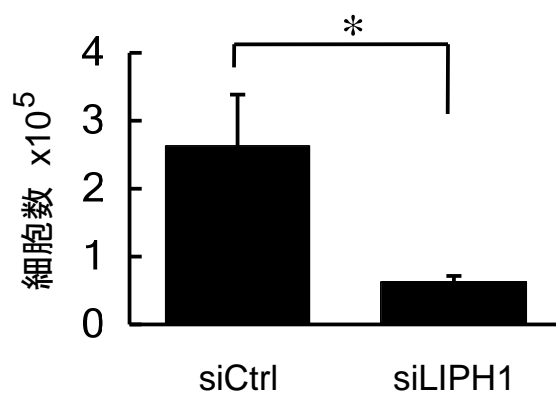
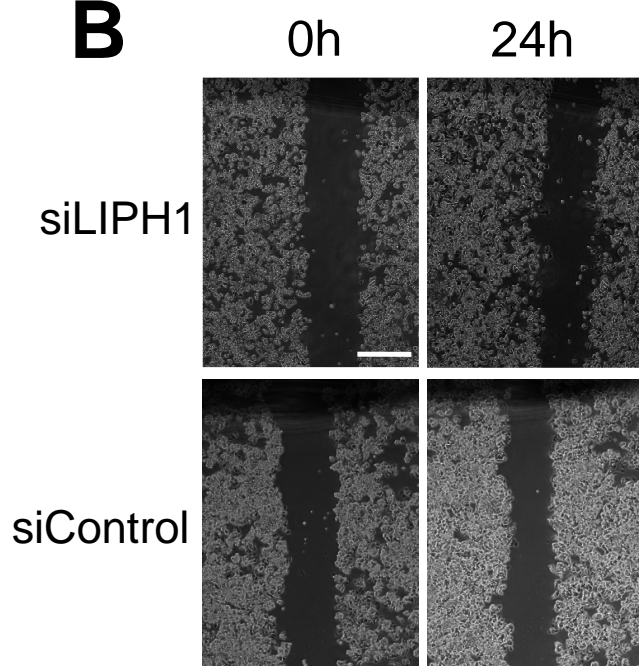


図 1 4 . 異なるターゲット配列を認識する LIPH に対する siRNA によっても肺腺癌細胞 ABC-1 の細胞増殖が抑制される。(A) LIPH に対する siRNA (siLIPH) No. 1 (siLIPH1) をトランスフェクションした ABC-1 細胞の細胞増殖。トランスフェクションから 72 時間後に総細胞数を計測した。(B) siLIPH1 をトランスフェクションした ABC-1 細胞の wound healing assay 解析。創傷直後 (0h), 6 時間後, 24 時間後に画像を取得した。図は創傷直後と 24 時間後の画像を示した。スケールバーは 500 μ m を示した。(C) (B)で示した創傷領域の面積を Image J ソフトウェアを用いて計測した (n=3, *p<0.05)。

A



B



C

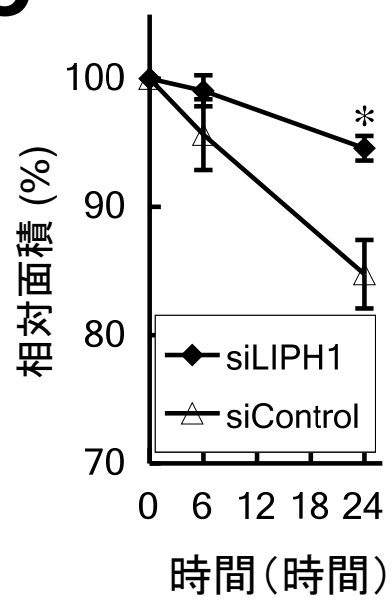
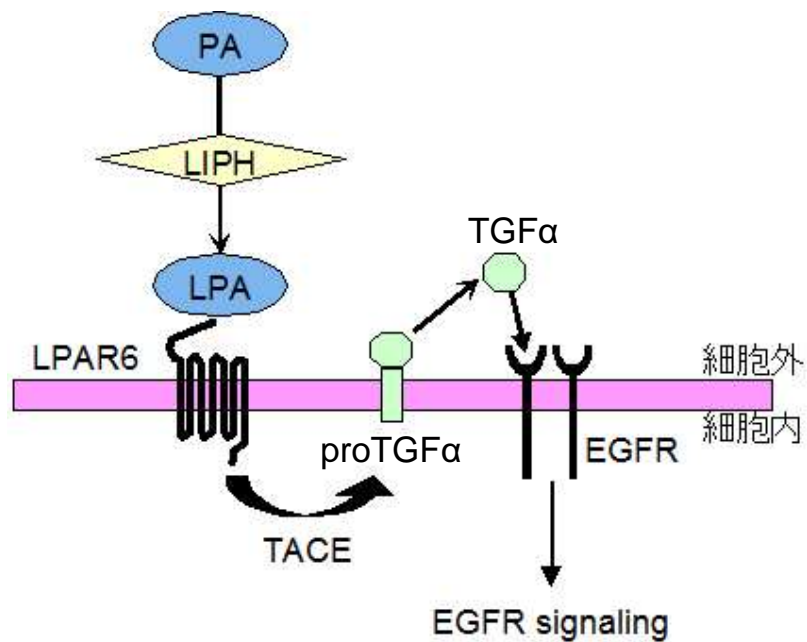


