

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670172

研究課題名(和文)血管保護因子DDAH2に注目した肺腺癌間質形成の分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of DDAH2 associated stromal formation in lung adenocarcinoma

研究代表者

野口 雅之(Noguchi, Masayuki)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：00198582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：DDAH2が肺腺癌の間質で発現する意義を明らかにすることを目的にした。DDAH2の発現状態を免疫染色で調べるとDDAH2はAAHやAISなど非浸潤癌では発現に限られるがMIA以上の進行癌になるとほぼ100%にその発現が認められた。またDDAH2陽性例は陰性例よりも有意に予後が悪かった。AISと進行腺癌を用いてDDAH2とeNOSの発現を解析すると進行腺癌のすべての症例でDDAH2、eNOSともに正常肺やAISに比較して高発現していた。DDAH2は肺腺癌間質の線維芽細胞が発現し、NO産生を通して腫瘍の血管増生に関与し、悪性化に重要な因子である。

研究成果の概要(英文)：We examined the functional significance of DDAH2 expression in the stroma of the lung adenocarcinoma. Using immunohistochemistry, we examined expression of DDAH2. Interestingly, almost all cases of MIA and invasive adenocarcinoma were positive for DDAH2, while only half of pre-invasive lesions were positive. High expression of DDAH2 was significantly associated with poor outcome ($p < 0.026$). Expression of both DDAH2 and eNOS by western blotting showed both to be expressed at a significantly higher level in invasive adenocarcinoma than in AIS and normal lung. DDAH2 is expressed in carcinoma-associated fibroblast and might play an important role in tumor invasion by promoting tumor angiogenesis through an increase of NO production.

研究分野：診断病理学

キーワード：DDAH2

1. 研究開始当初の背景

CEA, OCT3/4, SOX2 など癌の血清診断や免疫染色による病理診断には胎児性の蛋白が利用されることが多い。そこで癌の診断に応用できる胎児性蛋白を網羅的に明らかにするため、ブタ胎児肺を抗原として肺癌組織に特異的に反応する単クローン抗体を作製した。免疫染色で興味ある抗体をスクリーニングし、幾つかの興味ある抗体を得た。その中に肺腺癌間質に特異的に陽性を示す単クローン抗体があった。この抗体が認識する抗原を LC/MS-MS 法で検索すると、この抗体が認識する抗原が Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 2 (DDAH2) であることがわかった。

2. 研究の目的

本研究は肺腺癌間質で DDAH2 を発現する細胞を同定する。さらに肺腺癌腫瘍間質で特異的に発現する DDAH2 の予後因子としての可能性を探ることにある。最終的に DDAH2 の肺腺癌における機能的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) まず第一に *in situ* hybridization 法を用いて肺腺癌間質にあって DDAH2 を発現している細胞を同定する。

(2) 次に、筑波大学附属病院で切除された異型腺腫様過形成、上皮内腺癌、浸潤性腺癌を含む 133 例の切除症例を用いて免疫染色法で染色し、その発現と組織亜型との関係や種々の臨床病理学的特徴との関連を解析する。

(3) さらに、DDAH2 の発現の機能的意義を解析するためにヒト胎盤から樹立された血管内皮細胞株である HUVEC 細胞を用いて *in vitro* の解析を行う。

4. 研究成果

(1) DDAH2 の RNA プローブを用いて肺腺癌間質に染色される DDAH2 の発現細胞を同定した。*In situ* hybridization 法を行うと肺腺癌間質に存在する線維芽細胞にのみ陽性所見が得られた。以上より、肺腺癌間質で DDAH2 を発現するのは間質内の活性化線維芽細胞であることが明らかになった。

(2) 肺腺癌前浸潤病変(異型腺腫様過形成:AAH, 上皮内腺癌:AIS)、微小浸潤病変(MIA)および進行腺癌における DDAH2 の発現状態を調べるために 133 の症例(AAH:14 例、AIS:33 例、MIA:11 例、進行癌:75 例)を用いて免疫染色にて DDAH2 の発現を比較検討した。AAH では 2 例(14%)、AIS では 19 例(58%)、MIA では 11 例(100%)、進行癌ではほぼ全例の 74 例(99%)が陽性を示した。DDAH2 は AAH や AIS など非浸潤癌では発現に限られるが MIA 以上の進行癌になるとほぼ 100%にその発現が認

