

論文の内容の要旨

論文題目 肺腺癌における c-met の活性化について

指導教員 深山 正久教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

病因病理学専攻

氏名 中村 裕

本文

我が国における肺癌の死亡率は、1950 年以降男女とも増加の一途にあり、2004 年では肺癌死亡数が全悪性腫瘍死の約 18.7%を占めるようになった。肺癌の基本的な組織型は、扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌、小細胞癌に分類され、その中でも男女ともに肺腺癌の増加が報告されている。腺癌は、原発性肺癌の約半数を占め、ことに女性や若年者に比較的多い。肺癌における発癌のメカニズムに関する研究が進んできており、癌遺伝子の異常（*erbB-2* の過剰発現、*ras* 遺伝子の点突然変異、*myc* ファミリー遺伝子の過剰発現など）と、癌抑制遺伝子の異常（*p53* の不活化）が明らかになってきている。今後、肺癌の治療法を開発するうえで、肺腺癌の増加、女性での罹患率の高さから、肺腺癌の発生・進展のメカニズムを検討する必要がある。近年、新たな肺癌の治療戦略として、肺癌の発生、増殖、浸潤、転移に関わる物質を標的とした薬として、EGF (Epidermal growth factor) 受容体の阻害薬 (gefitinib; イレッサ)、血管新生阻害薬などの分子標的剤が開発され注目されている。

HGF (Hepatocyte growth factor) は、細胞増殖、細胞運動の促進作用、強力

な血管新生作用などを有する増殖因子である。Met は、1990 年に Donald P Bottaro によって HGF 受容体として同定された、膜貫通構造を持つ受容体型チロシンキナーゼである。線維芽細胞で産生された HGF が、Met を発現した上皮細胞に対して、endocrine, paracrine 的に働くことでその機能が発現されると考えられている。Met は、一本鎖の Met 受容体 2 本が近接して二量体化し、チロシン残基の自己リン酸化が起こることで活性化する。活性化は、Met の ligand である HGF が結合する経路以外に、①Met の mutation、②Met の過剰発現と二量体化、③Met 遺伝子の切断・転座、④transactivation による ligand 非依存性の経路がある。また低酸素による刺激、negative regulator の喪失、細胞接着、Semaphorin 4D - plexinB1 複合体を介した活性化機構も知られている。Met が活性化されると、抗アポトーシス作用 (survival)、浸潤性亢進 (細胞運動、細胞間接着の離開、細胞マトリックスの接着)、血管新生、増殖、形態発生 (管腔形成誘導作用) 等が認められる。

Met は、多種の癌組織において過剰発現、遺伝子増幅、突然変異が認められ、発癌・進展における関与が疑われている。肺癌に関しては、4 つの主な組織型のうち特に腺癌において、Met とそのリガンドの HGF の過剰発現が報告されており、肺腺癌の治療において、浸潤、転移を抑制する為の重要な標的として有望視されている。しかし従来の肺癌検体を用いた研究では、HGF あるいは Met の過剰発現と癌の悪性形質との相関を示すデータは示されているが、Met の活性化自体についての検討はほとんど行われていない。

本研究では、まず外科的に切除された肺腺癌 130 例を対象として、活性化 Met を認識する抗体を用いた免疫組織化学的検討により、活性化 Met を発現する症例の臨床病理学的特徴を明らかにした。解析の結果、Met の発現と活性化 met の発現が必ずしも一致しないこと、活性化 Met の発現は高分化型の腺癌に多い

ことが明らかとなった。Met の発現がリンパ節転移、病期の進行と相関するという従来の報告は今回確認されたが、今までの報告と異なり、Met の発現と患者予後との相関は認められなかった。また Met は高分化腺癌において basolateral に局在するとされているが、活性化 Met の局在はこれと異なり内腔側の細胞膜にある傾向が認められ、さらにこのような局在傾向は肺腺癌培養細胞においても確認された。これらの結果から、従来の報告にある肺癌における Met の高発現が必ずしも Met の活性化を意味しないこと、Met の活性化は高分化型腺癌の発生・進展において何らかの重要な役割を演じている可能性が示唆された。また活性化した Met はその局在に特徴があり、細胞の接着・運動との関連から興味ある現象と思われた。

次いで肺腺癌細胞における Met 活性化のメカニズムについて知見を得るため、肺腺癌細胞株を用いた *in vitro* の実験を行った。まず肺腺癌細胞 17 株について Western Blot にて Met の発現とそのリン酸化レベルを検討した。Met の発現は 17 株中 15 株で発現しており、うち 6 株で高発現を示した。一方 17 株中 10 株において Met の恒常的な活性化を認め、うち 5 株においては Met のリン酸化が特に高レベルであった。従来、HGF と Met の共発現からオートクリンによる Met の活性化がいくつかの系で報告されてきていた。しかし Met のリン酸化レベルの高い 5 株について詳細に検討したところ、1 株を除いては、(1) western blot により活性化 HGF を検出できないこと、(2) MDCK 細胞を用いたアッセイにより培養上清中に HGF 活性がみられないこと、(3) HGF 中和抗体の添加によって Met のリン酸化に変化がみられないことなどから、肺腺癌細胞株における恒常的な Met の活性化はリガンド非依存性であることが判明した。

従来よりリガンド非依存性の活性化のメカニズムとして、細胞間接着あるいは基質との接着が報告されている。そこで肺腺癌株における細胞接着と Met 活

活性化の関与について、足場喪失用の dish（細胞基質間接着）および E-cadherin 中和抗体（細胞間接着）を用いて、検討を進めた。Met のリン酸化は E-cadherin 中和抗体の添加に影響されなかった。これに対し足場喪失により Met のリン酸化は著明に低下した。従って肺腺癌細胞におけるリガンド非依存性の Met の活性化には基質との接着が必須であることが明らかとなった。

恒常的な Met 活性化が下流シグナルに与える影響をみるため、血清非添加状態において Met, Erk, Akt, Stat3 の活性化を比較した。また K252a (met inhibitor) を添加し、Met の脱リン酸化が Erk, Akt, Stat3 の活性化に与える影響を経時的に観察した。その結果、Met と STAT3 の活性化がよく相関しており、恒常的な Met 活性化が及ぼす影響としては、下流シグナル Erk, Akt, Stat3 のなかで、特に Stat3 が重要であることが示唆された。

高分化腺癌では、腺管構造、乳頭構造などの組織構築が保たれており、細胞間あるいは細胞基質間の接着が比較的保持された癌と考えることができる。今回の検討結果は、高分化腺癌と低分化腺癌の相違の新たな一面を明らかにしたものである。またさらに検討すべき点はまだ多いが、Met を分子標的とした治療を考える場合、単に HGF あるいは Met の発現では HGF-Met 系のシグナル活性化の評価は不十分であることを明確に示した点に意義があると考えている。

Met を介するシグナルは、細胞間接着(cadherin)、細胞基質間接着(integrin)に関与していて、それぞれの場合によって、シグナル伝達の経路、意義は異なると考えられる。細胞接着と Met 活性化によるシグナル伝達は、癌細胞の浸潤、転移に深く関与しており、その解明は、これからの浸潤、転移を標的とした肺癌治療において、重要になると考えられる。