The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	PTK787/ZK222584 Ccmbined with Interferon Alpha and 5-Fluorouracil Synergistically Inhibits VEGF Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma
Author(s)	Katsura, Yoshiteru
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/26314
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨

Synopsis of Thesis

〔論文題名：Thesis Title〕**PTK787/ZK222584 Combined with Interferon Alpha and 5-Fluorouracil Synergistically Inhibits VEGF Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma**

（PTK787/ZK222584はIFN/5-FU併用化学療法と併用することで、肝細胞癌に対するVEGFシグナルを相乗的に阻害する）

専攻名 Division　：外科系臨床医学専攻　　学位申請者 Name　：桂　宜輝　　印

〔目　的〕

門脈内腫瘍栓など脈管侵襲を伴う高度進行肝細胞癌の予後は極めて不良であり、既存治療のみでは、ほとんどの症例が6ヶ月以内に死に至る。近年、進行肝癌に対する標準治療としてソラフェニブが保険収載となったが、門脈腫瘍栓症例に対する予後延長効果は乏しく、奏効率は1%未満であり十分とはいえない。教室では、約100例の門脈内腫瘍栓を伴う進行肝癌症例にインターフェロン-α（IFN-α）の皮下投与と5-FUの肝動注化学療法（IFN/5-FU併用化学療法）を応用し、良好な成績を得てきた。しかし、その奏効率は38.1%であり、さらなる治療効果の向上が予後改善には必要である。本研究では、肝細胞癌がhypervascularな腫瘍であり、その血管新生にVEGFが強く関与することに着目して、新規にVEGF受容体チロシンキナーゼ阻害薬であるPTK787/ZK222584（以下PTK）とIFN/5-FU併用化学療法の併用による抗腫瘍効果の増強とその作用機序を解析することを目的とした。

〔方　法〕

ヒト肝細胞癌株PLC/PRF/5、HuH7及び正常ヒト臍帯静脈内皮細胞HUVECを用い、*in vivo*ではHuH7によるヌードマウス皮下腫瘍モデルを作成し、IFN/5-FU療法へのPTK併用による抗腫瘍効果の増強に関して、無治療群、PTK群、IFN/5-FU群、PTK+IFN/5-FU併用群の4群間で以下の項目について検討した。1)PCNA免疫組織染色による増殖抑制効果、2)TUNEL法によるアポトーシス誘導効果、3)CD31免疫組織染色による抗血管新生効果、4) pAktの免疫組織染色及びWestern blot法によるAkt、ERK、p38MAPKのリン酸化の変化、5)Western blot法、細胞免疫染色及び免疫組織染色によるVEGFレセプター1/2（VEGFR1/2）の発現変化、及び免疫組織染色によるVEGFの発現変化、6)PLC/PRF/5の親株とIFN耐性株及びHUVECにおける増殖抑制効果を検討した。

〔成　績〕

PTKにIFN/5-FUを併用することで、1)PCNA陽性細胞が無治療群95.4±0.02%及びPTK/ZK群93.3±0.01%から85±0.01%と有意に減少(p=0.0016、p<0.001)、2)アポトーシス細胞は無治療群、PTK群と比して有意に増加(p<0.001, P=0.017)、3)新生血管数は無治療群、PTK群、IFN/5-FU群全てと比較して有意に減少した(p<0.001)。次に、4)*in vivo*において、pAktの癌部・血管部での染色を確認、さらにPTK+IFN/5-FU併用群ではわずかにAktのリン酸化が抑制されていた。また、*in vitro*では、肝癌細胞株・血管内皮細胞共にPTK+IFN/5-FU併用群では他の群と比して、pAkt, pERK, pp38MAPKの発現が抑制された。そこで、5)*in vivo*において、IFN/5-FU群とPTK+IFN/5-FU併用群でVEGFの発現の低下を認め、PTK+IFN/5-FU併用群ではVEGFR1の発現は無治療群と比較して低下しており、VEGFR2陽性細胞数は無治療群、IFN/5-FU群と比較して有意に減少した(p<0.001, P=0.003)。*in vitro*では、肝癌細胞株ではVEGFR1の発現変化はわずかであったが、HUVECにおいてはPTKを投与した群で発現低下を認めた。VEGFR2の発現は、肝癌細胞株とHUVECともにPTK+IFN/5-FU併用群で、無治療群と比べて低下していた。6)HUVECにおいてIFN/5-FUにPTKを併用することで有意にcell viabilityが低下した(p<0.05)。また、PLC/PRF/5のIFN耐性株では、IFN/5-FUに耐性を認めたが、PTKを併用することでPTK群よりも有意にcell viabilityの低下を認めた(p<0.05)。

〔総　括〕

IFN/5-FUにPTKを併用した治療は、肝癌細胞株及び血管内皮細胞におけるVEGF産生やVEGFレセプターの発現を制御し、細胞増殖抑制、アポトーシス誘導、さらには抗血管新生効果により、肝細胞癌に対するIFN/5-FUの抗腫瘍効果を増強し、今後の臨床応用への可能性が示された。

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　桂　宜輝

		（職）	氏　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	森　正樹
	副　査	大阪大学教授	野口道三郎
	副　査	大阪大学教授	竹原徹郎

論文審査の結果の要旨

肝細胞癌はhypervascularな腫瘍であり、その血管新生にVEGFが強く関与することに着目して、新規にVEGF受容体チロシンキナーゼ阻害薬であるPTK787/ZK222584（以下PTK）とIFN/5-FU併用化学療法の併用による抗腫瘍効果の増強とその作用機序を解析している。

ヒト肝細胞癌株PLC/PRF/5、HuH7及び正常ヒト臍帯静脈内皮細胞HUVECを用い、*in vivo*ではHuH7によるヌードマウス皮下腫瘍モデルを作成し、IFN/5-FU療法へのPTK併用による抗腫瘍効果の増強に関して検討した結果、肝癌細胞に対して、IFN/5-FUに加えて PTKを併用することで、1) 腫瘍増殖を抑制し、2)アポトーシスの誘導を認め、3)腫瘍内血管数は減少した。また、*in vitro*で、VEGFR-2の発現はPTKにより抑制され、IFN/5-FUを併用することで更に発現が低下し、*in vivo*では、IFN/5-FUにPTKを併用することで、VEGFR-1発現量とVEGFR-2陽性細胞数の減少を認め、さらにVEGF下流シグナルである、Akt、p38MAPK、Erkのリン酸化が抑制された。次に、血管内皮細胞に対してIFN/5-FUとPTK併用により 相乗的に増殖を阻害し、VEGFR-1、VEGFR-2の発現が減少し、さらに、下流シグナルであるAkt, Erk, p38MAPKのリン酸化がいずれについても抑制されることを確認した。

IFN/5-FUにPTKを併用した治療は、肝癌細胞株及び血管内皮細胞におけるVEGF産生やVEGFレセプターの発現を制御し、細胞増殖抑制、アポトーシス誘導、さらには抗血管新生効果により、肝細胞癌に対するIFN/5-FUの抗腫瘍効果を増強し、今後の新たな治療法になりうることが初めて明らかになった。

この内容は学位の授与に値すると考えられる。