

筑波大学

博士（医学）学位論文

肺腺癌の間質に発現する DDAH2 の
病理学的解析

2015

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

塩澤 利博

略語一覽

IASLC: International Association of Lung Cancer

ATS: American Thoracic Society

ERS: European Respiratory Society

CEA: carcinoembryonic antigen

AFP: alpha fetoprotein

SOX2: SRY (Sex Determining Region Y)-Box 2

DDAH2: Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 2

ISH: in situ hybridization

DFS: Disease Free Survival

eNOS: endothelial Nitric Oxide synthase

NO: Nitric Oxide

ADMA: Asymmetric Dimethylarginine

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

HIF: Hypoxia Inducible Factor

TGF- β : Transforming Growth Factor- β

EMT: epithelial mesenchymal transition

略語一覧

1. 要旨	7
2. 緒言	9
3. 対象と方法	12
3.1 ブタ胎児肺の摘出と保存	
3.2 抗原タンパクの抽出と精製	
3.3 マウスモノクローナル抗体の作製	
3.4 モノクローナル抗体を用いたスクリーニング	
3.5 症例の選択	
3.6 ハイブリドーマ培養上清を用いた DDAH2 免疫染色と eNOS、CD31 免疫染色	
3.7 In situ hybridization	
3.8 ウェスタンブロット	
3.9 血管内皮細胞の培養とリコンビナントタンパク	
3.10 血管内皮細胞の増殖に関する検討	
3.11 血管内皮細胞の管腔形成の検討	
3.12 統計学的処理	

4. 結果	20
4.1 モノクローナル抗体でのスクリーニング	
4.2 DDAH2 の同定	
4.3 肺腺癌手術検体を用いた免疫組織学的検討	
4.4 In situ hybridization	
4.5 DDAH2 の発現と予後との関連	
4.6 肺腺癌の間質における DDAH2 の機能	
4.7 正常肺、上皮内癌、浸潤性腺癌にける DDAH2 と eNOS の発現	
4.8 DDAH2 と血管内皮細胞の増殖	
4.9 DDAH2 と血管内皮細胞の管腔形成	
5. 考察	26
5.1 肺腺癌の診断に有用な胎児性蛋白の探索	
5.2 免疫染色を用いた肺腺癌における DDAH2 の発現	
5.3 肺腺癌の浸潤における DDAH2 の機能解析	
5.4 肺腺癌における新規の血管新生因子としての DDAH2	
5.5 本研究における課題と今後の展望	

6. 総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 32

7. 謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 33

8. 参考文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 34

9. 図・表

1. 要旨

1.1 緒言

肺癌は診断時に既に進行した症例が多い予後不良な悪性腫瘍である。肺癌を含む様々な癌腫において胎児性蛋白は腫瘍マーカーとして免疫組織学的に用いられているが、早期の癌の診断に有用な胎児性蛋白はごく少数しかない。今回の検討では初期の肺腺癌に焦点を置いて、肺腺癌を早期に検出する胎児性蛋白の探索を目的にブタ胎児肺を免疫原としたマウスモノクローナル抗体の作製を行った。

1.2 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免疫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よりなる組織アレイと、ヒト肺腺癌および正常肺よりなる組織アレイの計2種類の組織アレイを作製し肺腺癌に特異的に反応する抗体を産生するクローンの選別を行った。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)での免疫染色を行い、その発現の特徴を臨床病理学的に検討した。

1.3 結果

得られた 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で肺腺癌に陽性となったクローンは 11 クローンであった。この中でも肺腺癌の間質に瀰漫性に陽性となる特徴的な抗体クローンが 1 つ認められた。LC-MS/MS 解析によってこの抗体が DDAH2 (Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 2)を認識していることを明らかにした。*In situ hybridization* では DDAH2 は肺腺癌間質の線維芽細胞に発現しており、また免疫染色では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、また染色性の強弱により術後の無病生存率にも有意差を認めていた。

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に基づき DDAH2 が eNOS の発現や血管内皮細胞の分化、増殖に及ぼす影響を検討した。DDAH2 と同様に浸潤性腺癌では eNOS の発現も有意に亢進しており、血管内皮細胞株(HUVEC)を用いた検討では、DDAH2 により血管内皮細胞の増殖や管腔形成が有意に促進されることを明らかにした。

1.4 結論

本検討の結果から、DDAH2 は極めて初期の肺腺癌間質に発現する特徴的な予後因子であり、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。

2. 緒言

肺癌は世界におけるがん死亡の主たる要因である。多くの肺癌症例では診断時に既に進行した病期であることが多く、完全治癒が難しく予後も不良である。肺癌は非小細胞肺癌および小細胞肺癌に分類され、前者はさらに腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌などに分類される。これらの中でも腺癌は日本や米国、欧州などで最も頻度の高い組織型であり、日本においては肺癌の70%近くが腺癌であり年々増加している[1, 2]。

近年、IASLC/ATS/ERSにより新たな肺腺癌の組織分類が提唱された(表1)[3]。この新分類ではいくつかの新しい概念が盛り込まれている。そのひとつは上皮内癌(adenocarcinoma in situ: AIS)の概念である。AISでは既存の肺胞構造を置換するように腫瘍細胞が増殖し(lepidic growth pattern)、浸潤病変を含まないものとされている。これは野口分類のtype AおよびBに相当し、術後の5年生存率も100%という極めて予後良好な組織型である[4]。もうひとつは微少浸潤癌(minimally invasive adenocarcinoma: MIA)という概念である。MIAは径3cm以下でlepidic growthが殆どを占め、浸潤部の大きさは5mmを超えない腫瘍と定義される。すなわち純粋な浸潤癌に比べるとlepidic growthの占める割合が高い、いわば上皮内癌と浸潤癌の中間に位置づけられるものである。MIAもAISと同様に術後5年生存率はほぼ100%と予後は非常に良好な腫瘍と定義されている。今回の新しい分類では肺腺癌がAISからMIAを経て浸潤癌へと段階的に進展していく、いわゆるstep-wise progressionの概念を取り入れたと言える(図1)[5]。とりわけ新たに組み入れられたAIS

やMIAはCTでのスクリーニングなどで偶発的に発見されることが多く、臨床転機のみでなく生物学的特徴も純粋な浸潤癌とは異なると考えられている。従ってAIS、MIAと浸潤性腺癌の生物学的な差異を検証することは、肺腺癌の悪性化への進展機序を解明する手掛かりになると考えられている。

肺腺癌を含む様々な癌腫の診断において、腫瘍マーカーが免疫組織学的に用いられることがある。これらのマーカーの中でCEAやAFP、SOX2などは胎児性蛋白といわれる[6-8]。正常の成体では発現することのない胎児性蛋白が癌化することによって高発現することがあり、この現象をもとにして胎児性蛋白はがんの診断に用いられている。しかし早期診断あるいはスクリーニングに利用されている腫瘍マーカーは、前立腺癌のprostate specific antigen(PSA)や神経芽細胞腫のvanillyl mandelic acid(VMA)、homovanilic acid(HVA)などを除くとほとんどない上に、これまで胎児性蛋白を網羅的に検索する試みは殆ど行われてこなかった。胎児性蛋白の探索においてはヒト胎児の蛋白を用いる事は倫理的観点から許容されず、それゆえ癌胎児性蛋白の研究は困難と考えられていた。しかし、ミニブタの場合ヒトとのmRNAの相動性が80%以上もある上に、ヒト蛋白に対するポリクローナル抗体のほぼ100%がブタ蛋白とも反応することが知られており、ヒトとブタの間には発現蛋白にかなりの相同性があると考えられる。従って、ブタ胎児を用いてブタの胎児性蛋白に対するモノクローナル抗体を網羅的に作製すれば、その中にヒトの腫瘍にも反応する抗体が含まれている可能性が十分にある。さらに得られた抗体の中で肺腺癌の初期病変でも発

現する胎児性蛋白が存在すれば、肺腺癌をより早期の段階で診断でき早期の治療介入も可能になると考えられる。

そこで本研究では肺腺癌の診断に有用な胎児性蛋白の探索を目的として、ブタ胎児肺から抽出した蛋白を免疫原としてマウスモノクローナル抗体を作製し、それらの中で肺腺癌組織に特異的に発現している胎児性蛋白を網羅的に探索した。さらに得られた胎児性蛋白が肺腺癌の浸潤においてどのような役割を担っているのかを検討した。

3. 対象と方法

3.1 ブタ胎児肺の摘出と保存

7 週齢と 13 週齢のミニブタ胎児（鹿児島県ジャパンファームクラウン研究所）の肺を摘出し OCT コンパウンド（Sakura Finetek Japan Co. Ltd. Tokyo）に包埋し、アセトンドライアイスで凍結後-80℃で保存した。ブタ成体肺（茨城協同食肉株式会社、茨城）は 1 cm×1 cm 片で 2 mm 厚に細切りし、同様に凍結保存した。

3.2 抗原タンパクの抽出と精製

凍結材料である 7 週齢のブタ胎児肺 2.0 mg と、13 週齢のブタ胎児肺 7.5 mg に T-PER Tissue Protein Extraction Reagent(PIERCE, Rockford, IL)10 ml、Protease inhibitor cocktail(Sigma-Aldrich Co.) 10 μ l を加え、ポリトロンホモジナイザー(KINEMATICA AG, Lucerne, CH)で砕いて蛋白を抽出した。得られた蛋白溶液を遠心 (10,000 rpm, 4℃ 5 分) し上清を回収した。これに 4 倍量の冷アセトンを加え、-80℃で 1 時間静置し蛋白質を沈殿させた後、再び遠心 (10,000 G, 4℃ 5 分) し、沈殿した蛋白質を PBS(phosphate buffer saline, pH 7.5)に溶解させ免疫原とした。免疫原の蛋白量は、BCA Protein Assay Reagent Kit(PIERCE)を用いて定量した。

3.3 マウスモノクローナル抗体の作製

BALB/c 雌マウス (CLEA Japan Inc. Osaka) 4 週齢を購入し、1 週間環境に順応させた。免疫原 50 mg(500 μ l) を、5 週齢の時点でマウスの腹腔内に注入しに免疫した。2 週間後に免疫原 15 mg(150 μ l) を同様に免疫した。さらに 2 週間後、3 回目の免疫を 2 回目と同様に行った。1 週間後に抗体価の判定を行った。

マウス由来のミエローマ細胞 (Sp2/0) は筑波大学大学院人間総合科学研究科、免疫学グループ (渋谷彰教授) から供与して頂いた。DMEM 培地(Sigma-Aldrich St. Louis, MO)500 ml に 10% 非動化ウシ胎児血清を添加し、Sodium Pyruvate, HEPES, NEAA, PSG(Sigma-Aldrich)を各 5 ml、2メルカプトエタノール(Sigma-Aldrich)を PBS で 100 倍希釈したものを 150 μ l 添加して、フラスコ中で、37°C・10%CO₂ インキュベータ内で培養した。

抗体価判定による抗体産生の確認を行った翌日、最終免疫として免疫原 15 mg(150 μ l) をマウスの腹腔に免疫した。3 日後、免疫したマウスから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 PEG(Sigma-Aldrich)を用いて融合させた。DMEM に HT Media Supplement (50 \times) Hybri-Max(Sigma-Aldrich)を添加した HT 培地で一晩培養し、翌日からメチルセルロース HAT 選択培地である Clona Cell®-HY medium D(Stemcell Technologies Inc, Vancouver, BC, Canada)で 10 日から 15 日間培養し、ハイブリドーマを選別した。ハイブリドーマは軟寒天培地であるメチルセルロース HAT 選択培地

ではコロニーを形成するため、1つのコロニーを1クローンとして、1コロニーずつ回収し96 ウェルプレート(CORNING, Lowell, MA)に移して、ハイブリドーマ増殖培地の Clona Cell®-HY medium E(Stemcell Technologies Inc.)で 37°C・10%CO₂ インキュベータ内で培養した。実験の概要を図2に示す。

