



Title	Inhibition of Met/HGF receptor and angiogenesis by NK4 leads to suppression of tumor growth and migration in malignant pleural mesothelioma
Author(s)	鈴木, 芳典
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/58127">https://hdl.handle.net/11094/58127</a>
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</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	鈴木芳典
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第24130号
学位授与年月日	平成22年6月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学位論文名	Inhibition of Met/HGF receptor and angiogenesis by NK4 leads to suppression of tumor growth and migration in malignant pleural mesothelioma (悪性胸膜中皮腫に対するMet/HGF受容体阻害および血管新生阻害を介したNK4の制がん効果)
論文審査委員	(主査) 教授 上田 啓次 (副査) 教授 金田 安史 教授 奥村明之進

## 論文内容の要旨

## 〔 目 的 〕

悪性中皮腫は胸膜や腹膜を構成する中皮細胞に由来し、活発な浸潤性成長によって胸腔や腹腔に伸展・拡大する予後不良の悪性腫瘍である。とりわけアスベストへの曝露が悪性胸膜中皮腫の発症につながることから、悪性中皮腫による死亡者数は世界的にも増加し、日本国内での死亡者数は今後の数十年で10万人に及ぶと予測されている。しかしながら現在悪性中皮腫に対する有効な治療法は確立されていない。近年、悪性中皮腫患者におけるHGF (hepatocyte growth factor) やMet/HGF受容体の発現亢進が報告され、悪性中皮腫の発生・悪性化にHGF-Met系が関与することが示唆されている。本研究は悪性中皮腫の浸潤性成長におけるHGF-Met系の意義とNK4 (HGFアンタゴニスト・血管新生阻害分子) による制がん作用を明らかにすることを目的とした。

## 〔 方法ならびに成績 〕

7種の培養ヒト悪性中皮腫細胞株と正常中皮細胞を用いてMetの発現を調べた結果、全ての細胞においてMetの発現を確認し、7種中6種の中皮腫細胞は正常中皮細胞に比べMetの発現が増加していた。続いて悪性中皮腫細胞について、HGFによるMetの活性化とNK4による活性化抑制をウエスタンブロットで解析したところ、全ての細胞においてHGFはMetの活性化(チロシンリン酸化)を誘導し、NK4はMetの活性化をほぼ完全

に阻害した。さらにHGFが誘導する生物活性をNK4が阻害できるかを確認するためにin vitro 細胞遊走アッセイを行った結果、HGFは悪性中皮腫細胞の遊走を促進する一方、NK4は遊走を強く阻害した。

次に、NK4の制がん作用の解析を念頭に7種の悪性中皮腫細胞のマウス皮下への生着能を調べた結果、EHMES-10細胞だけが生着可能であったことからEHMES-10細胞を用いてHGFとNK4の作用を詳しく解析した。悪性中皮腫の特徴とも言えるのが周辺組織への活発な浸潤性成長である。そこで、浸潤性に対するHGFならびにNK4の作用を解析するためEHMES-10細胞をコラーゲンゲルに包埋し、3次元ゲル内での浸潤性を解析した。EHMES-10細胞はコラーゲンゲル内培養系で弱い浸潤性を示したが、HGFはゲル内浸潤性を強力に促進した。一方、NK4ならびに抗HGF中和抗体はHGFによるコラーゲンゲル内浸潤を阻害した。またコラーゲンゲル中のEHMES-10細胞の増殖に対するNK4の影響を調べた結果、細胞増殖はNK4によって容量依存的に抑制された。生細胞ならびに死細胞の定量および細胞周期分布の解析からNK4は細胞死を誘導するのではなく細胞増殖を抑制することが明らかになった。NK4によるコラーゲンゲル内での増殖抑制のメカニズムは不明であるが、この効果が抗HGF中和抗体では認められなかったことからHGF-Met系阻害とは異なるメカニズムで細胞増殖を抑制した可能性が示唆される。

上記の結果に基づきNK4の悪性中皮腫に対する制がん効果をin vivo実験系で解析した。ヌードマウスの皮下にEHMES-10細胞を移植し、腫瘍の生着、成長が確認された10日後からLacZ発現用もしくはNK4発現用組換えアデノウイルスベクターを腫瘍内に週に1度、計5回投与した。その結果、NK4遺伝子治療群ではELISAにより腫瘍組織内にNK4タンパク質の発現が認められた。継続的に腫瘍体積を測定した結果、NK4遺伝子治療により腫瘍体積は移植後8週目で対照の33%に抑制されていた。NK4遺伝子発現による腫瘍の成長抑制のメカニズムを解析するため皮下腫瘍組織のMetの活性化状態を調べた結果、Metは発現されているものの、対照群、NK4遺伝子治療群いずれもMetの活性化はほとんど見られなかったことから、成長抑制はNK4のHGF-Met阻害作用によらないと考えられた。一方、TUNEL法により腫瘍組織内のアポトーシス細胞を、CD31の免疫染色により腫瘍内血管新生を解析したところ、NK4遺伝子治療によりCD31陽性血管内皮細胞が有意に減少する一方、アポトーシス細胞が有意に増加していた。これらの結果からNK4は主に腫瘍血管新生の阻害を介して皮下腫瘍の成長を抑制したと考えられた。

## 〔 総 括 〕

現在、悪性胸膜中皮腫に対してペメトレキセドとシスプラチンの併用化学療法が用いられているがその効果は不十分で、同時に悪性中皮腫の特徴である活発な浸潤性を阻止することができれば薬物療法の有効性が高まると期待される。本論文において、HGF-Met系の活性化はヒト悪性中皮腫細胞における遊走や浸潤性の獲得・促進につながる一方、NK4はHGFによって引き起こされる活発な遊走や浸潤を強く阻害することを明らかにした。加えて、NK4はHGF-Met系阻害作用とは独立に血管新生阻害作用を発揮することによって悪性中皮腫の成長を抑制することを見いだした。NK4単独もしくはNK4と既存の治療法との併用療法は悪性胸膜中皮腫の浸潤性成長阻止につながる新たな治療法として期待される。

## 論文審査の結果の要旨

悪性胸膜中皮腫は既存の抗がん剤への反応性が低く予後不良であることに加えて、今後の患者数増加が見込まれている。悪性胸膜中皮腫の治療と医薬の研究は社会的意義も大きい。申請者らは悪性中皮腫細胞の活発な浸潤性を模倣する3次元培養系でHGF（肝細胞増殖因子）がヒト中皮腫細胞の3-D浸潤を強く促す因子である一方、NK4が3-D浸潤を阻害することを示した。さらにマウス皮下移植系でのNK4遺伝子治療モデルを用いて、NK4はHGF-Met系阻害作用ではなく、主に血管新生阻害作用を介して悪性中皮腫の成長を抑制することを明らかにした。本論文は悪性胸膜中皮腫の特徴である3-D浸潤性にHGF-Met系が重要な意義をもつことをはじめ明らかにするとともに、NK4がHGF-Met系阻害作用ならびに血管新生阻害作用の2つの活性を介して浸潤ならびに成長を抑制することを初めて示した。以上、本論文は学位に値するものと認める。