図 1 5. LIPH は EGFR 経路を活性化しない。(A) 毛包細胞において LIPH が受容体介在シグナルにより EGFF 経路を活性化する概略図。(B) siLIPH をトランスフェクションした ABC-1 細胞および LIPH-Flag 安定発現 RERF-LC-KJ 細胞における EGFR のリン酸化状態をウエスタンブロットにより解析した。

A



B

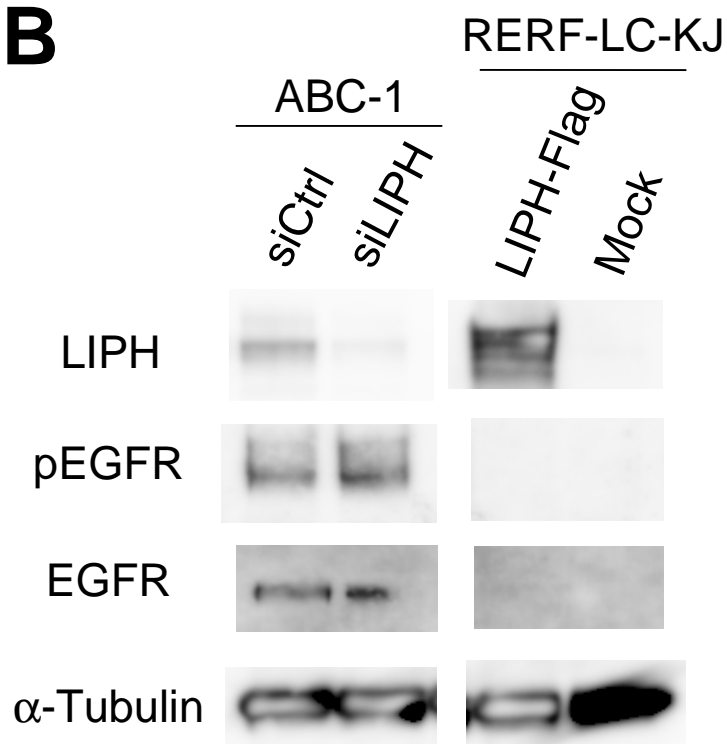
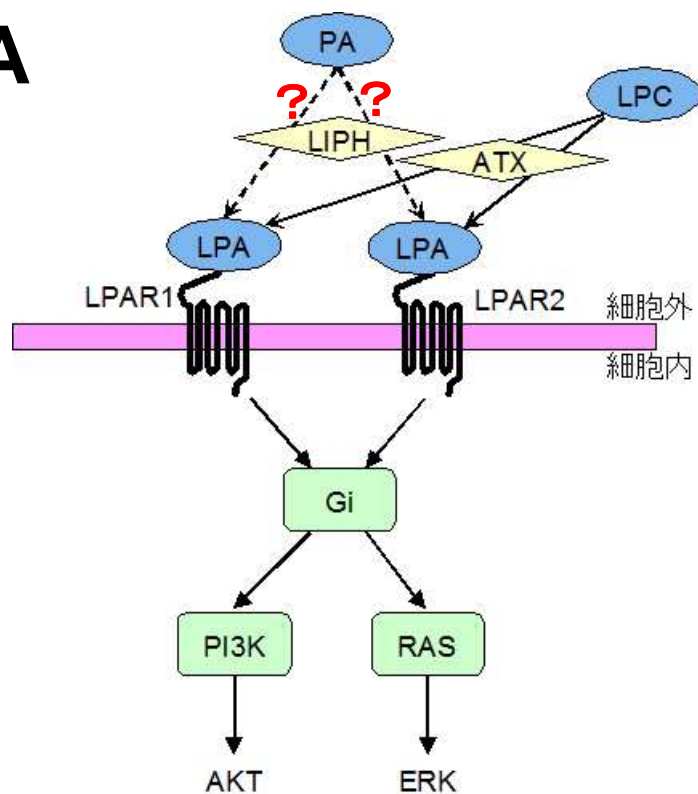


図 1 6 . LIPH は PI3K/AKT および MAPK 経路を活性化しない。(A) LPA 受容体介在シグナルが AKT および MAPK 経路を活性化する概略図。(A. Inoue et al., LPA-producing enzyme PA-PLA(1)alpha regulates hair follicle development by modulating EGFR signalling, Embo J 30 (2011) 4248-4260. より改変) (B) siLIPH をトランスフェクションした ABC-1 細胞および LIPH-Flag 安定発現 RERF-LC-KJ 細胞における AKT および ERK のリン酸化状態をウェスタンブロットにより解析した。