3.4 モノクローナル抗体を用いたスクリーニング

3.4.1 一次スクリーニング

一次スクリーニングでは、7週齢のブタ胎児肺とブタ成体肺に対する染色性を評価した。免疫染色は脱パラフィン後、10 mMクエン酸バッファー、pH 6.0中でオートクレーブ(121°C、15分)して抗原賦活化処理を施し、ハイブリドーマの培養上清 100 μlを抗体として用いた。続いて二次抗体(EnVision kit: Dako)を室温、30分間で反応させた。発色には Diaminobenzidine substrare solution (DAB液)を使用し、免疫染色後 hematoxylin で核染色し、水洗、脱水を施し封入した。

3.4.2 二次スクリーニング

二次スクリーニングでは、早期発見に役立つために高分化な肺腺癌である *lepidic growth* を含む症例を6例、肺正常組織1例を用いたホルマリン固定パラフィン包埋ヒト組織アレイブロックを使用した。免疫染色のプロトコールは一次スクリーニングと同様に行った。

3.5. 症例の選択

2002 年から 2013 年にかけて筑波大学附属病院呼吸器外科で手術が行われ組織学的に腺癌と診断された 133 例を対象とした。全症例で術前にインフォームドコンセントが行われ包括同意を得た。肺腺癌の組織分類は WHO 分類第 4 版に基づき、病期は UICC TNM 分類第 7 版に従った[9]。各患者の臨床情報は診療録を参照した。133 例の臨床病理学的背景を表 2 に示す。

3.6 ハイブリドーマ培養上清を用いた DDAH2 免疫染色と eNOS、CD31 免疫染色

10%ホルマリン固定パラフィン包埋標本より 3 μ m の切片を作製した、キシレンおよびアルコールにて脱パラフィンを行った後、内因性ペルオキシダーゼのブロックは 10%過酸化水素水を用いて室温にて遮光下で 30 分間反応させた。抗原の賦活化は pH6.0 のクエン酸液を用いて 121°C、15 分のオートクレーブを行った。DDAH2 を検出する培養上清を一次抗体として用いて室温、60 分の条件で反応させた後、二次抗体(EnVision kit: Dako Tokyo Japan)を用いて室温、30 分間で反応させた。可視化は DAB 液を用い、核染は hematoxylin で行い、水洗、脱水を行い封入した。また eNOS と CD31 の免疫染色については、それぞれ市販の一次抗体（抗 eNOS 抗体：ab5589, abcam, Cambridge, UK, 1 : 75 希釈で使用、抗 CD31 抗体：ab28364, abcam、1 : 125 希釈で使用）を用いた。両者の免疫染色も DDAH2

免疫染色と同じプロトコールで施行した。

DDAH2 は血管内皮に恒常的に発現していることが知られているため、免疫染色の評価においては正常血管内皮をコントロールとして用いた。腫瘍において内因コントロールと比較して同等もしくは強い染色性を示す領域が認められた場合を陽性と判断した。さらに陽性症例においては、対物 40 倍で 10 視野評価してコントロールよりも強い領域が 30%（3 視野）以上認められた場合を強陽性、30%未満であった場合を弱陽性と定義した。

3.7 *In situ* hybridization

最初に Primer 3 および GeneBank データベース(NM013974.1)のウェブサイトを利用して T7 プロモータープライマーのデザインを行った。詳細を下記に示す。

Forward, 5'-CTTAATACGACTCACTATAGGGGCTGCTAGAACTGCCACCTGAG-3'

Reverse, 5'-CTTAATACGACTCACTATAGGGGGCTTTGCGGACTCCATCG-3'

このプライマーを用いて RT-PCR 法にて DDAH2 mRNA の増幅を行った後に DIG RNA Labeling Kit を用いてハイブリダイゼーションのための 186 塩基対の cRNA プローブを製作した。

ハイブリダイゼーションはセンスもしくはアンチセンスプローブを 0.6 μ g/ml の濃度で混ぜた DAKO mRNA *in situ* hybridization Solution を用いて 50°C、16 時間で反応させた。

その後ウサギ抗 DIG 抗体 (Dako)で反応させ、シグナル増幅には GenPoint™ Tyramide

Signal Amplification System (Dako)を用いた。シグナルの検出は DAB 液を用いて免疫組織学的な反応で検出した。

3.8 ウェスタンブロット

手術的に切除された肺検体からのタンパクの抽出は T-PER (Pierce)を用いて行った。

DDAH2 のウェスタンブロットでは、まず 95°C、5 分間の熱変性を施行した後に SDS-PAGE を施行し、Life Technology 社(Tokyo, Japan)の iBlot™ Gel Transfer System を用いて PVDF 膜へ転写した。続いて Superblock in TBS (Thermo Scientific, Rockford, IL)を用いて室温 1 時間でブロッキングを施行した後、得られた抗 DDAH2 抗体を 2 μ g/ml の濃度に希釈し一次抗体として用いた。一次抗体は 4°C、overnight の反応を行った。続く二次抗体反応は HRP-conjugated anti-mouse Igs (Thermo Scientific)を用いて室温で 1 時間の反応を行った。

検出液は Supersignal West Dura (Thermo Scientific)を用いてエックス線フィルムに感光した。 eNOS のウェスタンブロットにおいては、ブロッキングまでの行程は上記と同じで行った。一次抗体は abcam 社の抗 eNOS 抗体(ab5589)を 1 : 1000 希釈で用いて 4°C overnight で反応させた。二次抗体反応は DDAH2 と同じで条件で行い、検出液は Supersignal West Femto (Thermo Scientific)を用いてエックス線フィルムに感光した。得られたバンドの定量解析は画像解析ソフト Image J (<http://imagej.en.softonic.com/>)を用いて行った。

3.9 血管内皮細胞の培養とリコンビナントタンパク

HUVEC はヒト臍帯静脈から単離され樹立された血管内皮細胞株である。10%非動化ウシ胎児血清を添加した Ham's F-12K Medium (Life Technologies)を使用し、コラーゲンコート 6 ウェルプレートを用いて 37°C・5%CO₂ インキュベータ内で培養した。DDAH2 の機能解析に用いた DDAH2 リコンビナントタンパクは Abnova 社(No. H00023564-P01 Taiwan)から購入し、使用時まで-80°Cで冷凍保存していた。

3.10 血管内皮細胞の増殖に関する検討

血管内皮細胞の増殖に DDAH2 が及ぼす影響を検討するため、HUVEC をコラーゲンコート 24 ウェルプレートに 1×10^4 /ウェルずつ播種した。24 時間培養した後に培地を交換し、培養細胞には種々の濃度 (0.05, 0.10, 0.20, 0.50 μ g/ml) の DDAH2 リコンビナントタンパクを添加し、37°C5%CO₂ 条件にて 48 時間培養した。対照群では PBS を添加した。細胞の増殖はトリパンブルーを用いて細胞数を数えた。

3.11 血管内皮細胞の管腔形成の検討

血管内皮細胞の管腔形成能の評価は Geltrex™(Life Technology)を用いて、製品プロトコールに従って行った。具体的には 24 ウェルプレートの表面に 1 ウェルあたり 100 μ l の Geltrex™を添加し、37°C 5%CO₂ インキュベータに 30 分間留置し、Geltrex が固まったの

を確認した。続いて HUVEC を Geltrex™でコーティングされたプレート上に 1 ウェルあたり 5×10^4 個の細胞を播種した。その後 DDAH2 リコンビナントタンパク、対照群では PBS を添加し 37°C、5% CO₂ インキュベータ内で 6 時間培養した。管腔形成の評価は管腔系の中央値で評価した。

3.12 統計学的処理

統計学的解析は JMP9 を用いて行った。群間の統計比較は ANOVA 法および student t 検定にて行った。DDAH2 発現と無病生存期間(DFS)との関連はログランク検定を用いて生存解析を行った。DFS は手術を行った日付を起算日とし、イベントは再発もしくは死亡、打ち切りは再発なく最終の生存確認日と定義し、統計学的有意差は p 値が 0.05 未満とした。

4. 結果

4.1. モノクローナル抗体でのスクリーニング

ヒト胎児と遺伝子の相同性が高いブタ胎児肺を用いて、胎児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免疫し、モノクローナル抗体を多数作製した。スクリーニングのために、ブタの成体肺と胎児肺をのせた組織アレイと、ヒトの肺腺癌6例と正常肺をのせた組織アレイの計2種類の組織アレイを作製し、腫瘍に特異的に反応する抗体を生ずるクローンの選別を行った。

得られた97クローンについては、ハイブリドーマの培養上清を一次抗体として用いて免疫組織学的なスクリーニングを行った。スクリーニングは2段階に分けて行った。一次スクリーニングでは胎児性蛋白を選別することを目的に行い、ブタ胎児肺に陽性となり成体ブタでは陰性となるクローンを選別した。その結果、一次スクリーニングでは39クローンに絞られた。続く二次スクリーニングはヒト正常肺および肺腺癌の組織アレイを用いて行い、正常肺では陰性となり肺腺癌で陽性となるクローンを選び、11クローンが選別された。これらの2段階のスクリーニングにより得られた11クローンについてはその染色性から大きく3つのパターンに分類された。詳細を下記に示す。

パターン① (図3) : 肺腺癌において腫瘍細胞の細胞質に染色された一方、正常肺には染色されなかったもの。(6クローン)

パターン②（図4）：肺腺癌においては腫瘍細胞の細胞質に染色性を示し、正常肺においては一部のⅡ型肺胞上皮の核に陽性像を示したもの。（4クローン）

パターン③（図5）：肺腺癌においては間質にのみ陽性像を示し、正常肺では静脈壁に陽性を示すが肺胞部分は陰性であったもの。（1クローン）

これらの中で3つ目のパターンを示したクローンはその染色性が特徴的であった上に、肺腺癌細胞株では陰性であることから癌の間質にだけ特異的に陽性を示すことが確認できた（図6）。このような特徴的な染色性に注目し、我々はパターン③のクローンを用いてさらなる解析を行う方針とした。

4.2. DDAH2の同定

スクリーニングで得られた抗体がどのような蛋白を認識するものかを調べるためにウエスタンブロットを行い抗体が認識する抗原の分子量を調べた。図7に示すように、この抗体は肺腺癌細胞株（Calu-3）ではバンドを認めなかった一方で、肺腺癌組織から抽出したタンパクに対しては30kDa付近にバンドを認めた。続いてこの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をLC-MS/MSにて解析したところ、この抗体は Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 (DDAH2)を認識していることが明らかとなった。

4.3 肺腺癌手術検体を用いた免疫組織学的検討

筑波大学附属病院で外科的切除が行われた133例の手術検体を用いて、得られた抗DDAH2抗体を用いて免疫組織学的検討を行った。染色像を図8に示す。このようにDDAH2は肺腺癌の間質に広範囲に染色される一方で、腫瘍細胞には染色されなかった。この所見は各組織亜型で共通して認められていた(図9)。組織亜型毎の陽性率を表3に示す。興味深いことに異型腺腫様過形成(atypical adenomatous hyperplasia: AAH)やAISでは陽性例が50%程度であったのに対して、微少浸潤癌および浸潤性腺癌ではほぼ全例で陽性となり、両者の陽性率に有意な差を認めていた。肺腺癌においてDDAH2は腫瘍の進行に伴い発現が亢進していく傾向が明らかになった。

4.4 *In situ* hybridization

免疫染色によってDDAH2が肺腺癌の間質にびまん性に染色されることが明らかとなった。次にDDAH2を分泌する細胞が何かを明らかにするために*in situ* hybridizationを行ったところ、図10に示すように間質の線維芽細胞にDDAH2 mRNAの発現を認めた。

4.5 DDAH2の発現と予後との関連

次にDDAH2の発現と術後経過との間にどのような関連があるのかを検討した。全133例の中で術後の経過を追えたI期の61例を抽出した。これらを前述のような定義に基づき強

