

論文の内容の要旨

論文題目 : **Acyclic Retinoid Inhibits Human Hepatoma Cell Growth by Suppressing Fibroblast Growth Factor-Mediated Signaling Pathways**

和 訳: 非環式レチノイドは線維芽細胞増殖因子関連シグナル伝達経路を抑制することによりヒト肝癌細胞の増殖を阻害する

指導教員 : 小俣政男教授

東京大学大学院医学系研究科内科学専攻

医学博士課程

平成15年4月入学

氏名 : 邵潤軒

研究の背景及び目的

肝細胞癌(HCC)は発生率と死亡率が高い悪性腫瘍である。近年、ラジオ波焼灼療法(RFA)を始めとして、経皮的エタノール注入療法(PEIT)、経皮的マイクロ波凝固壊死療法(PMCT)、外科的切除、肝動脈塞栓療法(TAE)などの治療法の進歩に伴い、HCC患者の生存率は著明に改善したが、大部分のHCCは慢性C型肝炎と慢性B型肝炎をベースとして発生し、発見されたときには既に肝内転移などがあることも多く、長期予後は未だあまりよくない。従って、HCCに対して治療効果が良く、副作用の少ない化学療法を確立することは、HCC患者の長期予後を改善する良い方法であると考えられる。

非環式レチノイド(Acyclic retinoid, ACR)は新しく合成されたビタミンAで、既にラットでの化学物質による肝発癌とマウスでの自然発生肝癌を抑制することが報告され、ヒトでもHCC手術後の再発を予防し、非環式レチノイド投与群で非投与群に比し生存率が明らかに高いことが実証されている。しかも、他の抗がん剤に見られる様な深刻な副作用も

ないため、将来有望な化学療法として多くの研究者の興味を引いている。近年、非環式レチノイドによる HCC 発生の抑制作用のメカニズムとして、アポトーシス、Ras-Erk 1/2 signal pathway の抑制、細胞周期関連因子 Cyclin D1 の抑制などが報告されたが、その作用機序はまだ十分に解明されていない。

本研究の目的は非環式レチノイドによる HCC 再発を予防する作用の分子メカニズムを明確にして、非環式レチノイドが作用する標的分子を見つけ、将来的によりこの標的分子に特異性が高く、効率の良い薬剤を見つけるのにつなげることである。

方法

まず肝癌細胞 HepG2, HLF, HuH7 を用いて、MTT assay と直接細胞数を数える方法 (trypan blue dye exclusion method) の二つの方法で非環式レチノイドによる肝癌細胞の増殖に対する抑制作用を検討した。次に非環式レチノイドの肝癌細胞に対する増殖抑制作用の標的遺伝子を見つけるために、非環式レチノイドを添加したものと非添加の細胞核抽出物を使って転写因子 array を行った。また luciferase reporter assay で非環式レチノイドが NF- κ B、p53、APC/ β -catenin、SRF の四つの signal pathways に対して与える影響についても検討した。其のほか、luciferase reporter assay で SRF 関連因子である SRE、c-fos に対する非環式レチノイドの作用も検討し、免疫沈降法を用いて SRF の上流因子である Rho と Rac の活性に対する非環式レチノイドの影響も検討した。

非環式レチノイドの作用の標的分子をより明確にするために、われわれは自分らで作製した消化器病関連因子 cDNA microarray system (4300cDNAs を含む) と市販の Ace Gene Human Oligo Chip 30K subset A (Hitachi Software Engineering Co., Yokohama, Japan) (10,800 open reading frame oligo probes を含む) の 2 つのマイクロアレイを用いて非環式レチノイドの作用について検討した。非環式レチノイドを添加したものと非添加のものを比較して、線維芽細胞増殖因子受容体 3 (FGF receptor 3) への影響を luciferase reporter

assay と real time PCR と Western blot で検討した。更に、われわれは FGF receptor 3 を恒常的に強制発現する細胞株を作成して、これを用いて親細胞と比較して非環式レチノイドによる抑制作用をキャンセルできるか否かについても検討し、また、basic FGF を過剰量添加して非環式レチノイドによる抑制作用をキャンセルできるか否かについても検討した。

次にわれわれは FGF receptor 3 signal pathway が肝癌細胞の増殖に重要であることを証明するために、anti-FGF receptor 3 antibody が肝癌細胞の増殖と SRF reporter 活性に与える影響について検討し、また、RNA 干渉 (RNAi) の技術を使って FGF receptor 3 のノックダウンによる肝癌細胞増殖に対する影響も検討した。

結果

非環式レチノイドは濃度依存的に肝癌細胞 HepG2, HLF, HuH7 の増殖を抑制した。その IC50 はそれぞれ 45 μ M、10 μ M、45 μ M であった。その抑制作用は非環式レチノイドを添加後 48 時間から認められた。転写因子 array を用いた実験では、非環式レチノイドは 54 種類の転写因子に対して影響はなかったが、luciferase reporter assay では SRF signal pathway を抑制することが分かった。SRF の活性調節に強く関わる Rho の活性も非環式レチノイドにより抑えられることが確認された。

マイクロアレイの結果、Rho の活性に関与することが知られている FGF receptor 3 の発現が強く抑制されていた。この結果は FGF receptor 3 の promoter を用いた reporter assay、FGF receptor 3 の real time PCR と Western blot でも確認された。Reporter assay では非環式レチノイドは主に FGF receptor 3 の promoter 活性を抑制することが分かった。Real time PCR では FGF receptor 3 発現は、mRNA レベルで非環式レチノイド添加後 24 時間と 48 時間に著しい減少を認めた。Western blot では FGF receptor 3 発現は、蛋白質レベルで非環式レチノイド添加後 24 時間から 72 時間まで著しい減少を認めた。FGF receptor 3 を恒常的に強制発現する細胞株では親細胞と比較して非環式レチノイドによる HepG2 細胞の増殖抑制作用

用がキャンセルされることが確認された。basic FGFを過剰量添加しても同様のことが確認された。

Anti-FGF receptor 3 antibodyを使って、非環式レチノイドと類似のHepG2細胞の増殖抑制作用があることが明らかとなり（HepG2細胞の増殖は対照と比べて51.8%抑制された）、SRF reporter活性の抑制も認められた（対照と比べて55.7%抑制された）。RNAiの技術を用いて、HepG2細胞においてFGF receptor 3をノックダウンした。このノックダウンHepG2細胞では増殖が抑制されることも確認された。

結論

本研究では、われわれは初めて非環式レチノイドがFGF receptor 3の発現抑制を介して、Rho活性およびSRF mediated transcriptionを抑制して、最終的にHepG2細胞の増殖を抑制することを証明した。逆に、FGF Receptor 3を恒常的に強制発現あるいはbasic FGFを過剰量添加したら、非環式レチノイドによるHepG2細胞の増殖抑制作用は抑えられることも確認した。さらに、anti-FGF receptor 3 antibodyあるいはRNAiにより、FGF receptor 3発現を抑制すれば、非環式レチノイドと類似のHepG2細胞の増殖抑制作用が認められることも確認した。以上より、非環式レチノイドはFGF signaling pathwayの強力な抑制剤であり、FGF signaling pathwayを抑制することが将来的にも有望なHCC治療法であると考えられた。今後、非環式レチノイドより副作用が少なく、より効率的なFGF signaling pathway特異的阻害剤の開発が肝癌の新たな治療法につながるものと期待される。