A



B

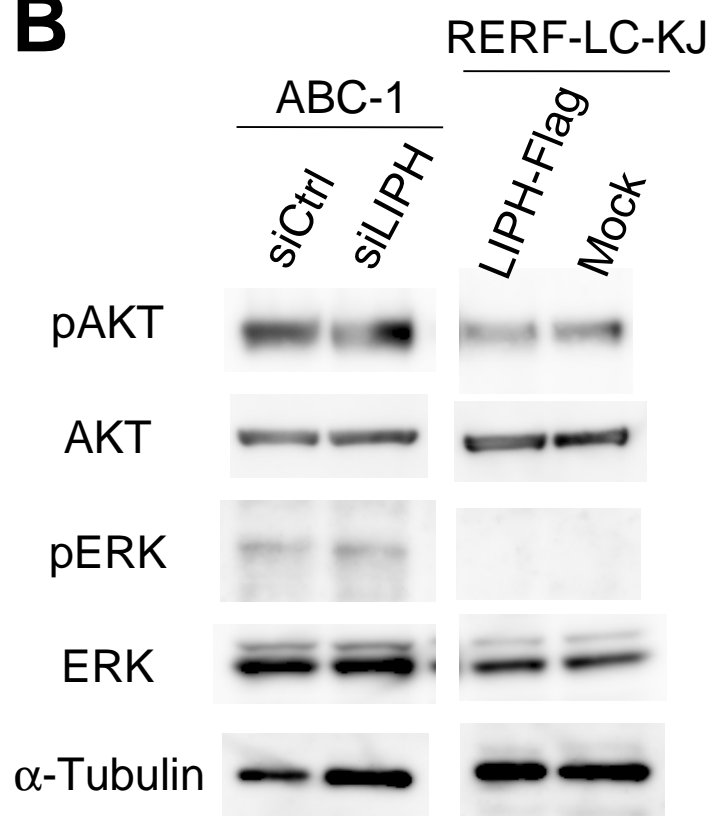


図 1 7. 肺腺癌細胞株において *LIPH* の発現量は LPA 受容体遺伝子の発現量と相関しない。
LPAR1, 2, 3, 4, 5 および *6* の発現量を RT-PCR により解析した。*GAPDH* は内部標準として使用した。

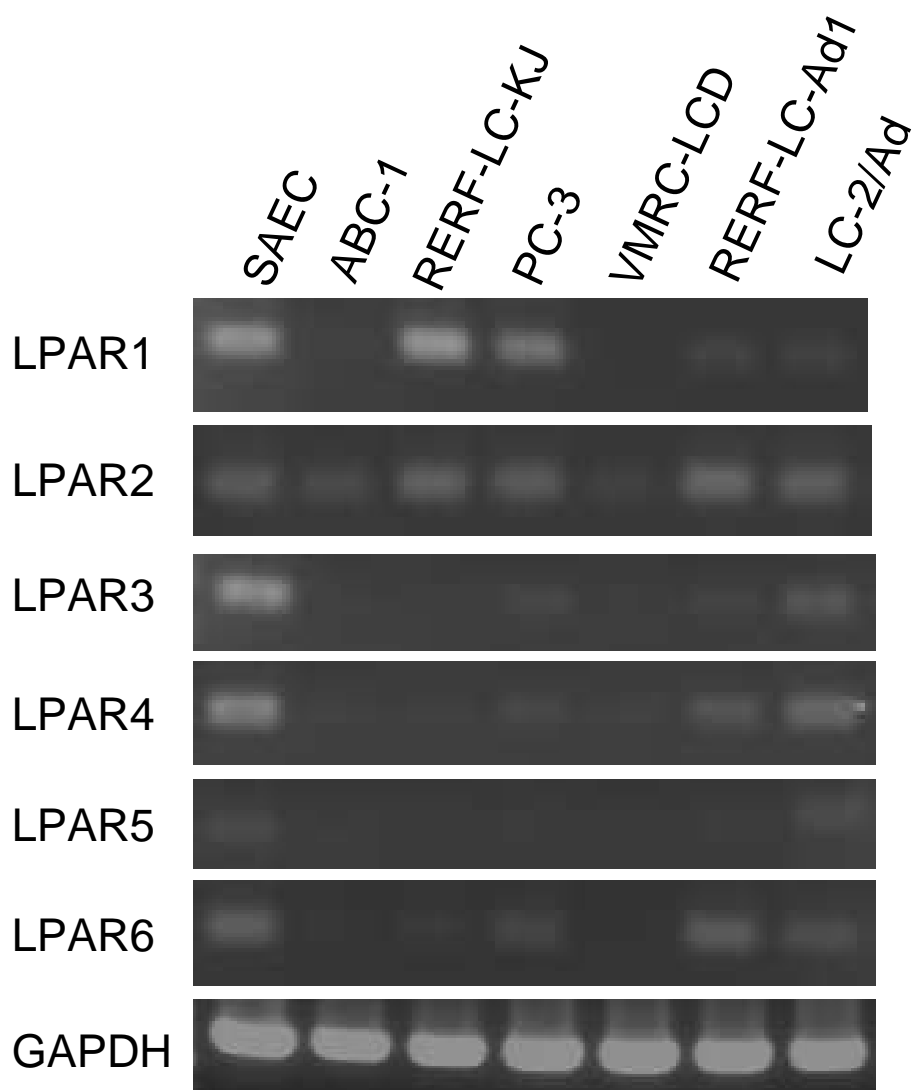


図 1 8. 肺癌において *LIPH* は LPA 受容体遺伝子の発現を制御しない。si*LIPH* をトランスフェクションした ABC-1 細胞および *LIPH* を安定発現した RERF-LC-KJ 細胞における LPA 受容体遺伝子の発現を RT-PCR によって解析した。*GAPDH* は内部標準として使用した。