陽性群、弱陽性群の2群に分けた（図 1 1 a-b）。DDAH2強陽性群は26例、弱陽性群は35例に分けられた。両群の無病生存期間(DFS: Disease Free Survival)を解析し予後を比較したところ、両群の無病生存率は統計学的有意差を持って、DDAH2強陽性群の方が不良であった（図 1 1 c, $p=0.026$ ）。

4.6 肺腺癌の間質におけるDDAH2の機能

これまでの結果からDDAH2は肺腺癌の間質に特異的に発現し、予後とも相関するバイオマーカーである可能性が示唆された。次に我々はDDAH2が肺腺癌の間質でどのような役割を担っているのかを明らかにするための検討を行った。機能解析を行うに際して、過去の文献報告などに基づき以下のような仮説を立てた[10, 11]。

仮説：DDAH2は血管新生を介して肺腺癌の浸潤を促進する。

具体的な機序を図 1 2 に示した。一般に血管内皮細胞において血管内皮型NO合成酵素（eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase）の作用により一酸化窒素（NO : Nitric Oxide）が産生されると、血管内皮細胞の増殖や分化が亢進し血管新生が促進されることが知られている[12, 13]。そこで肺腺癌においてもDDAH2の作用によって、この経路による血管新生機序が存在していると考えた。すなわちDDAH2による血管新生機序が存在しているのであれば、DDAH2によってeNOSの発現が亢進し、それに引き続く血管内皮細胞の増殖や管腔形成が亢進している可能性を考えた。

4.7 正常肺、上皮内癌、浸潤性腺癌におけるDDAH2とeNOSの発現

仮説に基づいて、まず正常肺、上皮内癌、浸潤性腺癌におけるDDAH2とeNOSの発現をウエスタンブロットで比較した。正常肺1例、上皮内癌1例、浸潤性腺癌5例の手術検体から抽出したタンパクを用いてウエスタンブロットを施行した。DDAH2の発現については正常肺と上皮内癌との間に有意差は認めなかったが、浸潤性腺癌では正常肺と比較して有意に高い発現を認めていた ($p < 0.01$)。一方eNOSの発現も同様に、正常肺と上皮内癌との間で有意な差は認めなかったものの、浸潤性腺癌では正常肺と比較してeNOSの発現は有意に亢進していた ($p < 0.01$)。浸潤性腺癌ではDDAH2およびeNOSの発現が有意に亢進しており、浸潤性腺癌においてDDAH2-NO系が亢進していることが示唆された (図13)。ウエスタンブロットで得られた発現の差を確かめるため、正常肺5例、上皮内癌5例、浸潤性腺癌10例の計20例の手術標本について同じ抗体を用いてeNOSの免疫染色も施行した。興味深いことにeNOSは腫瘍間質の血管内皮に強い染色性を示した一方で、正常肺および上皮内癌の血管内皮には陰性もしくは微弱な染色性を認めるのみであった (図14)。これらの結果から浸潤性腺癌ではDDAH2によるeNOSの産生が正常肺やAISと比較して有意に亢進していることが強く示唆された。

4.8 DDAH2と血管内皮細胞の増殖

続いて血管内皮細胞の増殖にDDAH2が与える効果を検証した。具体的には血管内皮細胞株(HUVEC)にDDAH2リコンビナントタンパクを種々の濃度添加した48時間後の細胞数増加を評価した。この結果、DDAH2の作用により濃度依存的にHUVECの細胞増加が亢進していた(図15)。

4.9 DDAH2と血管内皮細胞の管腔形成

血管内皮細胞の増殖、遊走と共に血管内皮細胞による管腔形成も血管新生において見られる重要な現象である。血管内皮細胞の管腔形成能に対してDDAH2が及ぼす影響を検討した。図16に示すようにDDAH2をHUVECに添加したところ、管腔形成は対照群(PBS)と比較して有意に亢進していた。

5. 考察

5.1 肺腺癌の診断に有用な胎児性蛋白の探索

本研究では肺腺癌の診断に有用な胎児性蛋白の探索を目的に、ブタ胎児肺を免疫原としたマウスモノクローナル抗体の作製を行った。この中で肺腺癌の間質に陽性となる抗体を発見し、この抗体がDDAH2を認識していることを明らかにした。さらに免疫染色の結果よりDDAH2は極めて早期の浸潤癌を検出できるバイオマーカーであり、また*in vitro*の解析によってDDAH2が血管新生を介して肺腺癌の浸潤を促すことが明らかになった。

DDAH2は、ヒトの胎児肺や胎児腎に発現している胎児性蛋白のひとつである[14]。胎児低形成肺においては血管内皮におけるeNOSの発現が有意に低下していることが報告されており、胎児肺における血管新生においてDDAH2-eNOS系が重要な役割を担っている可能性が示唆されている[15]。一方で成人においてDDAH2は内因性のeNOS阻害物質であるADMA (Asymmetric dimethylarginine) をMethylarginineとL-citrullinに分解する作用がある。eNOSによって合成されるNOは血管拡張および血管新生作用を有しているので、DDAH2にはNOを介して抗動脈硬化、血管新生を促進すると考えられている。これまでのところ肺高血圧症や慢性腎臓病、虚血性心疾患などでDDAH2の発現低下ないしは機能不全が報告されてきたが[16-20]、DDAH2と肺癌との関連はこれまで殆ど着目されておらず、我々の知る限りでは本研究は肺腺癌とDDAH2との関連を述べた最初の報告である。

5.2 免疫染色を用いた肺腺癌におけるDDAH2の発現

我々は肺腺癌手術検体を用いてDDAH2の発現を免疫組織学的に検討した。この中でいくつかの興味深い結果を得ることができた。ひとつはDDAH2がAAHやAISなどのいわゆる前浸潤性病変では約半数しか陽性にならなかったのに対し、MIAおよび浸潤性腺癌ではほぼ全例が陽性となっており陽性率に有意な差を認めていた点である。多くの肺腺癌はAAH、AISなどの前浸潤病変からMIAを経て予後不良な浸潤性腺癌へと段階的に進展していく、いわゆるstepwise-progressionの進展形式をとると考えられている（図1）。したがって今回の免疫染色結果からはDDAH2が肺腺癌の進展において、とくにMIAのような極めて早期の浸潤過程において重要な役割を担っている可能性が示唆された。さらに我々は免疫染色の染色性によりDDAH2強陽性群および弱陽性群の2群に分けて予後解析を行った。その結果、DDAH2強陽性群では弱陽性群よりも有意に無病生存期間が劣っていた。これらの結果からはDDAH2は肺腺癌の新規の予後因子であり、さらにMIAのような初期の浸潤機序に関わる可能性を持つ分子であることが示唆された。

5.3 肺腺癌の浸潤におけるDDAH2の機能解析

続いて我々は肺腺癌の間質に発現しているDDAH2がその浸潤機序においてどのような役割を担っているのかを検討した。前述のようにDDAH2にはNOを介して血管拡張や血管

保護作用を有する、いわゆる抗動脈硬化因子としての機能が知られている。一方でDDAHと悪性腫瘍との関連についての報告は少数であった。Kostourou Vらは神経膠腫においてDDAHが腫瘍内血管新生を促進している可能性を述べている[10]。またVanella Lらは前立腺癌においてDDAH2による血管新生機序の存在を報告している[11]。いずれの報告もDDAHが腫瘍内の血管新生を促進させる機序を報告しており、これらの報告を踏まえ我々はDDAH2が肺腺癌の間質においても血管新生を介して腫瘍の浸潤に寄与しているとの仮説を立てた。具体的には、悪性間質由来のDDAH2が血管内皮細胞に作用しNOの産生が亢進し、それに引き続いて血管内皮細胞の分化や増殖が促進され血管新生を生じるという機序である。この仮説を証明するために、最初に肺腺癌組織検体を用いてDDAH2とeNOSの発現をウエスタンブロットおよび免疫染色にて解析した。その結果正常肺およびAISと比較して浸潤性腺癌においてDDAH2およびeNOSの両者の発現が有意に亢進している事を明らかにした。この結果は浸潤性腺癌においてDDAH2-NO系が亢進している可能性を示していた。続いて血管内皮細胞株(HUVEC)を用いて、DDAH2が血管内皮細胞の分化や増殖に及ぼす影響を検証した。DDAH2をHUVECに添加し48時間後の細胞増加を検討したところ、濃度依存的にDDAH2添加により血管内皮細胞の増殖が亢進していた。さらにDDAH2がHUVECの管腔形成に及ぼす影響を評価したところ、DDAH2の添加によって管腔形成も有意に亢進することが明らかになった。これらの結果からは、肺腺癌においてもDDAH2によってNOを介した血管新生が亢進していると考えられた。動脈硬化性疾患においては病態に

対して予防的に作用している一方で、今回の結果から肺腺癌においては血管新生を介して腫瘍の進展に促進的に作用するという、DDAH2の相反した機能を示す結果であり非常に興味深いといえる。

5.4 肺腺癌における新規の血管新生因子としてのDDAH2

肺腺癌における血管新生因子としては血管内皮細胞増殖因子 (VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor) が広く知られている。抗VEGFモノクローナル抗体である Bevacizumab (アバスチン®) は扁平上皮癌を除く非小細胞肺癌に適応され、従来の殺細胞性抗癌剤との併用にて奏効率や生存期間の延長をもたらすことが示されている[21-23]。しかし抗VEGF抗体を併用した治療にも効果に限界があり、この点からはVEGFを阻害するのみでは肺癌の血管新生を十分に制御できていないと考えられる。

既知の血管新生因子であるVEGFと本研究で血管新生作用が明らかになったDDAH2について、肺腺癌の血管新生における両分子の関連はこれまでのところ知られていない。腫瘍内血管新生において、VEGFもまたPIK3/Akt経路を介してNO発現を促すと考えられている[24, 25]。さらに、腫瘍以外の領域においてはVEGFの調節因子としてのDDAH2の役割が報告されている。長谷川らはDDAH2がSp1を介してVEGF発現を亢進させたと報告している[26]。Xiaoらは血管内細胞株において、DDAH2のRNA干渉によりVEGF mRNA発現が有意に低下したと報告している[27]。これらの点からは間質由来のDDAH2が血管内皮細

胞に対してeNOS阻害からの解放という直接的な作用、さらには腫瘍細胞に対してはVEGF発現を促進させるという2つの血管新生効果を有しているのかも知れない。今後、DDAH2を標的とした治療法は従来の血管新生阻害とは異なる切り口によって腫瘍の血管新生を制御するという新しい治療法となる可能性がある。

5.5. 本研究における課題と今後の展望

今回の検討から我々は肺腺癌においてDDAH2による血管新生機序が存在することを示したものの、なぜ悪性間質においてDDAH2が誘導されるのかは明らかになっていない。悪性間質は低酸素状態に特徴づけられる極めて異常な環境である。この低酸素は固形腫瘍における特徴的所見のひとつであり、腫瘍の進行や化学療法抵抗性に関与すると言われており[28, 29]。また低酸素に起因する伝達経路は腫瘍血管新生に関与するとの報告も数多くみられる[30, 31]。低酸素に反応する転写因子の中で、低酸素誘導因子(HIF: Hypoxia Inducible Factor)は腫瘍の血管新生や浸潤、転移に重要な役割を担っている。HIFはVEGFやANG-2などの下流の因子を活性化することにより、血管新生を促進すると考えられている[32, 33]。低酸素とDDAH2との関連はいまだに不十分であるが、HIFがDDAH2を調節しているのかも知れない。一方で、肺線維症においてPullamsettiらは線維化前駆物質であるTGF- β 1がDDAH2の発現を亢進させていることを証明している[34]。TGF- β 1は腫瘍の進行における重要な因子のひとつであり、とりわけ上皮間葉転換 (EMT: Epithelial

