



Title	Inhibition of tumor growth and invasion by a four-kringle antagonist (HGF/NK4) for hepatocyte growth factor
Author(s)	伊達, 和彦
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43189
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 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

氏名	伊達和彦
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16586 号
学位授与年月日	平成13年11月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Inhibition of tumor growth and invasion by a four-kringle antagonist (HGF/NK4) for hepatocyte growth factor (肝細胞増殖因子 (HGF) に対する4個のクリングル構造を持ったアンタゴニスト (HGF/NK4) による腫瘍増殖と浸潤の抑制)
論文審査委員	(主査) 教授 中村 敏一 (副査) 教授 高井 義美 教授 谷口 直之

論文内容の要旨

【目的】

癌死の原因は原発巣からの癌細胞の局所浸潤や遠隔転移による。癌の悪性度を反映する癌細胞の浸潤・転移能は、腫瘍細胞の接着性、腫瘍周囲細胞外基質の分解能、腫瘍細胞の運動性に依存している。また、癌細胞の増殖には腫瘍新生血管が必要であり、そのためには毛細血管内皮細胞の遊走や細胞外基質の分解が必要である。よって、癌細胞の浸潤・転移・腫瘍血管新生における過程をブロックすることは、癌の予防や治療のひとつとして有用であると考えられる。

以前より、癌の浸潤・転移・腫瘍血管新生において癌-間質相互作用が重要であることが指摘されていたが、最近、癌周囲の間質線維芽細胞から産生される肝細胞増殖因子 (HGF) が癌の浸潤・転移・血管新生を促進することが明らかになってきた。また、多くの癌細胞が HGF 誘導因子を産生していることも報告され、HGF は癌-間質相互作用の重要なメディエーターのひとつと考えられている。

HGF は元来肝細胞の増殖因子として発見・クローニングされたが、実際は増殖促進のみならず、細胞遊走の促進や形態形成能などを有する多機能因子である。私たちはこの HGF の作用をすべてブロックする HGF アンタゴニスト: HGF/NK4 の調製に成功したが、この HGF/NK4 は腫瘍細胞の増殖と浸潤を *in vitro* のみならず *in vivo* においても抑制することを明らかにするために以下の実験を行った。

【方法ならびに成績】

Fig. 1 培養ヒト胆嚢癌株細胞 GB-d1 細胞にヨードラベルした40pM の HGF を結合させ、あとからラベルしていない HGF と HGF/NK4 を濃度を変えて加え、GB-d1 細胞に結合しているヨードラベル HGF をガンマカウンターで調べた (A)。また培養 GB-d1 細胞に HGF、HGF/NK4 を添加した後、レセプター c-Met のリン酸化を調べた (B)。

HGF/NK4 は HGF レセプター c-Met へ結合し、その親和性は HGF の10分の1であった。また、HGF/NK4 はそれ自体 c-Met のリン酸化を起こさず、HGF の1000倍濃度加えると HGF によるリン酸化を完全に阻害することが示された。

Fig. 2 基底膜浸潤モデルとしてマトリゲルをコーティングした8ミクロンの穴が開いた膜の上に GB-d1 細胞を培養し、その下室の培養液に HGF、HGF/NK4 を加えて培養した。

なにも加えないと GB-d1 細胞はマトリゲルを溶かして膜の裏側に浸潤してこないが、HGF を加えると濃度依存的に浸潤は促進された。しかし、HGF/NK4 と同時に加えると、HGF/NK4 は濃度依存的に HGF による浸潤を抑制し、HGF の1000倍濃度ではほぼ完全に浸潤をブロックした。

Fig. 3 間質浸潤モデルとしてコラーゲン・ゲルの上 (A) と中 (B) に GB-d1 細胞を培養した。GB-d1 細胞はなにも添加しないとゲルの中に浸潤しないが (a)、HGF を110pM 添加するとゲルの中に浸潤した (b)。110nM HGF/NK4 添加では浸潤しないが (c)、HGF 110pM と1000倍濃度の HGF/NK4 を同時に加えると HGF による浸潤は完全にブロックされた (d)。

