

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目

大腸癌・胃癌の進展に及ぼすリゾホスファチジン酸(LPA)の作用
についての総合的検討

指導教官 名川 弘一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月 入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 志田 大

癌の転移・再発は、癌治療における克服すべき課題であり、がん患者の生命予後を左右する最大の要因である。転移・再発をきたした患者の多くは多発性病変を有し、手術による切除以外の治療手段が必要となる。しかし、化学療法が進歩した現在でも、いまだその治療成績は不十分であり、新たな分子を標的としたさらに効果のある治療法の開発が期待される。このためにはまず、癌化および転移のメカニズムを分子生物学的アプローチによりさらに解明することが必要である。この観点から、生体内に存在するリゾホスファチジン酸(Lysophosphatidic acid, 以下 LPA) というリズリン脂質に着目した。LPA と癌とのかかわりに関しては、これまで主に卵巣癌において盛んに研究されていたが、消化器癌領域では全く研究されていなかった。しかし、血液が凝固する際に LPA が多量に産生されること、また大腸癌や胃癌が腫瘍局所での微小出血を伴うことを考え合わせると、局所において十分な量の LPA が産生されていると予想される。本研究では、LPA による大腸癌・胃癌の発育・促進作用とその機序を解明し、癌治療の新たな礎とするために、1) 大腸癌・胃癌細胞はどのような LPA 受容体を発現しているのか？ 2) LPA は大腸癌細胞に対しどのような作用をもたらすか？ 3) 大腸

癌組織・正常粘膜での LPA 受容体の発現様式はどうか？ 4) 各 LPA 受容体と細胞運動との関連性はどうか？を主な検討課題とし、分子生物学的手法を用いて以下の実験を遂行した。

LPA の多彩な生理作用は、細胞膜受容体を介することが分かっているため、大腸癌細胞および胃癌細胞における LPA の細胞膜受容体 LPA1、LPA2、LPA3 の発現を検討した。Northern Blot による mRNA レベルでの検討の結果、大腸癌細胞 9 種および胃癌細胞 9 種はいずれも、少なくとも 1 種類の LPA 受容体を発現していた。とくに、大部分の大腸癌細胞は LPA2 受容体を発現していた。一方、胃癌細胞は、さまざまなレベルで各受容体を発現しており、一定の傾向は特に見られなかった。

引き続き、大腸癌細胞に対して LPA がなんらかの作用を及ぼすかどうか、また及ぼすとすればどのような作用かを検討した。LPA1 受容体を高発現している(LPA2 受容体はわずかに発現)DLD1 細胞と、LPA2 受容体のみ発現している HT29 細胞、WiDR 細胞のあわせて 3 種類の細胞を用いた実験の結果、LPA はいずれの細胞に対しても、細胞により若干の程度の差はあれ、増殖能を促進させ(20 μ M LPA において、115~689%)、血管新生因子の分泌能を促進させた(20 μ M LPA において、VEGF は 107~175%、IL-8 は 111~1894%)。これまで LPA は、卵巣癌特異的な癌促進因子とみなされてきたが、大腸癌に対しても同様に癌促進因子としてはたらき得ることが示されたのである。一方、細胞運動能と接着能に関しては、LPA は、DLD1 細胞に対しては促進作用があるものの(運動能は 100nM LPA で 3.6 倍、接着能は 10 μ M LPA で 2.0 倍)、HT29 細胞および WiDR 細胞に対しては有意な作用はみられなかった。この結果から、増殖能および血管新生因子の分泌能は LPA1 受容体および LPA2 受容体いずれを介してもおこる一方、運動能および接着能は LPA1 受容体のみを介することが判明した。これまで、LPA1 受容体に関しては、卵巣癌細胞に LPA1 受容体を強制的に高発現させるとアポトーシスが誘導されたとの報告があり、LPA1 受容体は卵巣癌の発育に negative にはたらくことが示唆されていたが、本研究では、LPA1 受容体が細胞運動・接着といった癌転移に必要な不可欠とされる要素を促進するという、これまでの概念と相反する結果を得た。

