



Title	Expression of ephrin-B1 in hepatocellular carcinoma : possible involvement in neovascularization
Author(s)	澤井, 良之
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45344
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	澤井良之
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 18266 号
学位授与年月日	平成 16 年 1 月 28 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Expression of ephrin-B1 in hepatocellular carcinoma: possible involvement in neovascularization (ヒト肝細胞癌における ephrin-B1 の発現と、その腫瘍血管新生に関する役割)
論文審査委員	(主査) 教授 金倉 謙 (副査) 教授 林 紀夫 教授 門田 守人

論文内容の要旨

【目的】

肝細胞癌は一般的に hypervascular な腫瘍である。腫瘍血管新生は血管内皮細胞が遊走、増殖、管腔構造を形成することにより完成するが、このようにして形成される新生血管は腫瘍の成長を促進させる役割を果たすと考えられる。腫瘍血管新生を抑制することは固形癌を制御する上で効果的であると考えられるが、その血管新生を引き起こす分子機構は必ずしも明らかになっていないのが現状である。

ephrin/Eph family は脳や体節のパターンを決定するのに重要な役割を果たすことが示されてきたが、近年、血管新生にも関与することが示唆されている。本研究は肝細胞癌における ephrin-Bs (B1-B3) の発現と血管新生への関与を明らかにすることを目的とする。

【方法ならびに成績】

ヒト肝細胞癌 26 例の切除組織における ephrin-Bs の発現を、定量 RT-PCR 法にて検討した。ephrin-B1 mRNA は全例において発現を認め、癌部における発現量は非癌部に比べ有意に増加していた。また、抗 ephrin-B1 抗体による免疫染色を行ったところ、主に肝癌細胞にて染色され、肝細胞癌における ephrin-B1 の発現が蛋白レベルにおいても確認できた。一方、ephrin-B2 mRNA も全例において発現を認めたが、その発現量は癌部と非癌部の間に有意な差を認めなかった。ephrin-B3 mRNA は 26 例中、癌部 2 例、非癌部 7 例にのみ発現を認めた。

次にヒト肝細胞癌において ephrin-B1 の発現が亢進している意義を明らかにするために、ephrin-B1-GFP fusion protein の発現プラスミドを lipofection 法にてヒト肝癌細胞株 PLC/PRF/5 cell に遺伝子導入し、ephrin-B1 過剰発現ヒト肝癌細胞株を樹立した。ephrin-B1 過剰発現細胞が mock に比べて、ephrin-B1 gene を高発現していることを定量 RT-PCR assay にて確認した。また蛍光顕微鏡にて、ephrin-B1 過剰発現細胞では ephrin-B1 発現部位である細胞膜で fusion protein である GFP が確認でき、蛋白レベルにて ephrin-B1 の高発現を確認できた。

ephrin-B1 の肝細胞癌の増殖への関与を検討するため、細胞培養系を用い 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay を行った。その結果、ephrin-B1 過剰発現細胞と control 細胞との間

に細胞増殖能では有意な差を認めなかった。また、**ephrin-B1** 過剰発現細胞を **ephrin-B1** の receptor である **Eph-Bs (B1-B3)** によって刺激しても、control 細胞に比し有意な差を認めなかった。次に *in vivo* における細胞増殖能について、**ephrin-B1** 過剰発現細胞をヌードマウスに接種し、腫瘍の体積をモニターすることにより検討した。**ephrin-B1** 過剰発現細胞により形成された腫瘍の増大率は明らかに control 群に比べ亢進していた。形成された腫瘍について HE 染色を行ったところ、**ephrin-B1** 過剰発現細胞により形成された腫瘍では control 群に比べ血洞の占める割合が大きくなっていた。さらに、腫瘍を抗 **CD31** 抗体にて免疫染色し、腫瘍内の血管内皮細胞数を検討した。**ephrin-B1** 過剰発現細胞により形成された腫瘍では control 群に比べ血管内皮細胞が有意に多く認められ、**ephrin-B1** により腫瘍血管の増生が促進されていることが明らかになった。

肝細胞癌における **ephrin-B1** の血管新生への関与をさらに明らかにするため、**ephrin-B1** が血管内皮細胞の増殖能、遊走能に及ぼす影響について検討した。血管内皮細胞は、**Eph-Bs (B1-B3)** の発現が認められる **human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)** を用い、細胞増殖能は **MTT assay** にて、遊走能は **modified Boyden chamber assay** にて検討した。**ephrin-B1** によって **HUVECs** を刺激したところ、濃度依存的に細胞増殖能、遊走能を共に促進させ、**ephrin-B1** が肝細胞癌において血管新生を促進していると考えられた。

【総括】

ヒト肝細胞癌における **ephrin-B1** の発現亢進が明らかとなり、**ephrin-B1** による腫瘍血管新生の促進作用が示唆された。

論文審査の結果の要旨

肝細胞癌は一般的に **hypervascular** な腫瘍であり、腫瘍血管新生の抑制は肝細胞癌を制御する上で効果的であると考えられるが、その血管新生を引き起こす分子機構は必ずしも明らかになっていないのが現状である。**ephrin-Eph family** は近年、血管新生に関与することが示唆されている。本論文は、ヒト肝細胞癌において、**ephrin-B1** が非癌部に比し発現量が有意に増加していることを明らかにした。また、**ephrin-B1** 過剰発現ヒト肝癌細胞、ヒト血管内皮細胞を用いた検討により、**ephrin-B1** が血管内皮細胞の細胞増殖能、遊走能を亢進させ血管新生を誘起することにより、腫瘍の増大、進展を促進させている可能性を示した。本論文は、ヒト肝細胞癌において腫瘍血管新生を引き起こす分子機構の一部を明らかにしたという点で、その意義は高い。よって本論文は博士（医学）の学位授与に値すると思われる。