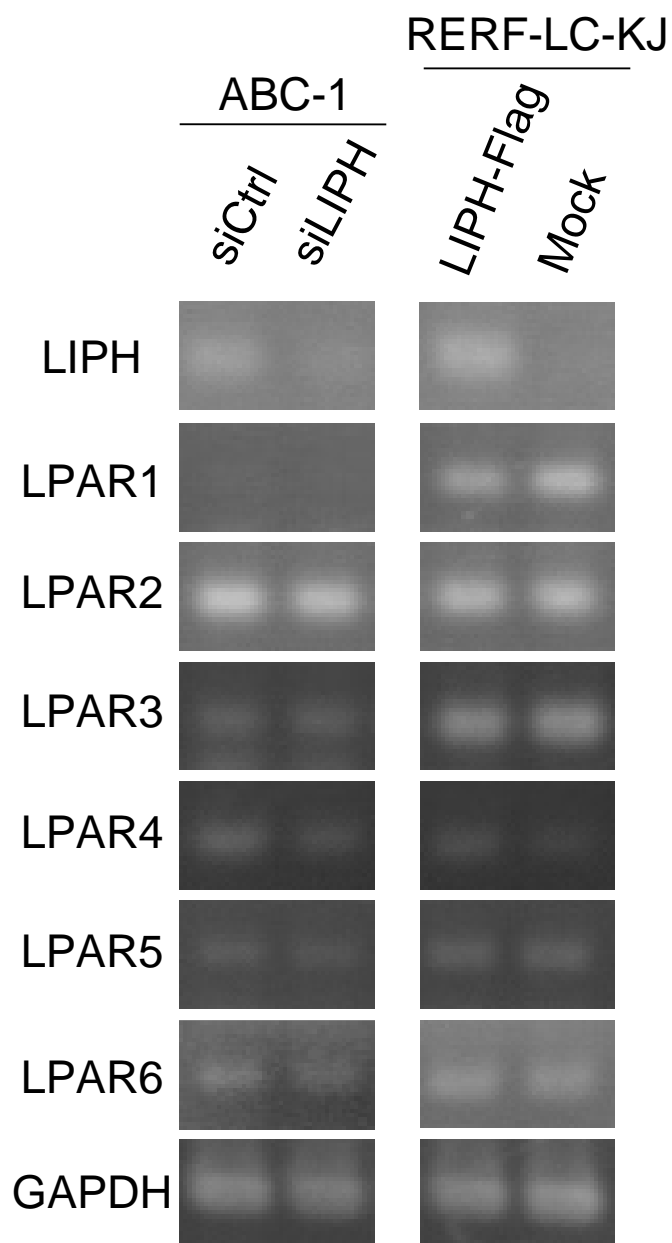


図 1 9 . 血清中の LIPH 発現量の予後予測に対する ROC 解析。死亡を陽性として ROC 解析を行った。X 軸に 1-特異度, Y 軸に感度をプロットすることで ROC 曲線を作成し, 曲線下面積を算出した。

圖 19

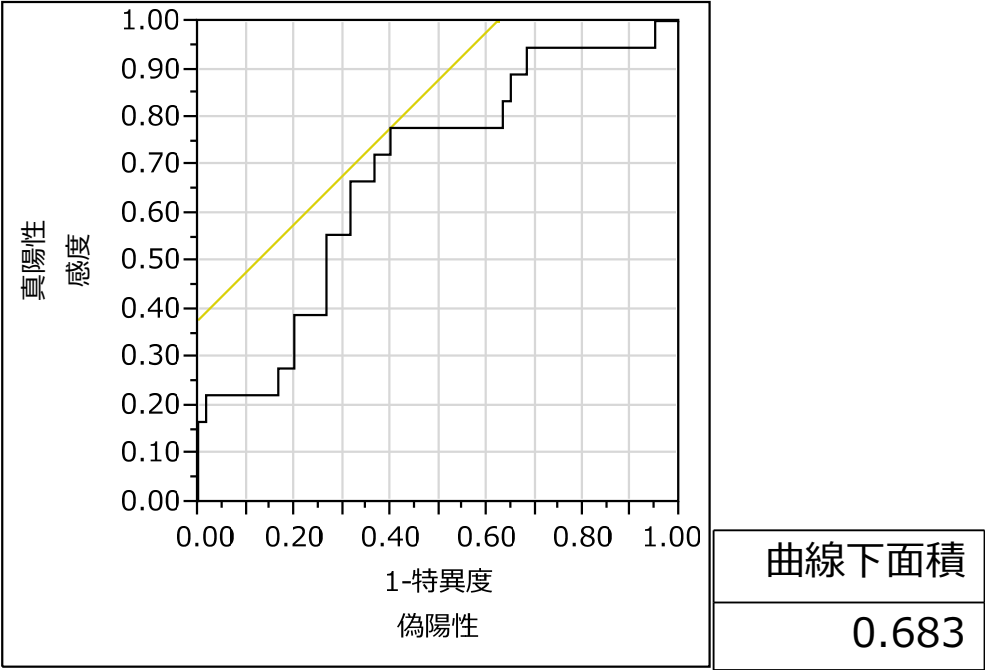
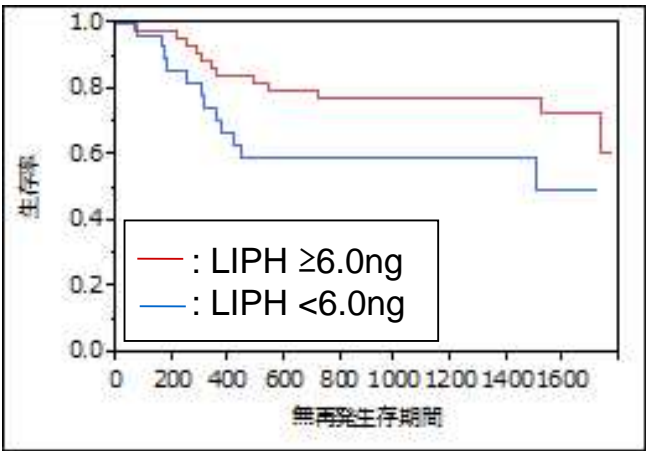
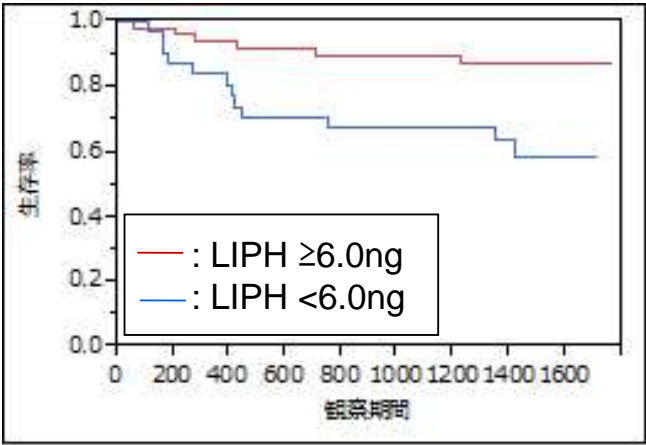