められることがわかった。

(3) 肺腺癌の予後にどの程度 DDAH2 の発現が影響を与えるかを 61 例の予後が明らかな肺腺癌を選んで免疫染色を用いてその発現程度を解析した。染色態度が組織内の血管内皮細胞(陽性コントロール)より強い症例を陽性(高発現群)、弱い症例を陰性(低発現群)と判定した。高発現例 26 例、低発現例は 35 例で高発現例は低発現例よりも有意に予後が悪かった($p < 0.026$)。

(4) DDAH2 は ADMA を抑制して eNOS の発現を亢進させ、血管の保護、増生に関与していることが報告されている。そこで AIS(1 例)と進行腺癌(5 例)を用いて DDAH2 と eNOS の発現を western blotting 法を用いて比較した。進行腺癌のすべての症例で DDAH2, eNOS とともに正常肺や AIS に比較して高発現していた。以上の結果より DDAH2 は ADMA を抑制することによって eNOS の発現を亢進させている可能性があることがわかった。

(5) DDAH2 の血管増生促進機能を明らかにするために HUVEC 細胞を用いた *in vitro* 解析を行った。まず、DDAH2 の遺伝子組み換え蛋白が HUVEC の eNOS 発現を有意に上昇させることを確認した。次に DDAH2 の遺伝子組み換え蛋白が投与量依存的に HUVEC の細胞増殖を亢進させることを明らかにした。さらに血管増生能を検討するために tube formation assay を *in vitro* angiogenesis model 法を用いて行った。DDAH2 の遺伝子組み換え蛋白を加えると有意に HUVEC 細胞の capillary-like tube formation が亢進することがわかった。以上より、DDAH2 は NO 産生を亢進させることで肺腺癌間質の血管増生を促進していることが強く予想された。

(6) 本研究は Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 2 (DDAH2) の肺腺癌間質における機能的役割を明らかにすることであり以下に示す 5 つの項目について研究を進める予定であった。

前浸潤病変、あるいは極めて初期の肺腺癌症例を用いて DDAH2 の免疫組織染色を大規模症例解析し、わずかな量の癌間質(つまり浸潤性病変部)を判定できるかどうかを検討する。

癌間質内で DDAH2 を発現している細胞(血管内皮細胞? 線維芽細胞?)を *in situ* hybridization 法を用いて明らかにし、かつ DDAH2 の発現が肺腺癌の予後に与える影響を明らかにする。

in vitro 実験系を用いて DDAH2 の機能的な役割を明らかにする。

肺腺癌細胞株に DDAH2 を強制発現させ、ヌードマウスに移植し、形成された腫瘍における DDAH2 の発現を確認するとともに新生血管の状態、間質の誘導状況などを解析する。

SPC プロモーター下に DDAH2 を発現するベクターを作製し、これを用いてトランスジェニックマウスを作製する。作製されたトランスジェニックマウスを用いて NNK 等による化学発癌実験を行い、発生した腫瘍の間質の状態（特に新生血管の状態）を解析する。

siRNA を用いた RNA 干渉実験を行い、DDAH2 をターゲットにした浸潤性肺腺癌の治療の可能性を探る。

最終的に は達成できたものの、には手をつけられなかった。しかし、この理由は研究を行っていく過程で DDAH2 が ADMA 抑制して eNOS 産生を亢進させ、血管保護、増生に関わることがわかったので DDAH2, eNOS の関係、および DDAH2 が血管増生に関与するかどうかの機能的解析に研究が進展したためである。DDAH2 と血管増生については多くの結果を得ることができた。

一方、ブタ胎児肺を抗原に用いた単クローナル抗体作製は癌の診断・治療に用いることが期待される胎児生抗原を明らかにするための魅力的な方法であることがわかったので、本研究中も継続して行った。抗原として用いる蛋白を胎児肺そのものではなく、核蛋白を抽出して用いたり、2 次免疫時にヒト肺腺癌組織を用いたりして種々の試みを行ったが、その結果、新たに胎児生抗原の一つである Drebrin 1 (DBN1) が肺腺癌に特徴的に高発現していることを明らかにした。睾丸を除き、肺を始めとする正常ヒト成人組織では DBN1 の発現は認められない。今後、さらなる検討を加えていく予定である。

