

氏名	塩澤 利博		
学位の種類	博士 (医学)		
学位記番号	博甲第 7843 号		
学位授与年月	平成 28 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	肺腺癌の間質に発現する DDAH2 の病理学的解析		
主査	筑波大学教授	博士 (医学)	関根 郁夫
副査	筑波大学准教授	博士 (薬学)	鈴木 裕之
副査	筑波大学准教授	博士 (医学)	吉川 宏
副査	筑波大学講師	博士 (医学)	村越 伸行

## 論文の内容の要旨

### (目的)

肺癌は診断時に既に進行した症例が多い予後不良な疾患であり、早期の診断が重要である。現在、胎児性蛋白は、肺癌を含む様々な癌腫において血清腫瘍マーカーとして用いられているが、肺癌の早期診断に有用な胎児性蛋白の報告はない。

本研究の目的は、1. 肺腺癌の早期診断に有用な胎児性蛋白を認識するモノクローナル抗体を探索すること、および2. 得られたモノクローナル抗体が認識している蛋白が肺腺癌の浸潤・進展にどのように関わっているかを検討することである。

### (対象と方法)

ブタ胎児の肺の凍結材料から抽出した蛋白を免疫原としてマウスの腹腔に注入し免疫した。脾臓を摘出してリンパ球を回収し、マウスミエローマ細胞と 5:1 の割合で融合してハイブリドーマを作製した。メチルセルロース HAT 選択培地で得られたコロニーを 1 つずつ回収し、1 コロニーを 1 クローンとして 96 ウェルプレートで培養し、モノクローナル抗体を作製した。スクリーニングにはブタの成体肺と胎児肺をのせた組織アレイと、ヒト肺腺癌および正常肺をのせた組織アレイの計 2 種類を作製し、肺腺癌組織に特異的に発現している胎児性蛋白を認識している抗体を産生するクローンの選別を行った。次にスクリーニングで得られたクローンの培養上清を一次抗体として肺腺癌手術標本 (n=133) の免疫組織化学染色を行い、その発現の特徴を臨床病理学的に検討することによって、有用なモノクローナル抗体を 1 つに絞り込んだ。

次に、得られたモノクローナル抗体が認識している蛋白の同定を目指して肺腺癌手術検体から抽出した蛋白を用いてウエスタンブロットを行い、抗体が認識している蛋白の分子量を調べた。この抗体を用いて免疫沈降法を行い、得られた対応抗原を含む蛋白を質量分析装置 LC-MS/MS によって解析した。

次に、この同定された蛋白が肺腺癌の病態にどのように関わっているかを明らかにするために、肺腺癌手術検体の免疫組織化学染色所見と *In situ hybridization* による mRNA 発現を調べ、さらに臨床データとの関連を検討した。

最後に、同定された蛋白が DDAH2 であったので、血管内皮細胞の管腔形成に対する DDAH2 の効果を調べるために血管内皮細胞株 (HUVEC) を用いた検討も行った。

#### (結果)

ブタ胎児肺に発現している蛋白質によって免疫されたマウスのリンパ球から作製されたハイブリドーマの 97 クローンの中で、ブタおよびヒト肺組織を用いたスクリーニングにて肺腺癌に特異的に陽性となったクローンは 11 クローンであった。これらの中で肺腺癌の間質に瀰漫性に陽性となる特徴的な抗体を産生するクローンを発見し、このクローンについての詳細な検討を行うこととした。

まずこの抗体が認識する抗原の分子量を測定するためにウエスタンブロットを行ったところ、30kDa 付近にバンドが認められた。さらに抗体を用いた免疫沈降法で得られた対応抗原を含む蛋白について LC-MS/MS を用いて解析したところ、この抗体が DDAH2 (Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 2) を認識していることが明らかとなった。