Mesenchymal Transition) の形成に関わる重要な因子として知られている[35]。またTGF- β 1自身が腫瘍内の血管新生を促進するという報告も複数認められる[36, 37]。これらの分子がDDAH2を調整する候補分子であり、今後はDDAH2を誘導する機序について明らかにしていく必要がある。

また本研究では肺腺癌の間質にのみ陽性となるという特徴的な染色像に着目し、このクローンに焦点を置いて検討を進めていった。しかし、一方で図③および図④のような染色像を示したクローンの中にも抗DDAH2抗体と同じく肺腺癌の早期診断に有用となるクローンが存在する可能性もある。本検討のスクリーニングで得られた他のクローンについての詳細な検討も今後進めていく方針である。

6. 総括

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に、ブタ胎児肺を免疫原としたマウスモノクローナル抗体を作製した。得られた抗体の中で肺腺癌の間質に特異的に染色される抗体を発見し、LC-MS/MS解析によってDDAH2を認識する抗体であることが明らかになった。免疫組織学的検討では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発現していることが明らかとなり、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た。これらの点からは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。

肺腺癌手術検体を用いてDDAH2およびeNOSの発現を検討したところ浸潤性腺癌において両者の発現が有意に亢進していた。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。

結語としてDDAH2は肺腺癌の間質に発現する特徴的な予後因子であり、血管新生を介して肺腺癌の浸潤に関与していると考えられた。

7. 謝辞

本研究を遂行するにあたり多大なる御指導、御鞭撻を頂きました筑波大学医学医療系
診断病理学教室 野口雅之教授、呼吸器内科学 檜澤伸之教授に深謝いたします。

本研究においてマウス由来のミエローマ細胞（Sp2/0）を供与して頂いた筑波大学大学院
人間総合科学研究科、免疫学グループ（渋谷彰教授）に感謝いたします。モノローナル抗
体の作製および免疫組織学的検討において御尽力をいただいた茨城東病院 呼吸器外科
薄井慎吾先生、戸嶋章太郎様に感謝致します。

診断病理学研究室の皆様には研究の初心者であった私にたくさんの御助言、御協力を頂
きました。また2015年度は病院での診療業務と大学院での研究との両方に従事していまし
たが、檜澤教授をはじめとした筑波大学医学医療系 呼吸器内科の皆様には診療業務の負
担が軽減できるように多大な御配慮を頂きました。御指導、御協力を頂いた皆様に深く感
謝致します。

参考文献

1. Travis WD, Lubin J, Ries L, Devesa S (1996) United States lung carcinoma incidence trends: declining for most histologic types among males, increasing among females. *Cancer* 77: 2464-70.
2. Valaitis J, Warren S, Gamble D (1981) Increasing incidence of adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 47:1042-6.
3. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely GJ, Van Schil PE, Garg K, Austin JH, Asamura H, Rusch VW, Hirsch FR, Scagliotti G, Mitsudomi T, Huber RM, Ishikawa Y, Jett J, Sanchez-Cespedes M, Sculier JP, Takahashi T, Tsuboi M, Vansteenkiste J, Wistuba I, Yang PC, Aberle D, Brambilla C, Flieder D, Franklin W, Gazdar A, Gould M, Hasleton P, Henderson D, Johnson B, Johnson D, Kerr K, Kuriyama K, Lee JS, Miller VA, Petersen I, Roggli V, Rosell R, Saijo N, Thunnissen E, Tsao M, Yankelewitz D (2011) International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 6:244-85

4. Noguchi M, Morikawa A, Kawasaki M, Matsuno Y, Yamada T, Hirohashi S, Kondo H, Shimosato Y. (1995) Small adenocarcinoma of the lung. Histologic characteristics and prognosis. *Cancer*. 75(12):2844-52.
5. Noguchi M. (2010) Stepwise progression of pulmonary adenocarcinoma—clinical and molecular implications. *Cancer Metastasis Rev*. 29:15-21.
6. Grunnet M, Sorensen JB (2012) Carcinoembryonic antigen (CEA) as tumor marker in lung cancer. *Lung Cancer* 76:138-43.
7. De Jong J, Looijenga LH (2006) Stem cell marker OCT3/4 in tumor biology and germ cell tumor diagnostics: history and future. *Crit Rev Oncog* 12:171-203.
8. Mimeault M, Batra SK (2014) Molecular biomarkers of cancer stem/progenitor cells associated with progression, metastases, and treatment resistance of aggressive cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 23:234-54.
9. Sobin LK, Gospodarowicz M, Wittekind C (2009) *International Union Against Cancer:*

TNM classification of Malignant tumors, 7th edition. West Sussex: Wiley-Blackwell
136-46.

10. Kostourou V, Robinson SP, Whitley GS, Griffiths JR (2003) Effects of overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase on tumor angiogenesis assessed by susceptibility magnetic resonance imaging. *Cancer Res* 63:4960-6.
11. Vanella L, Di Giacomo C, Acquaviva R, Santangelo R, Cardile V, Barbagallo I, Abraham NG, Sorrenti V (2011) The DDAH/NOS pathway in human prostatic cancer cell lines: antiangiogenic effect of L-NAME. *Int J Oncol* 39:1303-10.
12. Fiedler LR, Wojciak-Stothard B (2009) The DDAH/ADMA pathway in the control of endothelial cell migration and angiogenesis. *Biochem Soc Trans* 37:1243-7.
13. Palm F, Onozato ML, Luo Z, Wilcox CS (2007) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:3227-45.
14. Tran CT, Fox MF, Vallance P, Leiper JM (2000) Chromosomal localization, gene

- structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. *Genomics* 68:101-5.
15. Boucherat O, Franco-Montoya ML, Delacourt C, Martinovic J, Masse V, Elie C, Thébaud B, Benachi A, Bourbon JR (2010) Defective angiogenesis in hypoplastic human fetal lungs correlates with nitric oxide synthase deficiency that occurs despite enhanced angiopoietin-2 and VEGF. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 298: 849-56.
16. Leiper J, Nandi M (2011) The therapeutic potential of targeting endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis. *Nat Rev Drug Discov* 10:277-91.
17. Matsuguma K, Ueda S, Yamagishi S, Matsumoto Y, Kaneyuki U, Shibata R, Fujimura T, Matsuoka H, Kimoto M, Kato S, Imaizumi T, Okuda S (2006) Molecular mechanism for elevation of asymmetric dimethylarginine and its role for hypertension in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 17:2176-83.
18. Tatematsu S, Wakino S, Kanda T, Homma K, Yoshioka K, Hasegawa K, Sugano N, Kimoto M, Saruta T, Hayashi K (2007) Role of nitric oxide-producing and -degrading

pathways in coronary endothelial dysfunction in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 18:741-9.

19. Arrigoni FI, Vallance P, Haworth SG, Leiper JM (2003) Metabolism of asymmetric dimethylarginines is regulated in the lung developmentally and with pulmonary hypertension induced by hypobaric hypoxia. *Circulation* 107:1195-201.

20. Pullamsetti S, Kiss L, Ghofrani HA, Voswinckel R, Haredza P, Klepetko W, Aigner C, Fink L, Moyal JP, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Schermuly RT (2005) Increased levels and reduced catabolism of asymmetric and symmetric dimethylarginines in pulmonary hypertension. *FASEB J* 19:1175-7.

21. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, Lilienbaum R, Johnson DH (2006) Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 355:2542-50.

22. Reck M, von Pawel J, Zatloukal P, Ramlau R, Gorbounova V, Hirsh V, Leighl N, Mezger J, Archer V, Moore N, Manegold C (2009) Phase III trial of cisplatin plus

- gemcitabine with either placebo or bevacizumab as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: AVAIL. *J Clin Oncol* 27:1227-34.
23. Wagstaff AJ, Keam SJ, McCormack PL (2009) Bevacizumab plus platinum-based chemotherapy: in advanced non-small cell lung cancer. *BioDrugs* 23:187-96.
24. Y. Rebecca, Alex T (2009) Function of Akt/PKB Signaling to Cell Motility, Invasion and the Tumor Stroma in Cancer. *Cell Signal* 21:470-476.
25. Jeff S. Isenberg, Gema Martin-Manso, Justin B. Maxhimer, David D. Roberts (2009) Regulation of nitric oxide signaling by thrombospondin-1: implications for anti-angiogenic therapies. *Nat Rev Cancer* 9:182-194.
26. Hasegawa K, Wakino S, Tanaka T, Kimoto M, Tatematsu S, Kanda T, Yoshioka K, Homma K, Sugano N, Kurabayashi M, Saruta T, Hayashi K (2006) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 increases vascular endothelial growth factor expression through Sp1 transcription factor in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1488-94.

27. Xiao J, Xiao ZJ, Liu ZG, Gong HY, Yuan Q, Wang S, Li YJ, Jiang DJ (2009) Involvement of dimethylarginine dimethylaminohydrolase-2 in visfatin-enhanced angiogenic function of endothelial cells. *Diabetes Metab Res Rev* 25:242-9.
28. Noman MZ, Messai Y, Carré T, Akalay I, Méron M, Janji B, Hasmim M, Chouaib S (2011) Microenvironmental hypoxia orchestrating the cell stroma cross talk, tumor progression and antitumor response. *Crit Rev Immunol* 31:357-77.
29. Lin Q1, Yun Z (2010) Impact of the hypoxic tumor microenvironment on the regulation of cancer stem cell characteristics. *Cancer Biol Ther* 9:949-56.
30. Moeller BJ, Cao Y, Vujaskovic Z, Li CY, Haroon ZA, Dewhirst MW (2004) The relationship between hypoxia and angiogenesis. *Semin Radiat Oncol* 14:215-21.
31. Christopher P, Peter R (2003) Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature Medicine* 9: 677 -684.

32. Fujimoto J, Sato E, Alam SM, Jahan I, Toyoki H, Hong BL, Sakaguchi H, Tamaya T (2006) Plausible linkage of hypoxia-inducible factor (HIF) in uterine endometrial cancers. *Oncology* 71:95-101.
33. Lee OH, Xu J, Fueyo J, Alonso MM, Liu D, Martin V, Jiang H, Piao Y, Liu TJ, Gomez-Manzano C (2008) Angiopoietin-2 decreases vascular endothelial growth factor expression by modulating HIF-1 alpha levels in gliomas. *Oncogene* 27:1310-4.
34. Pullamsetti SS, Savai R, Dumitrescu R, Dahal BK, Wilhelm J, Konigshoff M, Zakrzewicz D, Ghofrani HA, Weissmann N, Eickelberg O, Guenther A, Leiper J, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT (2011) The role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sci Transl Med* 3:87ra53.
35. Zavadil J, Böttlinger EP (2005) TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24:5764-74.
36. Jakowlew SB (2006) Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 25:435-57.