図 20. LIPH 高発現群は外科切除後の予後が良好である。早期肺癌患者の LIPH 高値群 (≥ 6.0 ng/ml, n=46) および低値群 (< 6.0 ng/ml, n=32) における (A) 無増悪生存期間および (B) 全生存期間。(C) 術後補助化学療法が行なわれた 16 例を除外した早期肺癌患者の血清 LIPH 高値群 (≥ 6.0 ng/ml, n=37) および低値群 (< 6.0 ng/ml, n=25) における全生存期間。

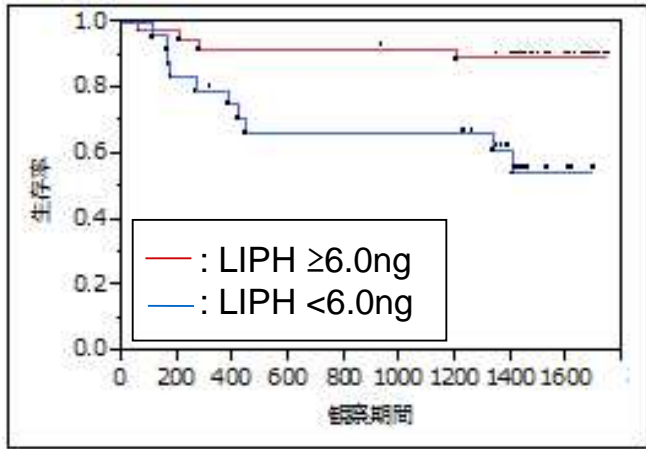
A



B



C



参考文献

- [1] J. Ferlay, H. R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, and D. M. Parkin, Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008, *Int J Cancer* 127 (2010) 2893-2917.
- [2] J. Subramanian, and R. Govindan, Lung cancer in never smokers: a review, *J Clin Oncol* 25 (2007) 561-570.
- [3] J. G. Paez, P. A. Janne, J. C. Lee, S. Tracy, H. Greulich, S. Gabriel, P. Herman, F. J. Kaye, N. Lindeman, T. J. Boggon, K. Naoki, H. Sasaki, Y. Fujii, M. J. Eck, W. R. Sellers, B. E. Johnson, and M. Meyerson, EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy, *Science* 304 (2004) 1497-1500.
- [4] T. J. Lynch, D. W. Bell, R. Sordella, S. Gurubhagavatula, R. A. Okimoto, B. W. Brannigan, P. L. Harris, S. M. Haserlat, J. G. Supko, F. G. Haluska, D. N. Louis, D. C. Christiani, J. Settleman, and D. A. Haber, Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib, *N Engl J Med* 350 (2004) 2129-2139.
- [5] M. Soda, Y. L. Choi, M. Enomoto, S. Takada, Y. Yamashita, S. Ishikawa, S. Fujiwara, H. Watanabe, K. Kurashina, H. Hatanaka, M. Bando, S. Ohno, Y. Ishikawa, H. Aburatani, T. Niki, Y. Sohara, Y. Sugiyama, and H. Mano, Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer, *Nature* 448 (2007) 561-566.
- [6] J. Qian, and P. P. Massion, Role of chromosome 3q amplification in lung cancer, *J Thorac Oncol* 3 (2008) 212-215.
- [7] T. Kikuchi, Y. Daigo, T. Katagiri, T. Tsunoda, K. Okada, S. Kakiuchi, H. Zembutsu, Y. Furukawa, M. Kawamura, K. Kobayashi, K. Imai, and Y. Nakamura, Expression profiles of non-small cell lung cancers on cDNA microarrays: identification of genes for prediction of lymph-node metastasis and sensitivity to anti-cancer drugs, *Oncogene* 22 (2003) 2192-2205.
- [8] R. Kuner, T. Muley, M. Meister, M. Ruschhaupt, A. Bunes, E. C. Xu, P. Schnabel, A. Warth, A. Poustka, H. Sultmann, and H. Hoffmann, Global gene expression analysis reveals specific patterns of cell junctions in non-small cell lung cancer subtypes, *Lung Cancer* 63 (2009) 32-38.
- [9] N. M.-A. C. Group., Chemotherapy in addition to supportive care improves survival in advanced non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 16 randomized controlled trials, *J Clin Oncol* 26 (2008) 4617-4625.
- [10] D. P. Carbone, and E. Felip, Adjuvant therapy in non-small cell lung cancer: future treatment prospects and paradigms, *Clin Lung Cancer* 12 (2011) 261-271.
- [11] M. Hosgor, Y. Ijzendoorn, W. J. Mooi, D. Tibboel, and R. R. De Krijger, Thyroid transcription factor-1 expression during normal human lung development and in patients with congenital diaphragmatic hernia, *J Pediatr Surg* 37 (2002) 1258-1262.
- [12] S. Kimura, Y. Hara, T. Pineau, P. Fernandez-Salguero, C. H. Fox, J. M. Ward, and F. J. Gonzalez, The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of

