

## [論文の内容の要旨]

論文題目 肝臓に対する新しい抗腫瘍療法の研究開発

—c-Jun N-terminal kinase 阻害剤と

マイクロバブル併用 High-intensity focused ultrasound 治療—

指導教員 小俣 政男 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

- 第一章：ラット肝臓細胞株における c-Jun N-terminal kinase 阻害剤の増殖抑制効果

転写因子 c-Jun とそのリン酸化酵素である c-Jun N-terminal kinase (JNK) は肝細胞の発生、肝再生や肝発癌において重要な働きをすると報告されている。肝臓細胞の増殖における JNK の役割を調べるために、特異的阻害剤 SP600125 の効果を検討した。

【方法】ラット肝臓細胞株である McA-RH7777 を用い、JNK 阻害剤 SP600125 を投与した。細胞増殖アッセイはテトラゾリウム塩の取り込みで検討し、proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の発現はウエスタンブロット分析を用いて行った。

【結果】SP600125 (40  $\mu$  M, 100  $\mu$  M) を加えて 20 時間培養することで、McA-RH7777 細胞の cell viability は各々  $86.2 \pm 7.0\%$ 、 $62.7 \pm 2.7\%$  と有意に低下した ( $P < 0.05$ )。PCNA の発現も各々、有意に低下した ( $P < 0.05$ )。

【考察】in vitro では、阻害剤による JNK の制御は、McA-RH7777 細胞の増殖を抑制する効果があった。第二章以降で in vivo での検討を行った。

- 第二章：ラット肝発癌モデルのエコーによる観察と c-Jun N-terminal kinase 阻害剤の抗腫瘍効果

肝細胞癌スクリーニングにおいて、エコー検査は結節性病変指摘の一般的な手段とされている。しかし、マウスやラットの化学発癌モデルをエコーで観察した報告は非常に限られている。本研究ではエコーを利用して、DEN 誘発のラット肝発癌モデルを観察し、前章で肝細胞癌治療の分子標的としての可能性が示された JNK 阻害剤を結節内に注入することにより、その有効性を評価した。

【方法】3週齢 Wistar 系雄ラットに 100 ppm に希釈した Diethylnitrosamine (DEN) を 6~8 週間、自由に飲水させた。投与開始 6 週間より 1 週毎に、肝結節の出現をエコーで観察した。結節のサイズを立体的に計測し、その組織を固定し、Hematoxylin-eosin (H-E)染色とラットの肝前癌マーカー酵素である Glutathione S-transferase placental form (GST-P)の免疫染色を行った。SP600125 を含む DMSO 溶液をエコーガイド下に結節に組織内注射し、7 日後に結節の体積変化を測定した。SP 群、DMSO 群および無投与群で結節の増大率(=注射 7 日後の結節の体積/注射前の結節の体積)を比較した。注射 24 時間後に核出した結節の PCNA の発現レベルの変化をウエスタンブロット分析で検討した。

【結果】ラット腹壁からのエコーによる観察で、肝臓は 4 つの肝分葉と主な血管系が明瞭に描出された。DEN を投与されたラットは、開始 6 週間後から肝内小結節が検出され、最小で直径が 1.6 mm の結節が描出された。免疫組織染色では GST-P 陽性であり、前癌病変である altered cellular foci と考えられた。結節のサイズと組織学的悪性度に関する検討から、直径が 4 mm 以上に増大すると、組織学的悪性度が増し、肝細胞癌の組織を示す結節が含まれた。4 mm 以上の結節に対して SP600125 溶液の組織内注射を行ったが、結節の縮小は認められなかったため、前癌病変であると考えられる直径が 2~4 mm の小結節を対象とした。結節の増大率は DMSO 群が  $1.7 \pm 0.88$ 、SP 群が  $0.47 \pm 0.16$  であり、DMSO 群に比べて SP 群は、有意な増大率の低下が認められた。SP 群の結節では PCNA の発現レベルは低下した。

【考察】ラット肝発癌のエコーによる観察は経時的な抗腫瘍効果の評価に有用であり、JNK 阻害剤の組織内注射により、前癌病変の増大率が低下した。肝細胞癌の再発予防対策において、JNK は多中心性発癌を抑制することで、新たなターゲット分子になる可能性がある。