37. Massague J (2008) TGF-beta in Cancer. Cell 134:215-30.

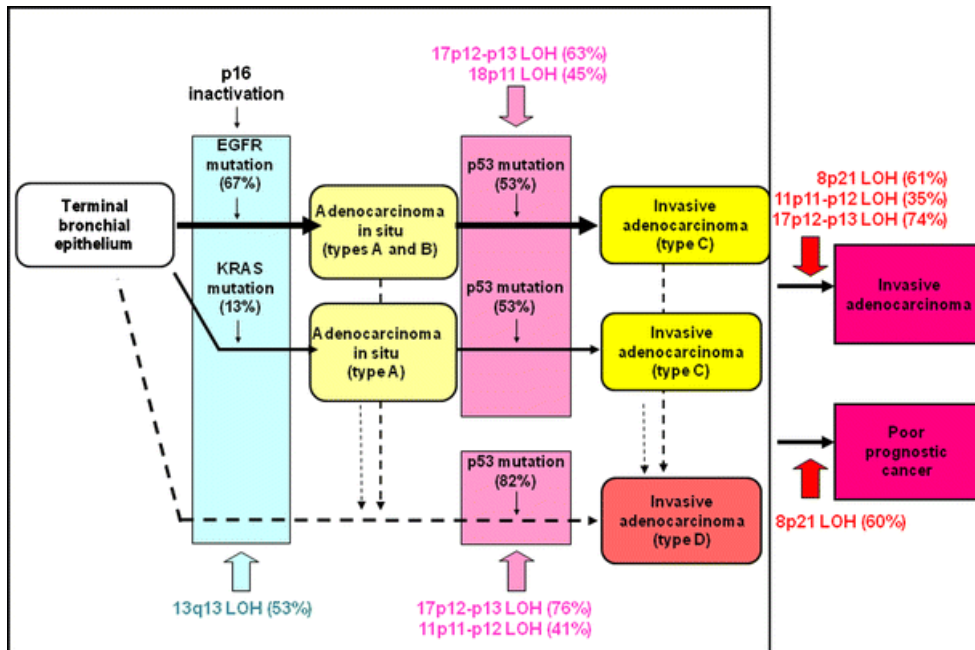


図1. 肺腺癌の stepwise progression (文献5より引用)

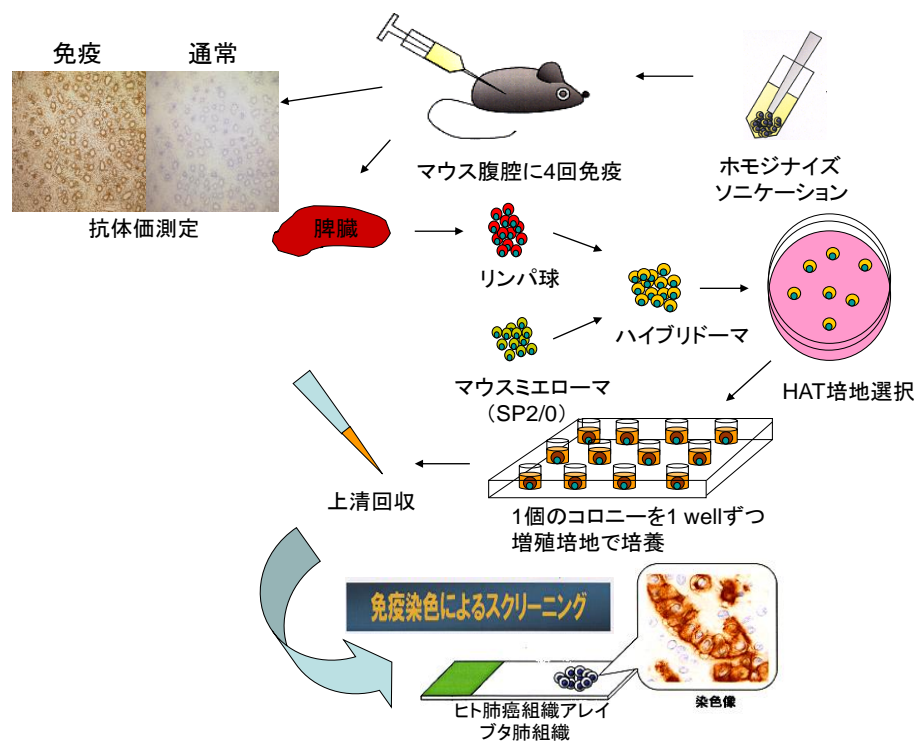
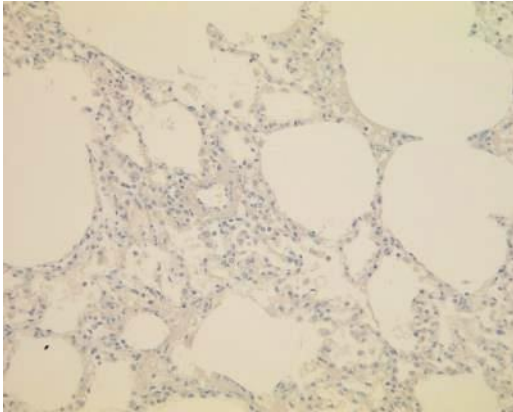


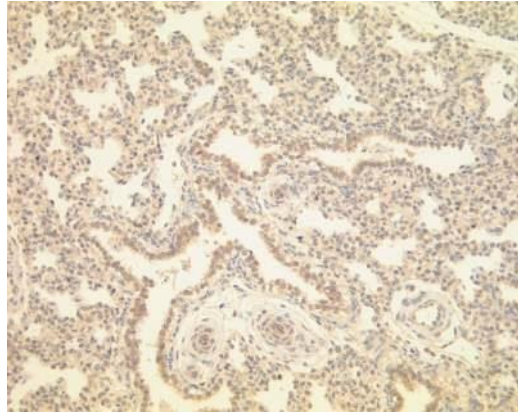
図2. マウスモノクローナル抗体の作製

BALB/c マウスの腹腔内に免疫原を注入しに免疫した。4回の免疫の後、免疫したマウスから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融合させ HAT 選択培地で培養し、ハイブリドーマを選別した。得られた抗体はブタ肺組織およびヒト正常肺と腺癌組織を用いて2段階のスクリーニングを行った。

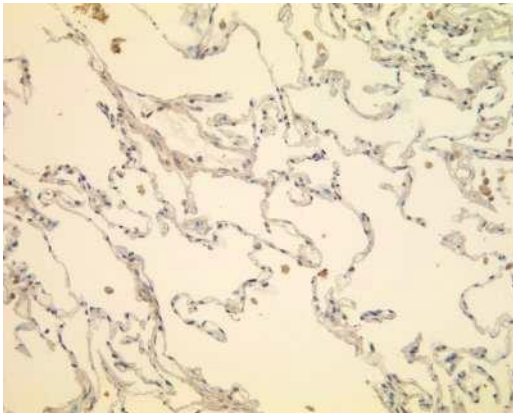
a.



b.



c.



d.

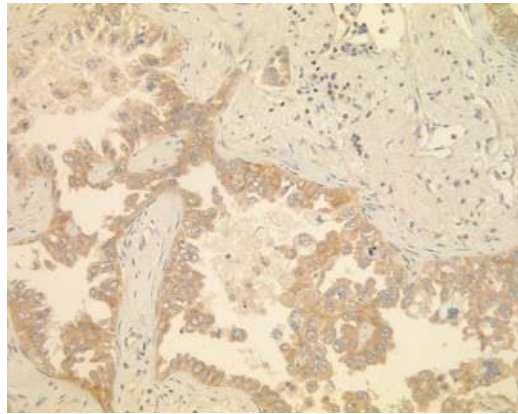
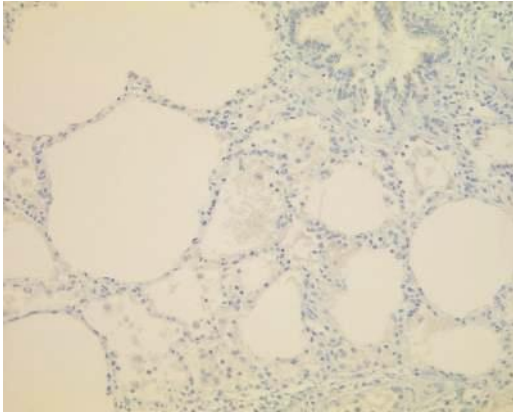


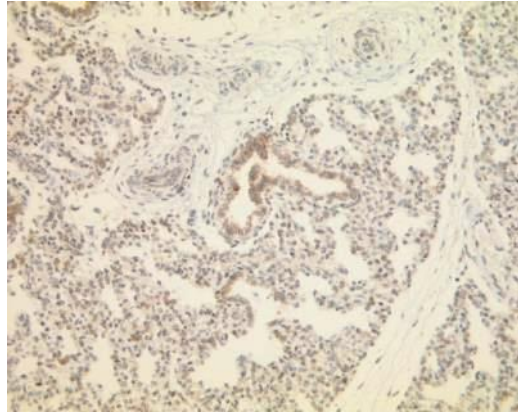
図3. マウスモノクローナル抗体でのスクリーニングの染色パターン①

- a. ブタ生体肺では陰性
- b. ブタ胎児肺では陽性
- c. ヒト正常肺では陰性
- d. 肺腺癌では腫瘍細胞の細胞質に染色像を認めた。

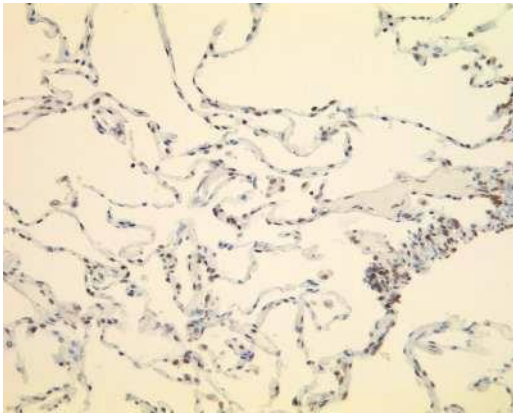
a.



b.



c.



d.

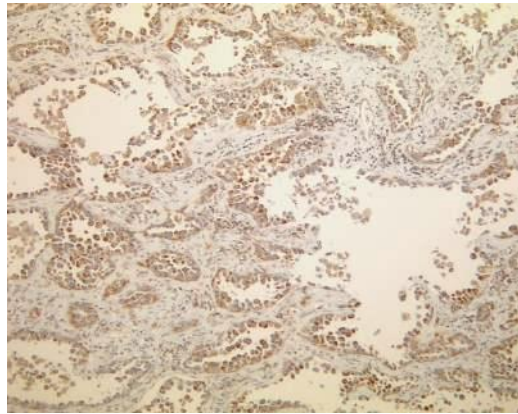
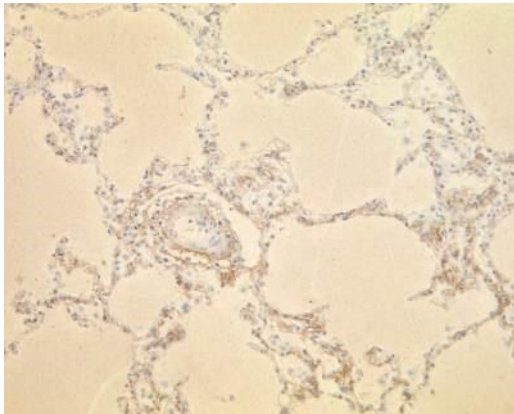


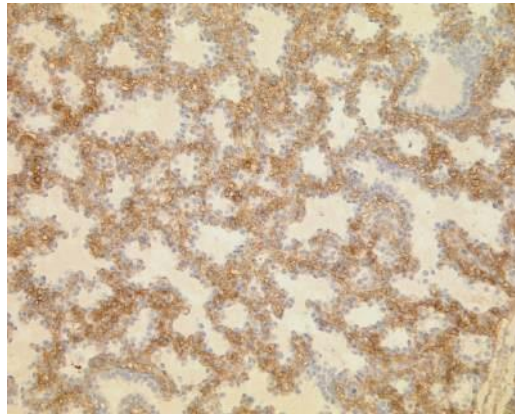
図4. マウスモノクローナル抗体でのスクリーニングの染色パターン②

- a. ブタ生体肺では陰性
- b. ブタ胎児肺では陽性
- c. ヒト正常肺ではⅡ型上皮細胞の核に染色像を認めた
- d. 肺腺癌では腫瘍細胞の細胞質に染色像を認めた。