- the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary, *Genes Dev* 10 (1996) 60-69.
- [13] E. M. Small, S. A. Vokes, R. J. Garriock, D. Li, and P. A. Krieg, Developmental expression of the *Xenopus* *Nkx2-1* and *Nkx2-4* genes, *Mech Dev* 96 (2000) 259-262.
- [14] J. Moldvay, M. Jackel, K. Bogos, I. Soltesz, L. Agocs, G. Kovacs, and Z. Schaff, The role of TTF-1 in differentiating primary and metastatic lung adenocarcinomas, *Pathol Oncol Res* 10 (2004) 85-88.
- [15] G. J. Mizejewski, Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants, *Exp Biol Med* (Maywood) 226 (2001) 377-408.
- [16] K. J. Yong, C. Gao, J. S. Lim, B. Yan, H. Yang, T. Dimitrov, A. Kawasaki, C. W. Ong, K. F. Wong, S. Lee, S. Ravikumar, S. Srivastava, X. Tian, R. T. Poon, S. T. Fan, J. M. Luk, Y. Y. Dan, M. Salto-Tellez, L. Chai, and D. G. Tenen, Oncofetal gene *SALL4* in aggressive hepatocellular carcinoma, *N Engl J Med* 368 (2013) 2266-2276.
- [17] T. Oikawa, A. Kamiya, S. Kakinuma, M. Zeniya, R. Nishinakamura, H. Tajiri, and H. Nakauchi, *Sall4* regulates cell fate decision in fetal hepatic stem/progenitor cells, *Gastroenterology* 136 (2009) 1000-1011.
- [18] J. B. Gurdon, C. D. Lane, H. R. Woodland, and G. Marbaix, Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells., *Nature* 233 (1971) 177-182.
- [19] J. Heasman, M. Kofron, and C. Wylie, Beta-catenin signaling activity dissected in the early *Xenopus* embryo: a novel antisense approach, *Dev Biol* 222 (2000) 124-134.
- [20] P. D. Turnpenny, B. Alman, A. S. Cornier, P. F. Giampietro, A. Offiah, O. Tassy, O. Pourquie, K. Kusumi, and S. Dunwoodie, Abnormal vertebral segmentation and the notch signaling pathway in man, *Dev Dyn* 236 (2007) 1456-1474.
- [21] M. Asashima, Y. Ito, T. Chan, T. Michiue, M. Nakanishi, K. Suzuki, K. Hitachi, K. Okabayashi, A. Kondow, and T. Ariizumi, In vitro organogenesis from undifferentiated cells in *Xenopus*, *Dev Dyn* 238 (2009) 1309-1320.
- [22] T. Ariizumi, M. Kinoshita, C. Yokota, K. Takano, K. Fukuda, N. Moriyama, G. M. Malacinski, and M. Asashima, Amphibian in vitro heart induction: a simple and reliable model for the study of vertebrate cardiac development, *Int J Dev Biol* 47 (2003) 405-410.
- [23] K. Osafune, R. Nishinakamura, S. Komazaki, and M. Asashima, In vitro induction of the pronephric duct in *Xenopus* explants, *Dev Growth Differ* 44 (2002) 161-167.
- [24] N. Moriya, S. Komazaki, S. Takahashi, C. Yokota, and M. Asashima, In vitro pancreas formation from *Xenopus* ectoderm treated with activin and retinoic acid, *Dev Growth Differ* 42 (2000) 593-602.
- [25] H. Sonoda, J. Aoki, T. Hiramatsu, M. Ishida, K. Bandoh, Y. Nagai, R. Taguchi, K. Inoue, and H. Arai, A novel phosphatidic acid-selective phospholipase A1 that produces lysophosphatidic acid, *J Biol Chem* 277 (2002) 34254-34263.