次に肺腺癌手術検体において、得られたモノクローナル抗体による染色状態と *in situ hybridization* による DDAH2 mRNA の発現を比較した。*In situ hybridization* では肺腺癌間質の線維芽細胞で DDAH2 mRNA の発現を認め、そのような細胞は得られたモノクローナル抗体で染色されたため、このモノクローナル抗体が認識している蛋白が DDAH2 であることが再度示された。免疫染色と組織形態の検討では、異型腺腫様過形成 (AAH) と比較して上皮内癌 (AIS) では陽性率が高くなり、さらに上皮内癌と比較して微少浸潤癌および浸潤性腺癌において有意に陽性率が高く、DDAH2 は進行した症例においてより陽性率が高くなることが明らかとなった。さらに術後の経過を追えた I 期の肺腺癌 61 例について、免疫染色での染色性の強弱によって強陽性群と弱陽性群の 2 群に分けて両群の無病生存率を比較したところ、DDAH2 強陽性群では弱陽性群と比較して有意に予後が不良であった。

次に、肺腺癌において DDAH2 は血管新生を介して腫瘍の浸潤に関与するとの仮説を立て、仮説に基づき DDAH2 が eNOS の発現や血管内皮細胞の分化や増殖に及ぼす影響を検討した。まず肺腺癌手術検体を用いた検討では、正常肺および上皮内癌と比べて浸潤性腺癌では DDAH2 の発現のみでなく eNOS の発現も有意に亢進していた。次に HUVEC を用いた検討では、DDAH2 の添加によって血管内皮細胞の増殖や管腔形成が対照群と比べて有意に促進していた。

#### (考察)

本研究では肺腺癌の診断に有用となる胎児性蛋白の探索を目的としてマウスモノクローナル抗体を作製し、この中で肺腺癌の間質に特異的に染色される抗 DDAH2 抗体を発見した。これまで DDAH2 は動脈硬化の予防因子として冠動脈疾患や慢性腎臓病、肺高血圧などとの関与が報告されてきたが、DDAH2 と肺腺癌との関連をのべた報告は本研究が初めてである。

得られた抗 DDAH2 抗体を用いて肺腺癌手術検体での免疫組織学的検討を行ったところ、DDAH2 が AAH や AIS などのいわゆる前浸潤性病変と比べて微少浸潤癌および浸潤性腺癌において有意に高い陽

性率を示し、さらに免疫染色における発現の程度により無病生存期間にも有意な差を認めていた。これらの結果からは DDAH2 は肺腺癌の間質に発現し、微少浸潤癌などの極めて早期の浸潤癌でも発現する性質をもった特徴的なバイオマーカーと考えられた。

また我々は DDAH2 が血管新生を介して肺腺癌の浸潤を促進するとの仮説の下に、肺腺癌手術検体を用いて DDAH2 および eNOS の発現を検討した。その結果、浸潤性腺癌において両者の発現が有意に亢進しており、また血管内皮細胞を用いて検討では DDAH2 の作用により血管内皮細胞の増殖や管腔形成が有意に亢進することが明らかになった。これらの結果より DDAH2 は肺腺癌において血管新生を介した浸潤機序に重要な役割を担っていると考えられた。

DDAH2 は動脈硬化性疾患に対しては疾患を予防する方向に作用する一方で肺腺癌においては腫瘍の浸潤に関与しており、DDAH2 の相反する機能が示唆される非常に興味深い結果であった。

以上より、DDAH2 は極めて初期の肺腺癌間質に発現し、癌の進行とともに発現が増えてくる特徴的な胎児性蛋白であり、DDAH2 による血管新生を介した肺腺癌の浸潤機序が存在している可能性が示唆された。

## 審査の結果の要旨

### (批評)

本研究は極めて独創性が高く野心的な内容であって、学術的に高く評価出来る。DDAH2 を上手く同定出来たのは運のよさもあるが、クローンのスクリーニング方法が十分に練られており、研究計画の質の高さによるところが大きいと考える。Cancer-associated fibroblast は近年注目を集めている研究領域であるが、現在までのところ DDAH2 との関係は全く指摘されていない。DDAH2 と癌の浸潤との関係はまだまだ不明なことが多く、今後の発展が期待出来る。また、本研究には直接触れられていないが、得られた 11 クローンの中には他にも興味のある染色パターンを示したものがあり、新たな研究領域の開発が期待出来る。

平成 28 年 1 月 7 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。