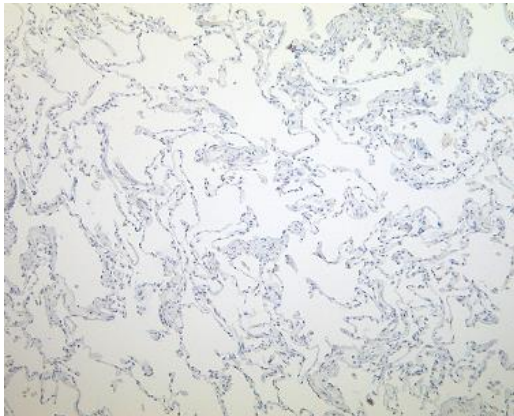
a



b



c



d

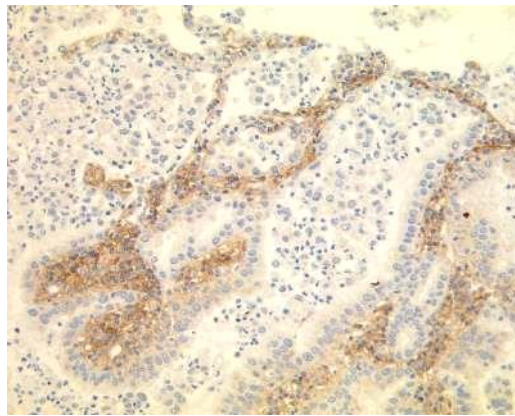


図5. マウスモノクローナル抗体でのスクリーニングの染色パターン③

- a. ブタ生体肺では陰性
- b. ブタ胎児肺では陽性
- c. ヒト正常肺では血管壁に染色像を認めた
- d. 肺腺癌では腫瘍の間質にのみ染色像を認めた。

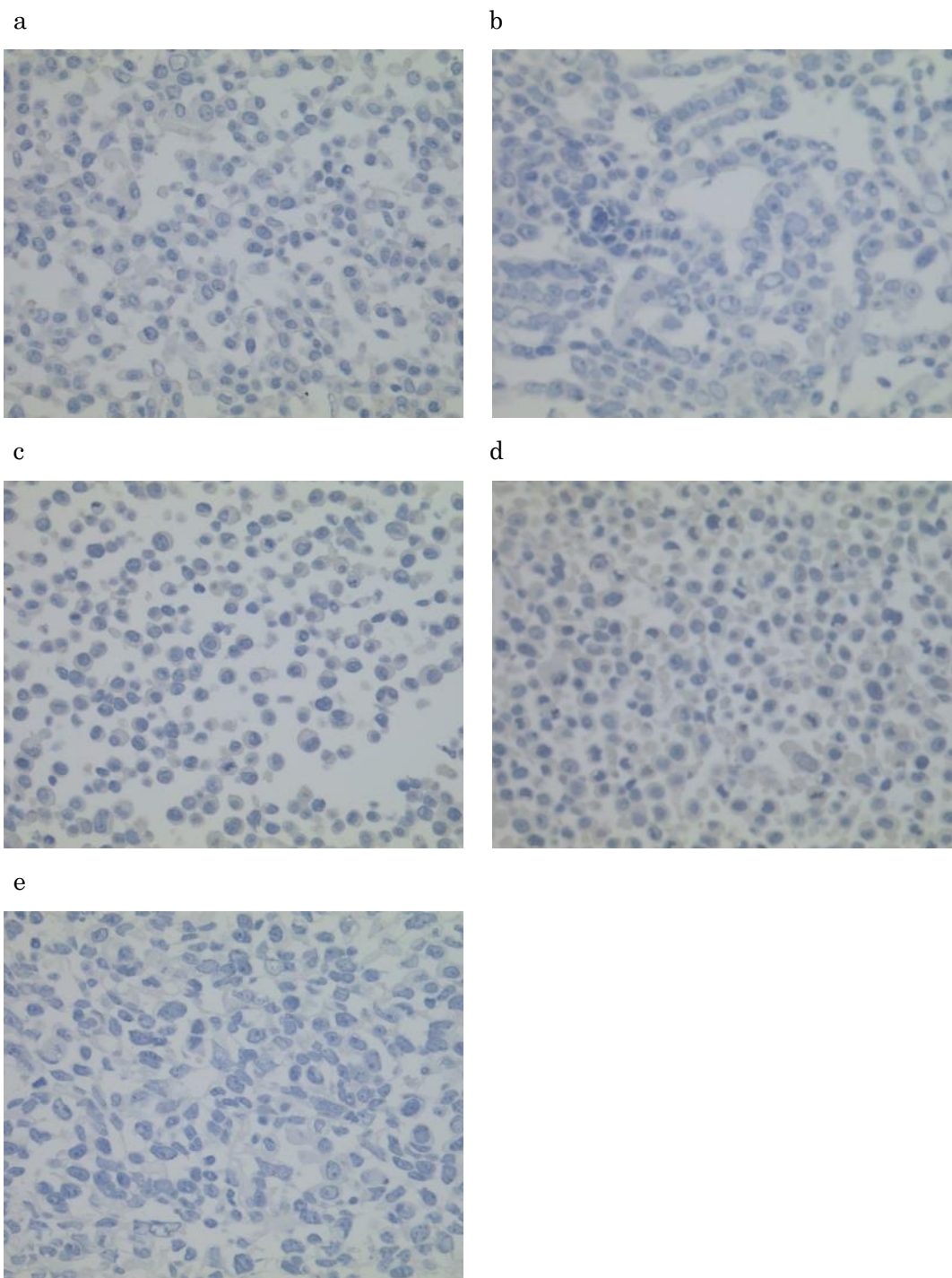
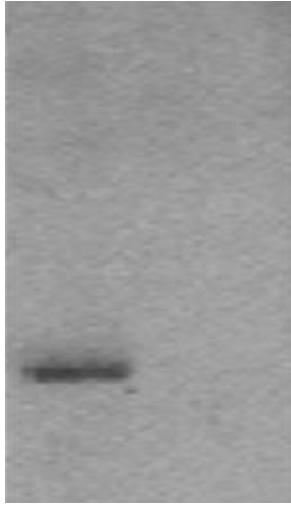


図6. 肺腺癌細胞株での免疫染色像 (パターン③、Figure4 の抗体を使用)

a. A549, b. Calu-3, c. NCI-H23, d. PC-14, e. LC-2/ad



(a)

(b)

図7. 抗体が認識する抗原の分子量を測定するためのウエスタンブロット

- a. 肺腺癌手術検体では30kDa付近にバンドを認めた。
- b. 肺癌細胞株 (Calu-3) ではバンドは認められなかった。

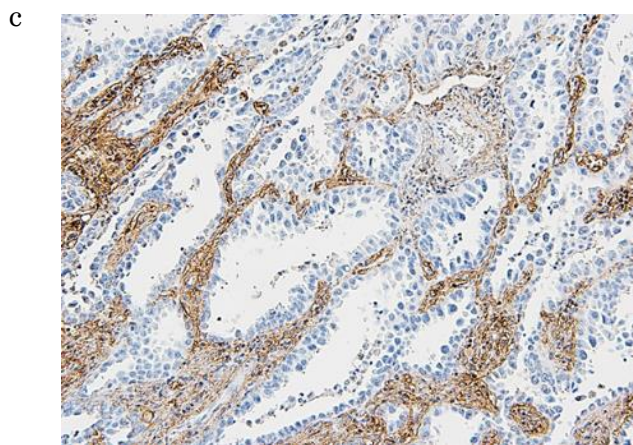
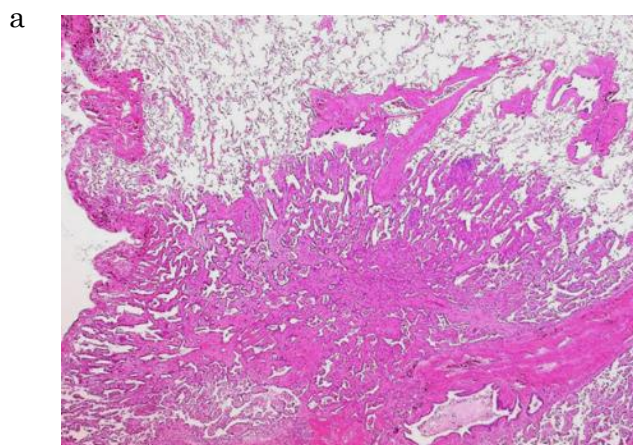
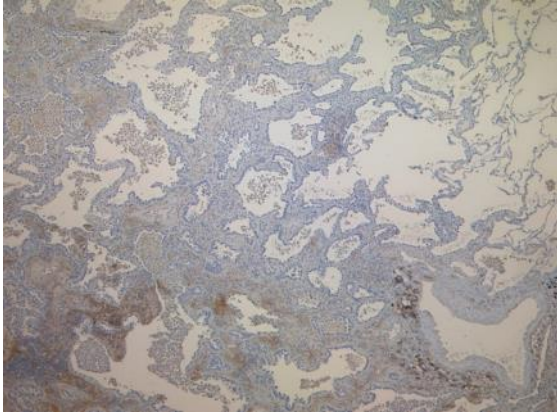


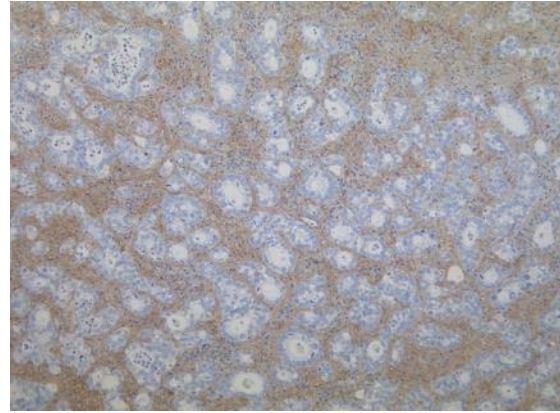
図8. 浸潤性腺癌でのDDAH2免疫染色像

a. 浸潤性腺癌 (Lepidic predominant)のH.E像、b. 作製した抗DDAH2抗体による免疫染色像、c. 強拡大像。間質にびまん性の染色を認めた。

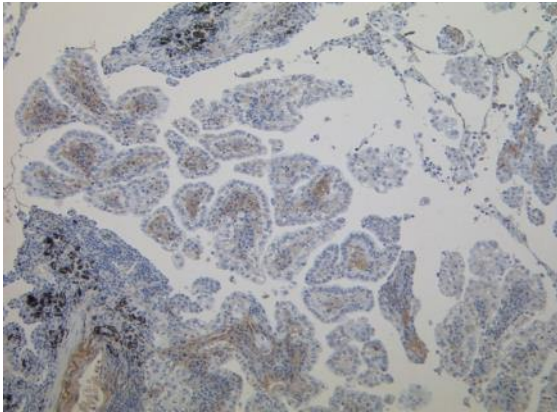
a



b



c



d

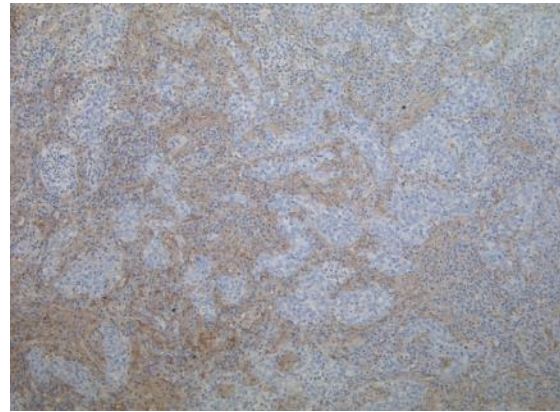


図9. 浸潤性腺癌の各亜型優位の、DDAH2による免疫染色像の典型例。いずれも腫瘍細胞には染色性を認めず、間質に特異的に染色像を認めた。

- a. Lepidic growth pattern
- b. Acinar pattern
- c. Papillary pattern
- d. Solid pattern

