

審査の結果の要旨

氏名 稲垣 善則

本研究は、肝細胞癌の腫瘍マーカーとして臨床学的に利用され、癌の脈管浸潤などの病態の悪化との相関性が示唆されている異常プロトロンビン（以下、DCP）がもつ癌細胞に対する生物学的効果を明らかにすることを目的に肝癌細胞を用いた各種生化学的解析を実施したものであり、下記に示すような結果を得た。

1. 各種肝癌細胞に対して 10~160 ng/mL の DCP を作用させ細胞の増殖に対する効果を解析した結果、いずれの細胞においても DCP の添加量依存的に増殖の活性化が認められた。また、細胞増殖に関連する受容体の発現量への DCP の効果を解析した結果、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、DCP の添加が c-Met の活性化を誘導することが確認された。
2. 各種肝癌細胞を無血清培養によって飢餓状態にさせた後、10~160 ng/mL の DCP と共にマトリゲル上に播種し Boyden chamber 法にて細胞の浸潤を解析した結果、DCP の添加によって浸潤細胞数が増加することが確認され、その傾向は DCP の添加量依存的であった。肝癌細胞の浸潤において重要な役割を果たすことが示唆されているタンパク質分解酵素 MMP-2 及び MMP-9 の活性及び発現量への DCP の効果をそれぞれ Gelatin Zymography 法及び Western blot 法によって解析した結果、MMP-2 及び MMP-9 の双方において DCP の添加による活性化の亢進と発現量の増加が認められた。なお、各種 MMP に関するこれらの効果も浸潤細胞数と同様に DCP の添加量依存的な傾向を示した。
3. 各種 MMP の発現量の増加に寄与することが示唆されているシグナル伝達経路である c-Raf-MEK1/2-ERK1/2 経路の活性化への DCP の効果を明らかにする目的で、当該因子のリン酸化型タンパク質の発現量を Western blot 法で解析した結果、飢餓状態の各種肝癌細胞を 160 ng/mL の DCP と 120 分間共培養することによりリン酸化型 ERK1/2 の発現量が有意に増加

した。そして、同一の培養時間において 10~160 ng/mL の DCP と共培養させた各種肝癌細胞における c-Raf 及び MEK1/2 の発現量を解析したところ、いずれの細胞においてもリン酸化型 c-Raf 及びリン酸化型 MEK1/2 の発現量の増加が DCP の添加量依存的な傾向で認められた。

4. 肝癌細胞表面上に発現する受容体型チロシンキナーゼである c-Met が DCP による細胞増殖の活性化において重要な役割を担うことが示唆されたことから、c-Met の活性化阻害剤である SU11274 を各種肝癌細胞に対して 0.625~10 μM の濃度で作用させ増殖への効果を解析した結果、細胞の種類によって傾向は異なったが 2.5 μM 以上の領域で顕著な増殖抑制効果を検出した。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ところ、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。

以上、本論文は DCP が肝癌細胞の増殖及び浸潤において重要な生物学的役割を担うことを示し、その高発現が肝癌の病態の説明に有用であることを明らかにした。受容体 c-Met の阻害剤が DCP による肝癌細胞の増殖活性化効果を抑制する結果と併せて、本研究は肝癌の病態進行メカニズムの解明や分子標的治療への応用に関する研究に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。