



Title	Hepatoma-derived growth factor induces tumorigenesis in vivo through both direct angiogenic activity and induction of vascular endothelial growth factor
Author(s)	奥田, 偉秀
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45484
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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	奥 田 偉 秀
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 19291 号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	Hepatoma-derived growth factor induces tumorigenesis <i>in vivo</i> through both direct angiogenic activity and induction of vascular endothelial growth factor (HDGF の血管形成および VEGF 誘導による造腫瘍能獲得)
論文審査委員	(主査) 教授 川瀬 一郎 (副査) 教授 門田 守人 教授 林 紀夫

論文内容の要旨

【目的】

HDGF (hepatoma-derived growth factor) は、完全無血清培地にて増殖するヒト肝細胞癌由来培養株 Huh-7 の培養上清から Swiss3T3 線維芽細胞の増殖活性を有する蛋白としてクローニングされた。その後血管内皮細胞、平滑筋細胞、腎臓の糸球体および胎生期肝細胞に対して増殖活性を有することが報告されている。また、その遺伝子配列には核移行シグナルを有し、増殖活性発現における核移行の重要性、更にその増殖活性に関わる領域についても明らかとなってきている。HDGF は増殖速度が速く自立増殖能を有する胎生期の低分化な未熟肝細胞において高発現しており、Huh-7、HepG2 などの肝癌細胞に対しても増殖促進活性を示している。また、HDGF のアンチセンスオリゴヌクレオチド添加にて Huh-7、HepG2 細胞の増殖が抑制され、HDGF は肝癌細胞の増殖あるいは肝発癌に関与していることが示唆されている。最近、肝細胞癌、肺癌などにおける HDGF の発現と予後の関連も報告されている。そこで、癌化の過程における HDGF の役割を明らかにするため、HDGF 強制発現細胞を用いて造腫瘍能および造腫瘍能獲得における HDGF の血管形成誘導能について解析した。

【方法ならびに成績】

NIH3T3 細胞に myc-HDGF を transfection して stable transformants、NIH3T3-HDGF 細胞を作成した。2×10⁶ 細胞数の NIH3T3-HDGF 細胞を nude mouse 皮下に接種し、経時的に腫瘍形成能を解析した。NIH3T3-HDGF 細胞ではすべてのクローンの接種にて nude mouse に腫瘍の形成を認めた。しかし、wild、control (neomycin のみの選択) 株では腫瘍の形成は認められなかった。nude mouse に形成された腫瘍は赤みを帯び、血管に比較的富む腫瘍であった。HE 染色にて、形成された腫瘍内部に新生血管と思われる管腔形成が見られた。CD31 にて免疫組織学的に検討したところ、新生血管が CD31 にて染色された。HDGF が血管形成を誘導していることが示唆されたため、recombinant HDGF (rHDGF) を作製し、HUVEC の細胞増殖および tubular formation に対する効果を検討した。5×10³ 個/well の HUVEC に rHDGF を 24、48 時間後にそれぞれ添加し、96 時間後に細胞数をカウントしたところ、濃度依存的に HUVEC の細胞増殖を認めた (p<0.05)。次に rHDGF による HUVEC の tubular formation を

angiogenesis kit (Kurabo) を用いて検討した。ヒト線維芽細胞と HUVEC の co-culture に r HDGF を 3 日ごとに添加し、11 日目に CD31 により染色し解析した。tubule length を解析したところ、濃度依存的に tubular formation が促進された ($p < 0.05$)。以上より HDGF は angiogenic activity を有すると考えられた。そこで、更に、主要な血管新生因子である VEGF について検討した。VEGF promoter を組み込んだ plasmid を用いて、transient expression の系で、myc-HDGF の過剰発現による VEGF の発現誘導を reporter assay にて検討した。MOCK および HDGF の plasmid の濃度を 2 つに分けて検討、どちらの群においても、有意差 ($p < 0.05$) をもって HDGF の方で VEGF の転写の増加が見られた。さらに、NIH3T3 細胞に HDGF 組み込んだ plasmid vector を transfection し、transient expression の系で HDGF を過剰発現させ、VEGF の発現を Western blot にて経時的に検討した。HDGF は transfection 後、24 時間後より発現の増加が認められ、48 時間後でピークを示した。VEGF は 48 時間後より発現を認め、72 時間後において増加が認められた。以上より、HDGF は VEGF を誘導するものと考えられた。次に、VEGF の中和抗体による NIH3T3-HDGF 細胞の造腫瘍能の抑制効果を検討した。 2×10^6 細胞数の NIH3T3-HDGF 細胞を nude mouse 皮下に接種し、anti-VEGF 中和抗体を週 2 回、腹腔内投与し、経時的に腫瘍形成能を解析した。腫瘍増殖は anti-VEGF によって有意 ($P < 0.01$) に抑制された。

【総括】

HDGF は造腫瘍能を有していた。HDGF はそれ自体血管内皮細胞増殖活性を有しているが、更に VEGF 等の因子を誘導することにより新生血管形成を亢進させ、腫瘍形成を促進していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

HDGF (hepatoma-derived growth factor) は、各種癌細胞において高い発現を認め、また増殖活性を持っている。本論文において、発癌における HDGF の役割を明らかにするため、HDGF 強制発現細胞を用いて造腫瘍能および造腫瘍能獲得における HDGF の血管形成誘導能について解析を行った。NIH3T3 細胞を用いて HDGF の stable transformant、NIH3T3-HGDF 細胞を作成し、ヌードマウスの皮下に接種したところ腫瘍が形成され、しかも HDGF の発現量に相関してその腫瘍容積増加が大きかった。また、形成された腫瘍は赤みを帯び、血管に比較的富む腫瘍であった。recombinant HDGF により、濃度依存的に HUVEC の増殖および tubular formation が促進され、HDGF の angiogenic activity が認められた。Transient expression の系で、HDGF を過剰発現させることにより、VEGF の転写および蛋白発現が有意に亢進され、また形成された腫瘍においても VEGF が発現していた。NIH3T3-HGDF 細胞によってヌードマウスに形成された腫瘍は anti-VEGF 抗体によって抑制されたがブロックはできなかった。

以上より、本論文は、初めて HDGF が造腫瘍能を有し、さらに造腫瘍能獲得において自身による angiogenic activity に加え VEGF を誘導することにより腫瘍形成を促進していることを示した。今後の発癌研究において有意義な論文と思われ、学位に値するものと認める。