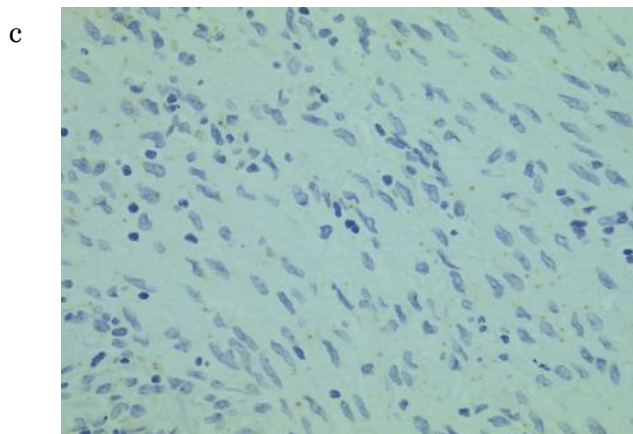
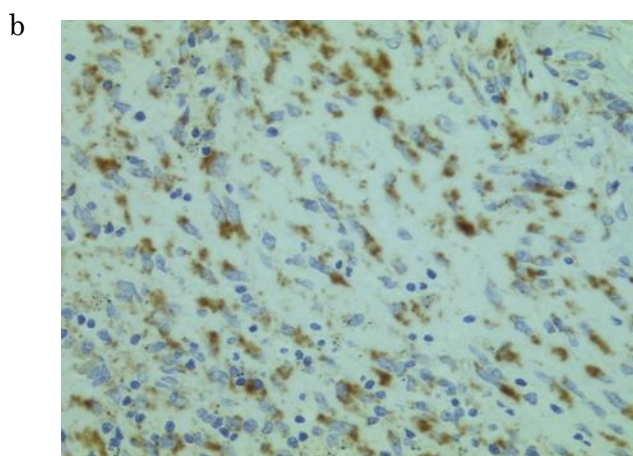
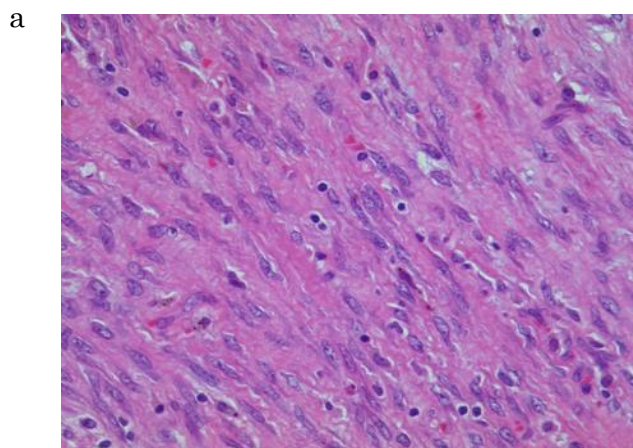


図 1 0. 腺癌 (Lepidic Predominant) のDDAH2 mRNA probeを用いたISH。
a. H.E像、b. anti-sense、c. negative control(sense)

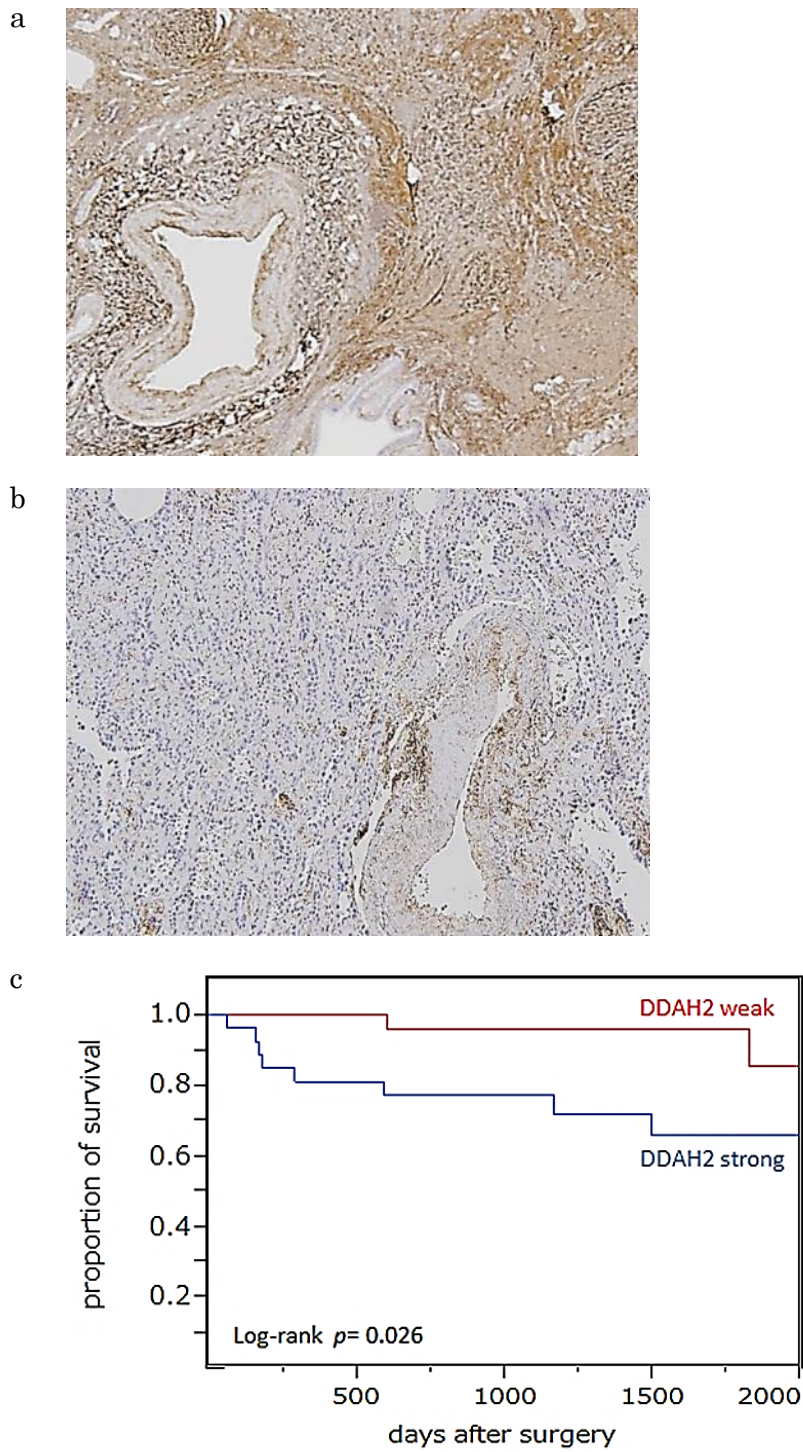


図 1 1. DDAH2の発現と予後との相関

DDAH2強陽性(a. n=25)と弱陽性(b. n=36)に分けて生存解析を行ったところ、両群のDFSに統計学的有意差を認めた。(c, $p=0.026$)

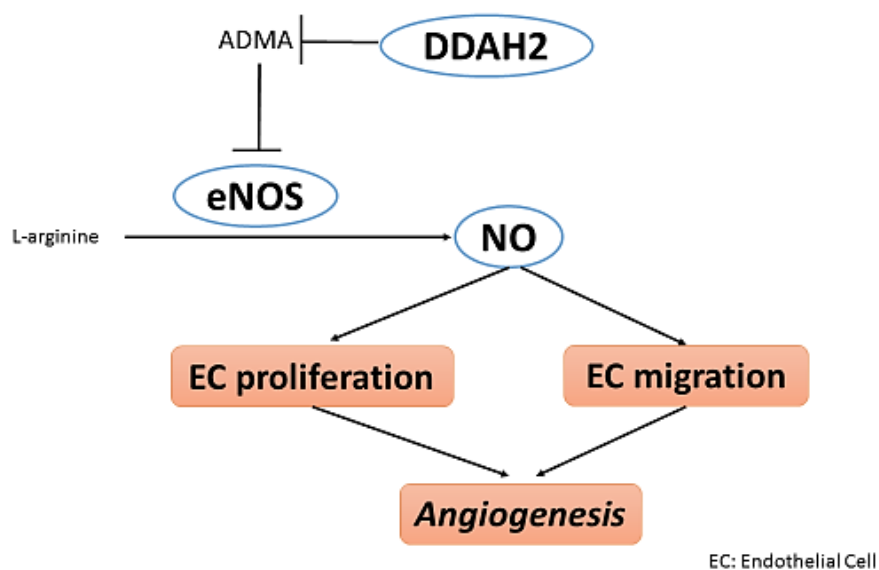


図 1 2. 肺腺癌におけるDDAH2の役割を示した仮説。

DDAH2は腫瘍内の血管内皮細胞に作用し血管内皮型NO合成酵素（eNOS：endothelial Nitric Oxide Synthase）の発現を亢進させ、それにより一酸化窒素（NO：Nitric Oxide）が産生も上昇し、それに引き続く血管内皮細胞の増殖や分化が亢進し血管新生が促進される。