次に、実際の患者の大腸癌組織 26 例(および正常粘膜 16 例)を用いて LPA 受

容体の発現形式を Real-time RT-PCR 法にて検討した。その結果、大腸正常粘膜では LPA1・LPA2 受容体がともに発現しているのに対し、大腸癌組織では、正常粘膜に比べ、LPA1 発現は低下し、逆に LPA2 発現が上昇していた(正常粘膜 LPA1:1143 ± 196, LPA2:1110 ± 245; 癌組織 LPA1: 300 ± 43, LPA2: 2400 ± 294。各 LPA 受容体 copy 数/ β -actin copy 数 $\times 10^8$ で示した。)(いずれも $P < 0.05$)。正常粘膜および癌組織を同一患者から採取した 16 例で、LPA2/LPA1 の比をとると、正常粘膜 1.0 ± 0.2 に対し、癌組織では 18.0 ± 6.3 ($P < 0.05$)であり、癌組織では LPA2/LPA1 の値は著明に上昇していた。LPA3 受容体に関しては、正常粘膜・癌いずれもほとんど発現しておらず、大腸癌の発癌過程には関与していないと考えられた(正常粘膜:86 ± 18, 癌組織:138 ± 46; $P = 0.39$)。

次に、癌化による LPA2 受容体の高発現の意義を検討した。大腸癌細胞 5 種を用いた検討で、LPA2 受容体の高発現している 4 種の細胞では LPA により EGFR (epidermal growth factor receptor) の transactivation が起こったが、LPA2 受容体を発現していない COLO320 細胞では transactivation は起こらなかった。また、この LPA による EGFR transactivation は、LPA1 および LPA3 受容体拮抗薬 DGPP によって阻害されなかった。このことから、LPA による EGFR の transactivation は主に LPA2 受容体を介していることが判明した。癌は LPA2 受容体を高発現させることで LPA 刺激により LPA 受容体を介するシグナルのみならず EGFR からのシグナルを得るようになり、増殖等に有利になると考えられた。

最後に、細胞運動での LPA 受容体の役割を再検討した。上述のように、大腸は癌化すると、LPA1 受容体の発現が低下する。細胞運動を媒介する LPA1 受容体が癌化により発現が低下するという事実は、一見、癌の進展には不利に思われる。そこで、癌化すれば高発現する LPA2 受容体も、なんらかの形で細胞運動に関与しているのではないかと、この仮説をたてた。LPA2 受容体のみを発現している胃癌細胞 2 種を用いてさまざまな条件での検討の結果、10ng/ml HGF 存在下では、LPA は濃度依存性に運動能を亢進することが判明した(HGF 単独に比較して、1 μ M LPA を加えると運動能は 1.7~2.9 倍になった)。実際の生体内の癌の微小環境を考えた際、癌細胞の周囲に LPA が単独で存在することは稀で、HGF などの他の走化性因子が共存して

いることが考えられる。そのような環境では、LPA2 受容体は、LPA1 受容体と同様、細胞運動に寄与していると考えられた。次にそのメカニズムを検討した。胃癌細胞を用いた検討で、LPA2 受容体の高発現している 4 種の細胞では LPA により HGF 受容体 c-Met の transactivation が起こったが、LPA2 受容体を発現していない他の 4 種の細胞では c-Met の transactivation は起こらなかった。つまり、胃癌細胞において、LPA は LPA2 受容体を介して c-Met を transactivation することが判明した。これにより、細胞運動能に関して、HGF と LPA の協調作用が LPA2 受容体を介して起こると考えられた。

以上の結果から以下の結論を得た。1) 大腸癌・胃癌細胞いずれも少なくとも 1 種の LPA 受容体を発現していた。2) LPA は、大腸癌細胞に対し、細胞増殖能、血管新生因子分泌能および細胞運動能や接着能を促進させた。この効果は、LPA 受容体の発現形式により異なり、LPA1 受容体および LPA2 受容体いずれを介しても細胞増殖能・血管新生因子分泌能は促進されるが、LPA1 受容体を介してのみ細胞運動能・接着能が促進された。3) 大腸癌切除標本を用いた検討では、大腸正常粘膜では LPA1・LPA2 受容体がともに発現しているのに対し、大腸癌では LPA1 発現は低下し逆に LPA2 発現が上昇していた。癌における LPA2 発現上昇の意義としては、LPA2 受容体を介して EGFR transactivation が起こることが考えられた。4) LPA は、胃癌細胞の運動に対し、LPA そのものによる直接効果のほかに、HGF が共存する時にのみ明らかになる潜在的な効果をもつ。前者は LPA1 受容体を介する反応であり、後者は主に LPA2 受容体を介する反応であると考えられた。

本研究が発端となり、LPA 及び LPA 受容体を標的とした新たな癌治療戦略が開発されることを期待する。