(6) DDAH2 の研究で得られた結果をまとめて Virchows Arch (2016)468:179-190 に論文発表した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Shiozawa T, Iyama S, Toshima S, Sakata A, Usui S, Minami Y, Sato Y, Hizawa N, Noguchi M. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 promotes tumor angiogenesis in lung adenocarcinoma. Virchows Archiv. 査読有. 468(2), 2016. p p. 179-190.

doi: 10.1007/s00428-015-1863-z.

Itoguchi N, Nakagawa T, Murata Y, Li Dongping, Shiba-Ishii A, Minami Y, Noguchi M. Immunocytochemical staining for

stratifin and OCIAD2 in bronchial washing specimens increases sensitivity for diagnosis of lung cancer. Cytopathology. 査読有 6 (6), 2015. pp.354-61 . doi: 10.1111/cyt.12220.

Murata Y, Minami Y, Iwakawa R, Yokota J, Usui S, Tsuta K, Shiraishi K, Sakashita S, Satomi K, Iijima T, Noguchi M. ECT2 amplification and overexpression as a new prognostic biomarker for early-stage lung adenocarcinoma. Cancer Sci. 査読有 105(4), 2014. pp.490-7 . doi: 10.1111/cas.12363

〔学会発表〕(計 7 件)

野口雅之. 新 WHO 分類における肺癌分類の要点と問題点. 第 56 回日本肺癌学会学術集会、2015 年 11 月 27 日、「パシフィコ横浜(神奈川県/横浜市)」

Noguchi M. Lung Carcinogenesis : Molecular Pathology of Alveolar Premalignancy. IASLC2015 (the 16th IASLC World Conference on Lung Cancer), 2015 年 9 月 9 日、「Colorado Convention Center, Colorado(USA)」

Noguchi M. The New WHO Classification of Lung Adenocarcinoma, points for diagnosis and biological significance. APIAP 2015 : The 9th Asia Pacific IAP Congress, 2015 年 6 月 6 日、「Brisbane Convention & Exhibition Centre, Brisbane Queensland(Australia)」

Noguchi M. Adenocarcinoma of the lung. Pathology Expert Forum: The WHO Classification of Lung Tumors 2015, 2015 年 5 月 17 日、「GIS NTU Convention Center, Taipei(Taiwan)」

野口雅之. 「宿題報告 2」肺腺癌の組織発生と悪性化の病理学. 第 104 回日本病理学会総会、2015 年 4 月 30 日~5 月 2 日、「名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)」

野口雅之. 特別講演「Early genetic and phenotypic alterations of lung adenocarcinoma」. Training of the Education Program for Pathology and Genetic Tests, 2014 年 11 月 10 日、「つくば臨床検査教育・研究センター(茨城県・つくば市)」

Noguchi M. Scientific program : Pulmonary pathology sessions 「Lung Cancer: Preinvasive and Minimally Invasive Adenocarcinoma」. The 30th Congress of the International Academy of Pathology(IAP2014), 2014 年 10 月 6 日、「Bangkok Convention Centre at Central World Bangkok, Bangkok (Thailand)」

〔図書〕(計 2 件)

W.D.Travis, E.Brambilla, A.P.Burke, A.Marx, A.G.Nicholson, Noguchi

M.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (Lyon, France)
WHO Classification of Tumours of Lung,
Pleura, Thymus & Heart, 4th ed. (WHO
Classification of Tumours, Vol.7). 2015:
412 (pp.17-21.26-37.44-55.80-85.)
Ignacio I , Wistuba , Elisabeth
Brambilla , M. Noguchi . The IASLC
Multidisciplinary Approach to Thoracic
Oncology . CLASSIC ANATOMIC PATHOLOGY
AND LUNG CANCER. 2014 CHAPTER 17.952
(217-240) .

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

野口 雅之 (NOGUCHI, Masayuki)
筑波大学 ・ 医学医療系 ・ 教授
研究者番号 : 0 0 1 9 8 5 8 2