

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 関 泰宏

本研究で論文提出者は、肺の腺癌で高発現する新規遺伝子 **LIPH** の機能解析を行い、これが肺癌マーカー、及び予後マーカーとして有用であることを示している。

肺癌は世界的にも死者数の多い癌の一つであり、予後が非常に悪く、多くの場合は数年以内に再発や転移が起こることが知られている。その一方、早期発見は肺癌による死亡を減少させることが分かっている。肺癌は組織型によっていくつかのサブタイプに分類され、その中で最も頻度が高い腺癌、扁平上皮癌は、合計で肺癌全体の約 75%を占める。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・マイクロアレイ解析など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。本研究では、いくつかの腫瘍マーカーの発現が初期発生期に一過的に増加した後減少し、癌化により再活性化することに着目し、従来と異なる手法によるバイオマーカーの探索を試みるとともに、それらの機能を明らかにするとともに、バイオマーカーとしての有用性について多角的に検討している。

論文提出者は、前半部において **LIPH** の肺癌における発現および機能解析を行っている。本研究において論文提出者はまず、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 DNA マイクロアレイ解析を行い、出芽肺領域で特異的に発現する遺伝子を 2187 種見出した。これらを更にバイオインフォマティクス解析を行うことで、肺の初期形成時に特異的に発現する分泌性タンパク質 39 種類を早期診断マーカー中間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)** を選定し、次に詳細な解析を行った。

まず、**LIPH** の肺癌における発現を検討するため、肺癌細胞株における **LIPH** の発現を RT-PCR、ELISA、ウエスタンブロット解析を行った。その結果、**LIPH** は mRNA、タンパク質双方と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していることを示した。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結果では、**LIPH** 遺伝子が 19 例中 8 例の肺癌で発現しており、特に肺腺癌およびその亜型である bronchioloalveolar carcinoma (BAC) においてより高頻度に発現が亢進すること、更には後期肺癌患者血清中で有意に **LIPH** の発現が上昇することを

見出した。一方、既知の肺癌マーカーの一つである CEA との間に相関は認められず、CEA 陰性であっても LIPH を高発現する症例を確認し、LIPH と CEA の組み合わせにより診断精度を向上できる可能性を示した。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。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、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。肺腺癌細胞株で LIPH を発現することによる細胞増殖・遊走能の変化は起こらなかったが、内在性 LIPH をノックダウンすることで細胞増殖が抑制されることを示した。また、肺癌細胞の増殖に寄与するメカニズムを解明するため、LPA 受容体介在シグナルにより活性化することが知られる EGFR, MAPK および AKT のリン酸化状態を調べ、これらはいずれも変化が起こらないことを示した。また、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、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に寄与することを示した。

論文提出者は後半部において、血清中の LIPH 発現量と予後との関連について検討を行っている。外科手術による完全切除例を対象に、血中 ELISA 発現量が 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。これら 2 群の間に無再発生存期間について有意差はないが、LIPH 高発現群で予後が良い傾向にあることを見出した。さらに全生存期間においては、術後化学療法の有無に関わらず LIPH 高発現群の予後が有意に良好であることを示した ($p<0.05$)。また、2 群の間に年齢、性別、喫煙歴および臨床病期に有意差がないことを示し、LIPH が外科手術後の予後予測マーカーとしても有用であることを示した。

以上のように、本研究で論文提出者はリパーゼの一つである 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。これらの結果は、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が新たな腫瘍マーカーを発見する上で有効な手法であることを示した点で重要であり、単なる医薬応用につながるだけでなく、発生生物学と癌生物学を繋ぐ重要な知見の一つとなる観点から非常に評価できる。よって、本審査委員は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいと認定する。