- [26] W. Jin, U. C. Broedl, H. Monajemi, J. M. Glick, and D. J. Rader, Lipase H, a new member of the triglyceride lipase family synthesized by the intestine, *Genomics* 80 (2002) 268-273.
- [27] J. Aoki, A. Inoue, and S. Okudaira, Two pathways for lysophosphatidic acid production, *Biochim Biophys Acta* 1781 (2008) 513-518.
- [28] A. Kazantseva, A. Goltsov, R. Zinchenko, A. P. Grigorenko, A. V. Abrukova, Y. K. Moliaka, A. G. Kirillov, Z. Guo, S. Lyle, E. K. Ginter, and E. I. Rogaev, Human hair growth deficiency is linked to a genetic defect in the phospholipase gene LIPH, *Science* 314 (2006) 982-985.
- [29] A. Inoue, N. Arima, J. Ishiguro, G. D. Prestwich, H. Arai, and J. Aoki, LPA-producing enzyme PA-PLA(1) α regulates hair follicle development by modulating EGFR signalling, *Embo J* 30 (2011) 4248-4260.
- [30] G. B. Mills, and W. H. Moolenaar, The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer, *Nat Rev Cancer* 3 (2003) 582-591.
- [31] J. Furak, I. Trojan, T. Szoke, L. Tiszlavicz, Z. Morvay, J. Eller, and A. Balogh, Bronchioloalveolar lung cancer: occurrence, surgical treatment and survival, *Eur J Cardiothorac Surg* 23 (2003) 818-823.
- [32] J. A. Zell, S. H. Ou, A. Ziogas, and H. Anton-Culver, Epidemiology of bronchioloalveolar carcinoma: improvement in survival after release of the 1999 WHO classification of lung tumors, *J Clin Oncol* 23 (2005) 8396-8405.
- [33] Q. Wu, X. Chen, J. Zhang, Y. H. Loh, T. Y. Low, W. Zhang, S. K. Sze, B. Lim, and H. H. Ng, Sall4 interacts with Nanog and co-occupies Nanog genomic sites in embryonic stem cells, *J Biol Chem* 281 (2006) 24090-24094.
- [34] J. Zhang, W. L. Tam, G. Q. Tong, Q. Wu, H. Y. Chan, B. S. Soh, Y. Lou, J. Yang, Y. Ma, L. Chai, H. H. Ng, T. Lufkin, P. Robson, and B. Lim, Sall4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1, *Nat Cell Biol* 8 (2006) 1114-1123.
- [35] K. Chung, N. Nishiyama, S. Yamano, H. Komatsu, S. Hanada, M. Wei, H. Wanibuchi, S. Suehiro, and A. Kakehashi, Serum AGR2 as an early diagnostic and postoperative prognostic biomarker of human lung adenocarcinoma, *Cancer Biomark* 10 (2011-2012) 101-107.
- [36] Y. J. Lu, X. Y. Dong, J. Shipley, R. G. Zhang, and S. J. Cheng, Chromosome 3 imbalances are the most frequent aberration found in non-small cell lung carcinoma, *Lung Cancer* 23 (1999) 61-66.
- [37] K. Hibi, B. Trink, M. Patturajan, W. H. Westra, O. L. Caballero, D. E. Hill, E. A. Ratovitski, J. Jen, and D. Sidransky, AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 5462-5467.
- [38] H. Yamamoto, H. Shigematsu, M. Nomura, W. W. Lockwood, M. Sato, N. Okumura, J. Soh, M. Suzuki, Wistuba, II, K. M. Fong, H. Lee, S. Toyooka, H. Date, W. L. Lam, J. D. Minna, and A. F. Gazdar, PIK3CA mutations and copy number gains in human lung cancers, *Cancer Res* 68 (2008)

6913-6921.

- [39] A. J. Bass, H. Watanabe, C. H. Mermel, S. Yu, S. Perner, R. G. Verhaak, S. Y. Kim, L. Wardwell, P. Tamayo, I. Gat-Viks, A. H. Ramos, M. S. Woo, B. A. Weir, G. Getz, R. Beroukhim, M. O'Kelly, A. Dutt, O. Rozenblatt-Rosen, P. Dziunycz, J. Komisarof, L. R. Chirieac, C. J. Lafargue, V. Scheble, T. Wilbertz, C. Ma, S. Rao, H. Nakagawa, D. B. Stairs, L. Lin, T. J. Giordano, P. Wagner, J. D. Minna, A. F. Gazdar, C. Q. Zhu, M. S. Brose, I. Cecconello, U. R. Jr, S. K. Marie, O. Dahl, R. A. Shivdasani, M. S. Tsao, M. A. Rubin, K. K. Wong, A. Regev, W. C. Hahn, D. G. Beer, A. K. Rustgi, and M. Meyerson, SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas, *Nat Genet* 41 (2009) 1238-1242.
- [40] C. Luk, M. S. Tsao, J. Bayani, F. Shepherd, and J. A. Squire, Molecular cytogenetic analysis of non-small cell lung carcinoma by spectral karyotyping and comparative genomic hybridization, *Cancer Genet Cytogenet* 125 (2001) 87-99.
- [41] M. Brunelli, E. Bria, A. Nottegar, S. Cingarlini, F. Simionato, A. Calio, A. Eccher, C. Parolini, A. Iannucci, E. Gilioli, S. Pedron, F. Massari, G. Tortora, I. Borze, S. Knuutila, S. Gobbo, A. Santo, L. Tondulli, F. Calabro, G. Martignoni, and M. Chilosi, True 3q chromosomal amplification in squamous cell lung carcinoma by FISH and aCGH molecular analysis: impact on targeted drugs, *PLoS One* 7 (2012) e49689.
- [42] G. M. Newnham, M. Conron, S. McLachlan, A. Dobrovic, H. Do, J. Li, K. Opeskin, N. Thompson, G. M. Wright, and D. M. Thomas, Integrated mutation, copy number and expression profiling in resectable non-small cell lung cancer, *BMC Cancer* 11 (2011) 93.
- [43] A. M. Bjorkqvist, K. Husgafvel-Pursiainen, S. Anttila, A. Karjalainen, L. Tammilehto, K. Mattson, H. Vainio, and S. Knuutila, DNA gains in 3q occur frequently in squamous cell carcinoma of the lung, but not in adenocarcinoma, *Genes Chromosomes Cancer* 22 (1998) 79-82.
- [44] G. Ali, M. S. Chishti, S. I. Raza, P. John, and W. Ahmad, A mutation in the lipase H (LIPH) gene underlie autosomal recessive hypotrichosis, *Hum Genet* 121 (2007) 319-325.
- [45] M. Yoshizawa, M. Nakamura, M. Farooq, A. Inoue, J. Aoki, and Y. Shimomura, A novel mutation, c.699C>G (p.C233W), in the LIPH gene leads to a loss of the hydrolytic activity and the LPA6 activation ability of PA-PLA1alpha in autosomal recessive wooly hair/hypotrichosis, *J Dermatol Sci* 72 (2013) 61-64.
- [46] S. Shinkuma, M. Akiyama, A. Inoue, J. Aoki, K. Natsuga, T. Nomura, K. Arita, R. Abe, K. Ito, H. Nakamura, H. Ujiie, A. Shibaki, H. Suga, Y. Tsunemi, W. Nishie, and H. Shimizu, Prevalent LIPH founder mutations lead to loss of P2Y5 activation ability of PA-PLA1alpha in autosomal recessive hypotrichosis, *Hum Mutat* 31 (2010) 602-610.
- [47] G. Naz, B. Khan, G. Ali, Z. Azeem, A. Wali, M. Ansar, and W. Ahmad, Novel missense mutations in lipase H (LIPH) gene causing autosomal recessive hypotrichosis (LAH2), *J Dermatol Sci* 54 (2009) 12-16.