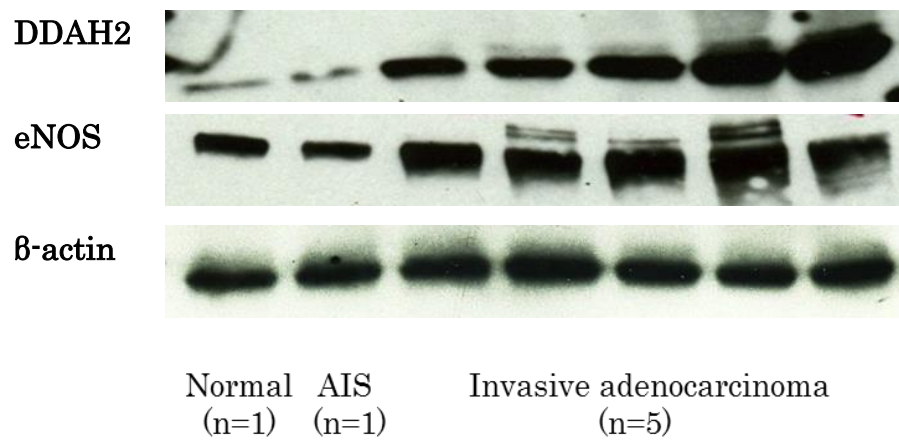


図 1 3. ウェスタンブロットによるDDAH2とeNOSの発現

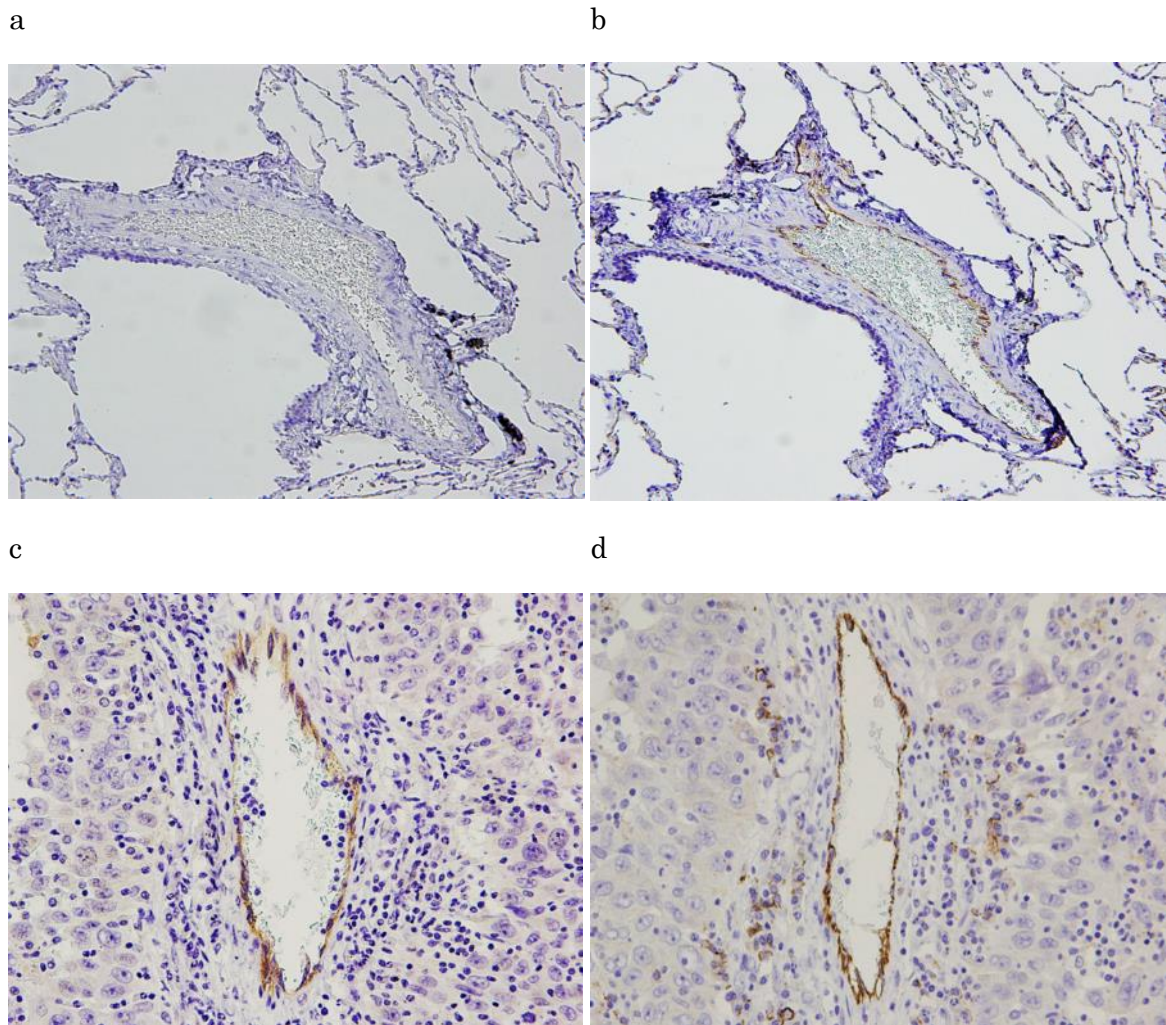


図14. 正常肺、上皮内癌および浸潤性腺癌を用いたeNOS免疫染色

- a. 正常肺のeNOS免疫染色
- b. 正常肺のCD31免疫染色 (aと同じ切片)
- c. 浸潤性腺癌のeNOS免疫染色
- d. 浸潤性腺癌のCD31免疫染色 (cと同じ切片)

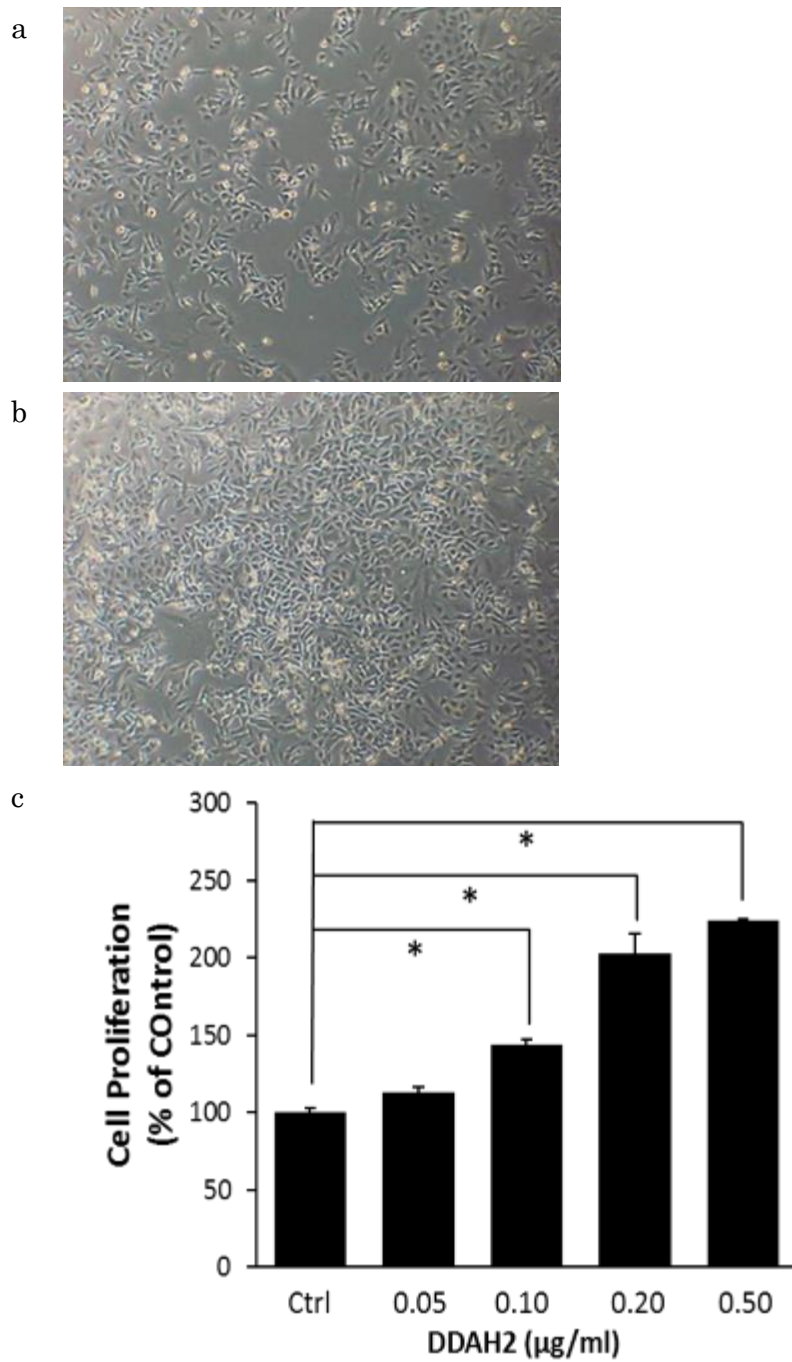


図 1 5. DDAH2が血管内皮細胞の増殖に与える影響

- a. 対照群にはPBSを用いた。
- b. b. DDAH2 0.50 μg/mlを添加した48時間後の細胞増加。
- c. 細胞数の増加は対照群を100%として示した。*は $p < 0.05$ を示す。

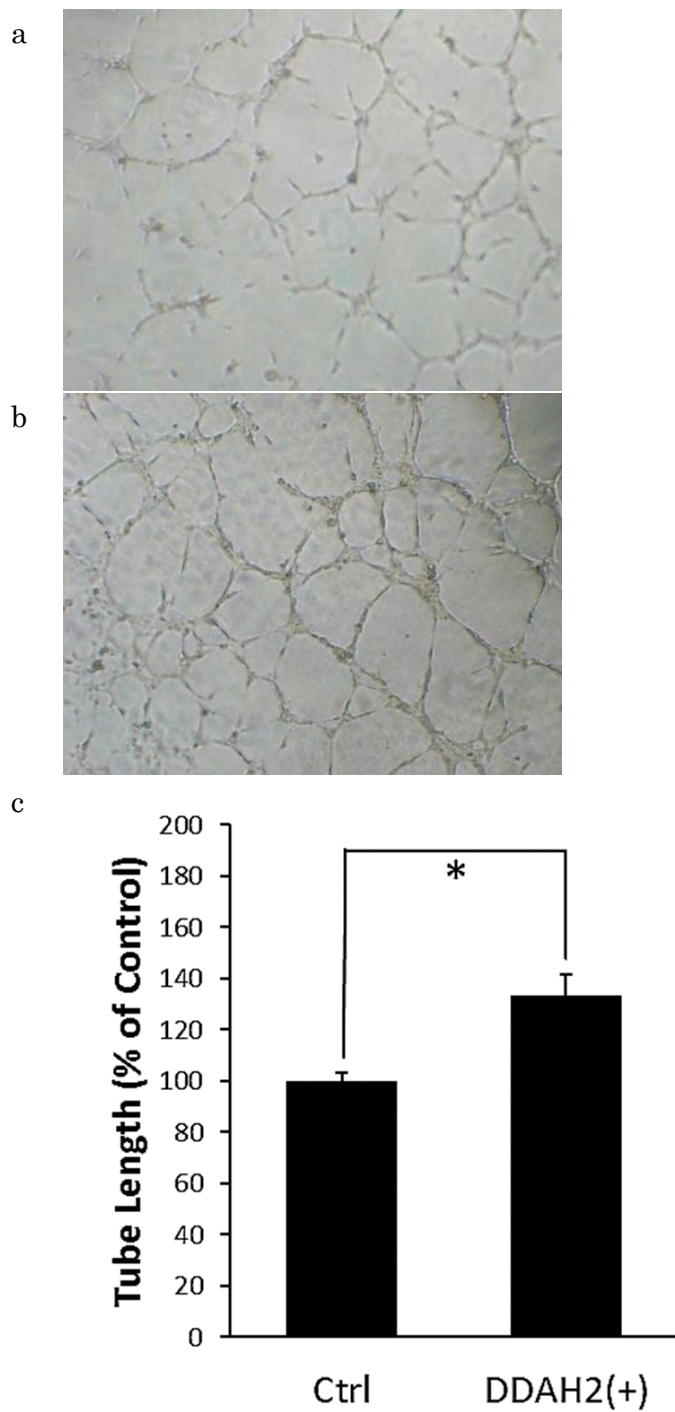


図16. DDAH2が血管内皮細胞の管腔形成に与える影響

- 対照群にはPBSを用いた。
- DDAH2 0.50 μ g/mlを添加した48時間後の管腔形成。
- 管腔の中央値について対照群を100%として示した。*は $p < 0.05$ を示す。

表1 IASLC/ATS/ERSが提唱した肺腺癌における新しいWHO分類

TABLE 1. IASLC/ATS/ERS Classification of Lung Adenocarcinoma in Resection Specimens

Preinvasive lesions

Atypical adenomatous hyperplasia

Adenocarcinoma in situ (≤ 3 cm formerly BAC)

Nonmucinous

Mucinous

Mixed mucinous/nonmucinous

Minimally invasive adenocarcinoma (≤ 3 cm lepidic predominant tumor with ≤ 5 mm invasion)

Nonmucinous

Mucinous

Mixed mucinous/nonmucinous

Invasive adenocarcinoma

Lepidic predominant (formerly nonmucinous BAC pattern, with >5 mm invasion)

Acinar predominant

Papillary predominant

Micropapillary predominant

Solid predominant with mucin production

Variants of invasive adenocarcinoma

Invasive mucinous adenocarcinoma (formerly mucinous BAC)

Colloid

Fetal (low and high grade)

Enteric

BAC, bronchioloalveolar carcinoma; IASLC, International Association for the Study of Lung Cancer; ATS, American Thoracic Society; ERS, European Respiratory Society.

文献3より引用

表2. 対象患者の臨床病理学的背景

Characteristics		
age (Av.±SD)		68.7±10.5
gender(Male/Female)		71 / 62
P-stage	I (IA/IB)	110 (83/27)
	II (IIA/IIB)	12 (9/3)
	III (IIIA/IIIB)	9 (9/0)
	IV	2
Histological Subtypes	Atypical adenomatous hyperplasia (AAH)	14
	Adenocarcinoma in situ (AIS)	33
	Minimally invasive adenocarcinoma(MIA)	11
	Invasive adenocarcinoma	
	Lepidic predominant	41
	Acinar predominant	7
	Papillary predominant	8
Micropapillary predominant	1	
	Solid predominant	18

表3 肺腺癌組織亜型毎のDDAH2の陽性率

Histological subtypes	positive cases
Preinvasive lesion	21/47(46%)
Atypical adenomatous hyperplasia (AAH)	2/14
Adenocarcinoma in situ (AIS)	19/33
Minimally invasive adenocarcinoma (MIA)	11/11(100%)
Invasive adenocarcinoma	74/75 (99%)
Lepidic predominant	40/41
Acinar predominant	7/7
Papillary predominant	8/8
Micropapillary predominant	1/1
Solid predominant	18/18