

論文の内容の要旨

論文題目

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

氏名 関 泰宏

<背景・目的>

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く、多くの場合、数年以内に再発や転移が起こることが知られている。しかし、早期肺癌に限れば5年生存率は70%程度と高く、早期発見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。その中でも肺腺癌は最も頻度の高い組織型である。肺癌は組織型によりその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。これまで肺癌患者の血中タンパク質のプロテオミクス解析やマイクロアレイ解析等により肺癌マーカーの探索が行われているが、有用なバイオマーカーは発見されていない。そこで私は、carcinoembryonic antigen (CEA) 等、腫瘍マーカーのいくつかは初期発生前に発現し、成体では発現が消失あるいは大幅に減少するタンパク質であるという知見に基づき、従来と異なる手法によるバイオマーカーの探索を試みた。すなわち、モデル生物であるアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の肺発生初期の出芽肺領域で高発現している遺伝子の網羅的解析を基に新たなバイオマーカーの探索を行った。

アフリカツメガエルの初期発生で肺の発生が開始する Stage 43 の *X. laevis* を用いて出芽肺領域およびその他消化管領域を切り出し DNA マイクロアレイを行い、肺発生期に肺で発現する遺伝子を探索した。その結果、出芽肺領域で特異的に発現する遺伝子を 2187 種見出した。これら遺伝子をアフリカツメガエル-ヒト相同遺伝子変換ソフトウェアによってヒト遺伝子に変換し、さらにバイオインフォマティクス解析を行うことで肺の初期形成時に肺で特異的に発現する肺癌マーカー候補を特定した。さらに、上記候補から分泌性タンパク質をコードすることが推定される 39 種類を早期診断マーカー候補分子として選択した。さらに、タンパク質あるいは遺伝子発現データベース情報を基にスクリーニングを行った結果、肺腺癌で発現が特に高く、有望な新規診断マーカー因子候補として Lipase member H (LIPH) を見出した。

LIPH の肺癌における発現を検討するため、肺癌細胞株を用いて発現解析を行ったところ、*LIPH* mRNA は 9 株中 6 株の肺腺癌細胞株で高発現していたが、一方、肺扁平上皮癌細胞株では発現がほとんど確認されなかった。さらに ELISA およびウエスタンブロット解析を行ったところ、タンパク質レベルにおいても肺腺癌細胞株で高発現が観察され、LIPH が肺腺癌細胞株で特異的に発現することを見出した。続いて、肺癌臨床試料における LIPH の発現を定量 PCR、ELISA および免疫組織化学解析によって検討した。定量 PCR 解析では、LIPH は 19 例中 8 例の肺癌で発現が亢進していることが確認された。特に肺腺癌およびその亜型である bronchioloalveolar carcinoma (BAC) に限定すると、より高頻度に (12 例中 6 例) LIPH の発現亢進が観察された。さらに肺癌患者由来の血清を用いたサンドイッチ ELISA 法によって、LIPH の発現が早期、後期肺癌患者血清中で有意に上昇することを見出した。一方、臨床で最も広く用いられる腫瘍マーカーの一つである血清 CEA 値との間に相関は認められなかった。さらに免疫組織化学解析では、LIPH の肺腺癌および BAC における高頻度な発現が観察された (それぞれ 88.9%, 88.3%)。肺扁平上皮癌でも陽性所見は観察されたが腺癌と比較すると頻度は低く (76.6%)、小細胞肺癌においては明瞭な染色パターンを示さなかった。以上の結果から、LIPH は非小細胞肺癌、その中でも特に、肺腺癌および BAC の有望なバイオマーカーであることが示唆された。

次に、血清 LIPH 値と予後との関連について検討を行った。完全切除例を血中 ELISA 値 6.0 ng/ml 以上および未満の 2 群に分け、カプランマイヤー法により両群の無再発生存期間および前生存期間について比較を行った。その結果、無再発生存期間は有意差こそないものの、LIPH 高値群で予後が良い傾向を示した。さらに全生存期間においては、LIPH 高値群が有意に良好な予後を示した ($p < 0.05$)。以上の結果より、血清 LIPH 値は外科手術で除去可能な肺癌症例で有意に上昇しており、肺癌の早期発見に有用であると考えられた。血清 LIPH 値は血清 CEA 値と明確な相関がなく、これらマーカーを組み合わせることで陽性率が上昇することが期待される。さらに、血清 LIPH 値が 6.0 ng 以上の症例は 6.0 ng 未満の症例と比較して有意に予後が良好であった。血清 LIPH 値が高値症例で良好な予後を示した理由について

てさらに検討を行う必要があるが、今回われわれ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、治癒しうる肺癌症例の早期発見に有用であろうと期待される。

続いて、肺腺癌細胞株で *LIPH* のノックダウンや過剰発現を行うことにより、*LIPH* の肺癌における機能を検討した。*FLAG* タグ融合 *LIPH* を安定発現した肺腺癌細胞株 3 株で細胞増殖、遊走能を試験したが、*LIPH* 安定発現細胞とコントロール細胞の間に差は見られなかった。しかし、内在性 *LIPH* を高発現する ABC-1 細胞において *LIPH* をノックダウンすると細胞増殖が抑制されることを明らかにした。従って、*LIPH* が肺腺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。*LIPH* はホスファチジン酸を特異的に加水分解し、成長因子様活性を持つリゾホスファチジン酸 (Lysophosphatidic acid; LPA) を産生する酵素である。そこで私は、肺癌細胞の増殖を促進するメカニズムを解明するため、LPA 受容体介在シグナルの解析を行った。毛包細胞において *LIPH* の産生する LPA による活性化が報告される EGFR シグナルの検討をウエスタンブロットにより行ったが、*LIPH* の過剰発現、ノックダウンのいずれにおいてもシグナルの活性化は観察されなかった。また、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 シグナル分子の解析をウエスタンブロットにより行ったが、*LIPH* の過剰発現、ノックダウンによる MAPK, AKT のリン酸化状態の変化は観察されなかった。そこで、LPA 受容体の発現を RT-PCR により検討したところ、肺癌細胞株において *LIPH* と LPA 受容体遺伝子の発現に相関はなく、また、*LIPH* の過剰発現、ノックダウンによる LPA 受容体遺伝子の発現量変化も観察されなかった。以上の結果より、*LIPH* は肺癌細胞において LPA 受容体非依存的シグナルによって細胞増殖を促進していることが示唆された。

本研究では、*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。また、*LIPH* は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 *LIPH* 値が肺癌の予後予測マーカーとなり得ることを示した。さらに、*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も明らかにした。本研究で出芽肺領域特異的遺伝子として同定した Anterior gradient homolog 2 (AGR2) も、他の研究グループより肺腺癌の診断マーカーとして有用であることが報告されており、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。