- 第三章：ラット肝癌モデルにおけるマイクロバブル製剤を併用した効率よい High-intensity focused ultrasound 治療法の開発

切開や穿刺を要さない低侵襲な治療法として注目されている高密度焦点式超音波 (high-intensity focused ultrasound, HIFU)の機序は、超音波エネルギーを 1ヶ所に集中させ、熱に変換することによって、腫瘍を破壊、焼灼することが可能である。健常動物において、マイクロバブル製剤を併用することにより、局所での発熱上昇及び焼灼体

積の増加が認められることが報告されている。本章では、ラット肝癌モデルを作成し、肝細胞癌に対する新しい治療法として、マイクロバブル製剤を併用した HIFU 治療法の可能性を検討した。

【方法】4 週齢 Wistar 系雄ラットに DEN を 100 ppm に希釈して 8~12 週間、自由に飲水させた。投与開始 8 週後より 2 週毎に、肝腫瘍の形成をエコーで観察した。作成した肝癌モデルラットを麻酔下開腹し、マイクロバブル製剤である Levovist® を下大静脈から投与した(Levo 群)。コントロール群には生理食塩水を同様に投与した。両群とも 5 匹のラットを用い、13 個の肝腫瘍に対して HIFU(2.18 MHz, 600 W/cm<sup>2</sup>, 半径 40 mm) を照射した。Levovist もしくは生理食塩水を静注 60 秒後から 30 秒間照射した。照射した領域をエコーで観察した後、肝臓を摘出し、焼灼された領域の体積を計測した。

【結果】肝腫瘍の病理組織は、核小体が明瞭で、核/細胞質比の高い肝細胞癌であった。コントロール群では HIFU 照射部位に認められた高エコー領域の体積は 47.4±35.6 mm<sup>3</sup> であり、肝臓を摘出した後、肉眼的に計測した焼灼体積は 60.1±23.6 mm<sup>3</sup> であった。Levo 群では、高エコー領域の体積は 355±180.7 mm<sup>3</sup>、焼灼体積は 275.3±120.0 mm<sup>3</sup> であった。HIFU 照射前に Levovist® を投与することで、有意に焼灼体積の拡大が認められた( $P<0.001$ )。焼灼部位の病理組織の観察では、“Implosion cyst” といわれる空胞がみられ、焦点付近では細胞膜や核の消失を伴い、著明な細胞障害が認められた。

【考察】超音波造影剤として利用されているマイクロバブル製剤 Levovist® は HIFU による焼灼体積を拡大させることができ、HIFU 治療への応用が期待される。

#### ・ 第四章：ハイドロダイナミクス法によるラット肝での c-Jun の発現抑制

si RNA(small interfering RNA)は配列特異的に遺伝子の発現を抑制することから、医薬品として応用が期待されている。しかし、全身投与法におけるデリバリー技術が確立されておらず、局所投与以外での臨床応用は、まだ難しい段階である。si RNA を発現する sh RNA(short hairpin RNA)型ベクターを投与し、ラット肝臓において JNK の基質である c-Jun の発現抑制を試みた。

【方法】ラット c-Jun をターゲットとする 4 種類の sh RNA 発現ベクターをラット肝癌細胞株 McA-RH7777 にトランスフェクションした。3 日後に RT-PCR で c-Jun の mRNA 発現レベルの変化を測定した。4 週齢 Wistar 系雄ラット(100~120 g)の尾静脈から体重の 10%のリンガー液を 15 秒間で急速静注した(ハイドロダイナミクス法)。1 回の静注におけるプラスミドの投与量は 100 μg であった。3 日後に肝臓を取り出し、RT-PCR で c-Jun の mRNA 発現レベルを検討した。

【結果】McA-RH7777 細胞において c-Jun のノックダウン効果を確認した。ハイドロダイナミクス法を用いた *in vivo* siRNA 導入により、si RNA 投与 3 日後のラット肝臓における c-Jun のノックダウン効果が認められた。エコー上、注入された核酸溶液は、

下大静脈から逆行性に肝静脈へ流入していた。

【考察】非ウイルス性遺伝子導入法であるヒドロダイナミクス法は **siRNA** のデリバリー法としてマウスだけでなく、ラットでも有用であることが示された。