

Title	Pamidronate induced anti-proliferative, apoptotic, and anti-migratory effects in hepatocellular carcinoma
Author(s)	和田, 朗
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/47562
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	和田 朗 ^{あきら}
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 20769 号
学位授与年月日	平成 19 年 1 月 18 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	Pamidronate induced anti-proliferative, apoptotic, and anti-migratory effects in hepatocellular carcinoma (パミドロネートは肝細胞癌の増殖・遊走を抑制し、アポトーシスを誘導する)
論文審査委員	(主査) 教授 林 紀夫 (副査) 教授 金倉 譲 教授 門田 守人

論文内容の要旨

〔目的〕ビスフォスフォネート製剤は強力な破骨細胞機能抑制作用をもち骨粗鬆症の第一選択薬として広く使用されるほか、乳癌や前立腺癌などの骨転移の治療にも用いられている。近年ビスフォスフォネート製剤がメバロン酸代謝経路のファルネシルピロリン酸やゲラニルゲラニルピロリン酸の構造類似体として作用することによりメバロン酸代謝経路を抑制すると報告されている。低分子量 GTP 結合蛋白質のうち Ras ファミリーは細胞の増殖・分化を制御し、肝癌の増殖への関与も考えられている。また Rho ファミリーは細胞骨格や細胞接着、細胞運動に関与しており、私共は肝癌部において RhoA の発現が亢進している症例では肝切除後高頻度に再発、肝内転移を認めることを報告してきた。これらの低分子量 GTP 結合蛋白質はメバロン酸代謝産物による翻訳後修飾をうけることがその機能発現に必須である。今回私はビスフォスフォネートのひとつであるパミドロネートがヒト肝癌細胞の増殖や遊走、アポトーシスに及ぼす影響について明らかにすることを目的に検討を行った。

〔方法ならびに成績〕5種類のヒト肝癌細胞株 (HepG2、Hep3B、Huh7、PLC/PRF/5、Mahlavu) を用いて細胞増殖を MTT 法にて評価したところ、パミドロネートはヒト肝癌細胞株全てにおいて濃度依存性に増殖を抑制し、その IC₅₀ は 1~10 μM であった。BrdU ELISA 法で評価した DNA 合成も同様に濃度依存性に抑制した。Ras のファルネシル化に及ぼす影響については Western blot にて検討した。パミドロネートの濃度依存性に膜結合型 Ras は有意に減少し、その下流の MAPK シグナルにおいて ERK のリン酸化が抑制された。次にアポトーシスへの影響を評価した。パミドロネートを投与すると DAPI 染色にて核の凝集を伴うアポトーシス細胞が認められ、20 μM のパミドロネート添加では 72hr 後約 40% のアポトーシスが確認された。ヌクレオソーム ELISA 法にて経時的に濃度依存性にアポトーシスが誘導されることが確認された。またパミドロネートによるアポトーシス誘導時に Western blot にて Caspase-3 と Caspase-9 の活性化が認められたが、Bcl-2 については変化を認めなかった。パミドロネートによる腫瘍細胞の増殖抑制やアポトーシスの促進はファルネシルピロリン酸の前駆体である Farnesol 添加により減弱されたことから、ファルネシルピロリン酸の合成を阻害することが作用機序の一つと考えられた。肝癌細胞の遊走能については Boyden Chamber 変法にて評価した。PLC/PRF/5 細胞および Huh7 細胞において b-FGF の添加により亢進した細胞遊走能は、パミドロネートの投与により濃度依存性に抑制された。遊走能に関与する因子として RhoA のゲラニルゲラニル化に及ぼす影響を Western blot にて検討した。パミドロネートの濃度依存性に膜結合型 RhoA 及びそ

の下流の ROCK-1 が有意に減少した。*in vivo* の評価は PLC/PRF/5 細胞を皮下接種し、腫瘍を形成させたヌードマウスにパミドロネートを 0、1、2、4 mg/kg/day 連日腹腔内投与して行った。パミドロネート投与群では投与開始 3 週後有意に腫瘍の増殖が抑制され、その腫瘍内には TUNEL 陽性のアポトーシス細胞が多数認められた。一方、肝組織内ではアポトーシス細胞はほとんど認められなかった。

〔総括〕 パミドロネートは肝癌細胞の増殖・遊走を抑制し、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本研究で学位申請者である和田朗らは、ビスフォスフォネート製剤のパミドロネートがメバロン酸代謝経路を抑制することを利用して肝癌における抗腫瘍効果の解析を行った。その結果、パミドロネートは Ras の farnesyl 化や MAPKinase 系を抑制することにより細胞増殖能を抑えること、RhoA の geranylgeranyl 化や ROCK-1 発現を抑制することにより細胞遊走能を抑えること、Caspase-3・Caspase-9 を活性化することによりアポトーシスを促進することを明らかにした。さらに *in vivo* においてもパミドロネートは肝癌の増殖を抑制することを示した。

以上の研究成果より、パミドロネートが肝癌において抗腫瘍効果を有することが明らかとなり新たな肝癌の治療薬となりうることが示唆された。今後の癌治療の発展に大きく寄与するものであり、学位の授与に値すると考えられる。