

論文の内容の要旨

論文題目：肝癌細胞の増殖及び浸潤における異常プロトロンビン（DCP）の役割に関する研究

指導教員：國土 典宏 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成19年4月 入学

医学博士課程

外科学専攻

稲垣 善則

【背景・目的】

肝細胞癌の腫瘍マーカーとして臨床的に利用されている異常プロトロンビン（以下 DCP）は、その血清値の上昇が門脈浸潤や肝内転移の発生と強く相関することが明らかとなっている。さらに、我々が過去に実施した免疫組織化学的研究においては、肝細胞癌の癌部組織やその周辺の非癌部組織において DCP の高発現が認められた患者群で予後が有意に悪化したことから、肝細胞癌の病態悪化への DCP の関与が示唆された。一方、臨床学的に証明されたその相関性に基づき、肝癌細胞の増殖に対する DCP の効果に関する検討が実施された。肝癌細胞の一種である Hep3B 細胞及び SK-Hep-1 細胞を用いた検討の結果、当該細胞の DNA 合成が DCP の添加によって活性化されることが見出されたほか、その増殖の活性化には細胞膜に存在する受容体型チロシンキナーゼである c-Met の活性化が重要であるという報告がなされた。また、DCP による肝癌細胞の増殖の活性化は移植癌モデルマウスを用いた *in vivo* 研究でも証明され、静脈内への DCP の投与によって移植癌組織の大きさが有意に増大した。従って、肝癌細胞より分泌される DCP が、c-Met 受容体を介して肝癌細胞に対して増殖因子様の効果を誘導することが明らかとなり、肝癌患者の病態悪化への DCP の直接的関連性が示唆された。しかし、前述したように DCP の高発現は癌細胞の脈管への浸潤や他の部位への転移といった病態と強く関連することが示唆されている

が、それらの現象における DCP の生物学的効果に関しては明らかではない。本研究では、肝癌細胞の増殖や浸潤に及ぼす DCP の生物学的効果を検討し、DCP の発現性と肝癌の病態との関連性についての解明を試みた。さらに、DCP による細胞増殖活性化のメカニズムにおいて主要因子として機能することが示唆されている c-Met に対する阻害剤を用いた *in vitro* 実験を実施し、肝癌細胞の増殖抑制における c-Met の機能阻害の有効性を検討した。

【方法】

複数種の肝癌培養細胞に対して 10~160 ng/mL の範囲の各濃度に調製した DCP を作用させ、24 時間後及び 48 時間後における肝癌細胞の増殖に対する効果を WST-8 ホルマザンの産生に基づく手法を用いて解析した。肝癌細胞の浸潤に対する DCP の効果を検討するために、人工マトリゲルを用いた Boyden chamber 法を実施した。同時に、癌細胞の浸潤における主要な現象であるタンパク質分解に関わる各種酵素の活性を測定する目的で、各濃度の DCP との共培養後の培養上清を材料とした Gelatin zymography 法を実施した。また、各濃度の DCP と共培養させた肝癌細胞の細胞溶解液を材料とした Western blot 法を実施し、肝癌細胞内における増殖及び浸潤に関連する各種タンパク質の発現性を解析した。そして、上記の DCP による肝癌細胞の増殖活性化効果において重要な役割を果たすとされている c-Met に対する阻害剤 SU11274 (pyrrole-indoline 化合物) を用いて、各種肝癌細胞の増殖抑制における c-Met の活性化阻害の効果を MTT 法に基づいて解析した。

【結果】

肝癌細胞の増殖は、解析を実施したいずれの細胞においても DCP の添加量依存的に亢進した。また、当該条件下における各種肝癌細胞のタンパク質の発現変化を Western blot 法により解析した結果、リン酸化型 c-Met の発現が DCP の添加量依存的に亢進していたことから、過去の研究において示唆されていた通り DCP の添加が c-Met の活性化を誘導することが認められた。一方、肝癌細胞の浸潤に対する DCP の影響を *in vitro* 下で実施する Boyden chamber 法にて検討した結果、飢餓条件下での DCP の添加によってマトリゲルを浸潤する肝癌細胞数が増加することが確認された。この DCP による肝癌細胞の浸潤能の活性化も、DCP の添加量依存的な傾向を示した。同時に、飢餓状態の条件下で培養した肝癌細胞に対して各種濃度の DCP を作用させて浸潤に関連するタンパク質の発現と活性化の状態を解析したところ、癌細胞の浸潤において主要な働きをする MMP-2 や MMP-9 の高発現及び活性化の亢進が DCP の添加量依存的に誘導された。従って、飢餓条件下における DCP の存在は、MMP-2 及び MMP-9 の発現上昇と活性化の亢進を介して肝癌細胞の浸潤を誘導する効果をもつことが示唆された。そして、この MMP-2 及び MMP-9 の高発現の誘導に貢献している細胞内

のメカニズムを解明することを目的として、飢餓条件下で培養した肝癌細胞に対して各濃度の DCP を 120 分間作用させた際の細胞内におけるシグナル伝達関連タンパク質の発現変化を解析した。その結果、多くの癌細胞において活性化が認められ、MMP-2 及び MMP-9 の高発現誘導にも重要な役割を果たすことが示唆されている c-Raf-MEK1/2-ERK1/2 シグナル伝達経路の各種因子の高発現が DCP の添加によって誘導されることが明らかとなった。この DCP による各種因子の高発現の誘導は、DCP の添加量依存的に顕著なものとして検出されたことから、当該伝達経路におけるリン酸化カスケードの活性化が DCP の添加量依存的に亢進しているものと考えられた。一方、上記の研究の結果により、DCP による各種肝癌細胞に対する増殖活性化効果は、活性化型 c-Met の発現亢進と深い関連性があることが過去の研究と同様に示された。そこで、本研究では c-Met の活性化を阻害する効果をもつ低分子化合物 SU11274 を用いて、肝癌細胞の増殖に対する当該物質の効果を検討した。その結果、HepG2 細胞をはじめとする種々の肝癌細胞に関して、SU11274 の添加条件下における細胞増殖の抑制効果を検出した。なお、増殖抑制効果が示される SU11274 濃度は肝癌細胞の種類によって異なったものの、2.5 μM 以上の濃度範囲では顕著な増殖抑制効果が共通して認められた。SU11274 を添加しない条件下と比較して肝癌細胞の増殖を 50% 阻害する時の SU11274 濃度を示す IC₅₀ 値は、肝癌細胞の種類及び SU11274 との共培養時間によって小規模な差があり、48 時間培養した場合は 6.35~8.24 μM 、72 時間培養した場合は 6.75~8.08 μM であった。さらに、DCP による肝癌細胞の増殖活性化への当該化合物の効果を検討する目的で、160 ng/mL の DCP 及び 2.5 μM の SU11274 を各種肝癌細胞に対して作用させて増殖への影響を解析した。その結果、160 ng/mL の DCP のみを添加した条件と比較して双方の物質を添加した条件ではいずれの細胞の増殖も有意に抑制された。従って、c-Met の活性化阻害は DCP によって誘導される肝癌細胞の増殖活性化効果を抑制できることが示唆された。

【結語】

肝癌細胞によって産生される DCP は、肝癌細胞の増殖及び浸潤を活性化させることから、DCP の高発現が肝癌の病態の説明に有用であることが示された。また、c-Met は DCP による種々の生物学的効果の誘導に重要であり、その阻害剤は肝癌細胞の増殖抑制効果の誘導に有効であることが示唆された。