- [48] Y. Shimomura, M. C. Garzon, L. Kristal, L. Shapiro, and A. M. Christiano, Autosomal recessive woolly hair with hypotrichosis caused by a novel homozygous mutation in the P2RY5 gene, *Exp Dermatol* 18 (2009) 218-221.
- [49] H. Y. Lee, G. U. Bae, I. D. Jung, J. S. Lee, Y. K. Kim, S. H. Noh, M. L. Stracke, C. G. Park, H. W. Lee, and J. W. Han, Autotaxin promotes motility via G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in human melanoma cells, *FEBS Lett* 515 (2002) 137-140.
- [50] M. Jankowski, Autotaxin: its role in biology of melanoma cells and as a pharmacological target, *Enzyme Res* 2011 (2011) 194857.
- [51] S. Liu, M. Umez-Goto, M. Murph, Y. Lu, W. Liu, F. Zhang, S. Yu, L. C. Stephens, X. Cui, G. Murrow, K. Coombes, W. Muller, M. C. Hung, C. M. Perou, A. V. Lee, X. Fang, and G. B. Mills, Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases, *Cancer Cell* 15 (2009) 539-550.
- [52] M. A. Nouh, X. X. Wu, H. Okazoe, H. Tsunemori, R. Haba, A. M. Abou-Zeid, M. D. Saleem, M. Inui, M. Sugimoto, J. Aoki, and Y. Kakehi, Expression of autotaxin and acylglycerol kinase in prostate cancer: association with cancer development and progression, *Cancer Sci* 100 (2009) 1631-1638.
- [53] A. J. Houben, and W. H. Moolenaar, Autotaxin and LPA receptor signaling in cancer, *Cancer Metastasis Rev* 30 (2011) 557-565.
- [54] L. A. van Meeteren, and W. H. Moolenaar, Regulation and biological activities of the autotaxin-LPA axis, *Prog Lipid Res* 46 (2007) 145-160.
- [55] S. Liu, M. Murph, N. Panupinthu, and G. B. Mills, ATX-LPA receptor axis in inflammation and cancer, *Cell Cycle* 8 (2009) 3695-3701.
- [56] N. K. Popnikolov, B. H. Dalwadi, J. D. Thomas, G. J. Johannes, and W. T. Imagawa, Association of autotaxin and lysophosphatidic acid receptor 3 with aggressiveness of human breast carcinoma, *Tumour Biol* 33 (2012) 2237-2243.
- [57] F. Hao, M. Tan, X. Xu, J. Han, D. D. Miller, G. Tigyi, and M. Z. Cui, Lysophosphatidic acid induces prostate cancer PC3 cell migration via activation of LPA(1), p42 and p38alpha, *Biochim Biophys Acta* 1771 (2007) 883-892.
- [58] D. Shida, T. Watanabe, J. Aoki, K. Hama, J. Kitayama, H. Sonoda, Y. Kishi, H. Yamaguchi, S. Sasaki, A. Sako, T. Konishi, H. Arai, and H. Nagawa, Aberrant expression of lysophosphatidic acid (LPA) receptors in human colorectal cancer, *Lab Invest* 84 (2004) 1352-1362.
- [59] J. Madsen, I. Tornoe, O. Nielsen, C. Koch, W. Steinhilber, and U. Holmskov, Expression and localization of lung surfactant protein A in human tissues, *Am J Respir Cell Mol Biol* 29 (2003) 591-597.
- [60] T. Ueno, S. Linder, and G. Elmberger, Aspartic proteinase napsin is a useful marker for diagnosis of primary lung adenocarcinoma, *Br J Cancer* 88 (2003) 1229-1233.

- [61] T. Hirano, Y. Gong, K. Yoshida, Y. Kato, K. Yashima, M. Maeda, A. Nakagawa, K. Fujioka, T. Ohira, N. Ikeda, Y. Ebihara, G. Auer, and H. Kato, Usefulness of TA02 (napsin A) to distinguish primary lung adenocarcinoma from metastatic lung adenocarcinoma, *Lung Cancer* 41 (2003) 155-162.
- [62] J. A. Bishop, R. Sharma, and P. B. Illei, Napsin A and thyroid transcription factor-1 expression in carcinomas of the lung, breast, pancreas, colon, kidney, thyroid, and malignant mesothelioma, *Hum Pathol* 41 (2010) 20-25.
- [63] D. R. Aberle, A. M. Adams, C. D. Berg, W. C. Black, J. D. Clapp, R. M. Fagerstrom, I. F. Gareen, C. Gatsonis, P. M. Marcus, and J. D. Sicks, Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening, *N Engl J Med* 365 (2011) 395-409.