Fig. 4 ヒト胆管癌由来の HuCC-T1 細胞とヒト子宮癌由来の ME-180細胞をコラーゲン・ゲル内で三次元培養して HGF と HGF/NK4 の効果を調べた。結果は GB-d1 細胞と同様に、なにも添加しないと浸潤しないが、HGF によってゲル内に浸潤し、その浸潤は1000倍濃度の HGF/NK4 によって完全にブロックされた。また、HGF/NK4 では浸潤しなかった。

Fig. 5 癌-間質相互作用のモデルとして、ダブルチャンバーの下層にヒト胆嚢由来線維芽細胞を培養し、上層の 8 ミクロンの穴の開いた膜の上にマトリゲルをコーティングし、その上層に GB-d1 細胞を培養した。線維芽細胞と GB-d1 細胞を共培養すると、GB-d1 細胞の浸潤は著明に促進された。しかし、この系に HGF/NK4 を添加すると濃度依存的に GB-d1 細胞の浸潤は抑制された。

Fig. 6 線維芽細胞と GB-d1 細胞とを共培養すると、GB-d1 細胞の浸潤が著明に促進された理由として、GB-d1 細胞のマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 産生を HGF が促進する、あるいは線維芽細胞が産生する MMP 前駆体を GB-d1 細胞のウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (uPA) が活性化することが考えられる。

GB-d1 細胞の培養上清をゼラチンザイモグラフィで解析すると、MMP-9 産生は HGF によって濃度依存的に促進され、それは HGF/NK4 によって完全にブロックされた (A)。また、培養上清中の uPA 活性も HGF によって強く亢進され、それは HGF/NK4 によって完全にブロックされた (B)。

Fig. 7 動物レベルで HGF/NK4 が癌細胞の増殖・浸潤を抑制できるかを調べるために、GB-d1 細胞をヌードマウスの背部皮下に移植した。1週間後に腫瘍が形成されるが、その腫瘍に接するように HGF/NK4 を含んだ浸透圧ポンプを皮下に植え込んだ。

2週間持続的に HGF/NK4 を加えると癌の増殖は著明に抑制された (A)。そのときの組織を調べるとコントロールでは癌が筋肉内に浸潤しているのに対して、HGF/NK4 添加では癌の周囲組織浸潤は認められなかった。また、HGF/NK4 添加では多くの GB-d1 細胞がアポトーシスに陥っていた (B)。

Fig. 8 HGF/NK4 による GB-d1 細胞の効果を調べるために Fig. 7 で使用した組織を TUNEL 法と PCNA 染色で調べた。

HGF/NK4 によってアポトーシスに陥った細胞はコントロールの2.7倍であった (A)。また、PCNA 陽性細胞の数はコントロールの76%に減少していた。よって、HGF/NK4 の GB-d1 癌細胞の増殖抑制には、HGF の増殖促進作用をブロックする以外に、腫瘍血管新生抑制などアポトーシスを誘導する作用が考えられた。

【総括】

癌の浸潤・転移さらには腫瘍血管新生を抑制することは、新しい癌の治療・予防法となり得ると考えられる。最近、HGF は癌-間質相互作用のメディエーターのひとつとして、癌の浸潤・転移また腫瘍血管新生に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。

これまで HGF のアンタゴニストとして報告されてきたいくつかの HGF 分子内断片は、細胞遊走促進作用を有する不完全なアンタゴニストであったが、我々が開発した HGF/NK4 は、HGF のすべての活性をブロックする完全なアンタゴニストである。

今回我々は HGF/NK4 が *in vitro* のみならず実験動物においてもある種の癌細胞の増殖・浸潤を抑制しうることを明らかにした。以上の結果より、HGF アンタゴニスト：HGF/NK4 とおそらくその遺伝子は、癌の新しい治療法として有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、肝細胞増殖因子（HGF）の作用を特異的にブロックする HGF アンタゴニスト（NK4）の調製に成功し、その NK4 が HGF アンタゴニスト活性に加え、血管新生阻害活性という 2 つの活性を発揮することにより、癌の浸潤、転移、増殖を抑制することを明らかにしたものである。本研究は、HGF が癌の浸潤、転移といった癌の悪性化促進因子であることに基づいて行われた独創的研究であり、学位の授与に値すると考えられる。