

松本幸二郎 論文内容の要旨

主論文

Antiangiogenic Property of Pigment Epithelium-Derived Factor
in Hepatocellular Carcinoma

肝細胞癌における Pigment Epithelium Derived Factor の
血管新生に対する影響と遺伝子治療への応用

松本幸二郎、石川博基、西村大介、濱崎圭輔、中尾一彦、江口勝美

Hepatology
2004 July;40(1):252-259

長崎大学大学院医学研究科内科系専攻
(指導教授：江口勝美)

【緒言】

癌の増殖には血管新生が必須であり、転移においても血管新生が重要な役割を果たしている。現在までに様々な血管新生促進因子、抑制因子が発見され、血管新生の分子機構も徐々に明らかとなってきた。近年、この血管新生を抑制することで腫瘍のDormancyを得ようとしたり、転移を抑制しようとする新しい治療が期待され、腫瘍血管新生阻害剤の開発が進められている。Pigment Epithelium Derived Factor(PEDF)はSERPIN familyの1つであり、主に神経、眼科領域で研究されており、最近angiostatinやendostatinなど他の内因性の血管新生抑制因子よりも強力な抑制作用を有すると報告された。今回我々は、腫瘍血管に富むという特徴を有する肝細胞癌において血管新生抑制因子PEDFを用いた治療は非常に有用と考え、より強力な治療法の開発を目的に基礎研究を行った。

【材料及び方法】

1) 肝癌細胞株における PEDF の発現

種々の肝細胞癌株(HepG2、HuH-7、PLC/PRF/5)における PEDF の発現を Northern blot、Western blot、Southern blot により検討した。さらに塩化コバルト並びにデスフェロキサミンを培養上清に添加した低酸素類似条件下での PEDF 発現の変化を検討した。また、同条件下で血管新生促進因子 VEGF の発現を ELISA にて検討した。

2) 臨床検体における PEDF 発現の検討

健常人、慢性肝炎、肝硬変、肝硬変を伴う肝癌の患者血清中 PEDF 濃度を ELISA で測定した。また、免疫沈降法で PEDF を除去した血清と除去していない血清を臍帯静脈血管内皮細胞

(HUVEC)に添加し、細胞増殖に与える影響を検討した。

3) PEDF 遺伝子導入による HUVEC に対する影響

PEDFcDNA を組み込んだ発現プラスミドを各肝細胞癌株(HepG2、HuH-7、PLC/PRF/5)に導入し、薬剤選択により stable clone を確立した。この培養上清を用い HUVEC の増殖、遊走に与える PEDF の影響を調べた。

4) PEDF 遺伝子導入による *in vivo* での影響

BALB/c nu/nu athymic mouse に 3×10^6 個の Huh7 を皮下注射し腫瘍を作成した。腫瘍が 60 ~ 100mm³ に達した時点より、pcDNA3-PEDF100 μ g をリポフェクチン法で腫瘍内に週 1 回 3 週間局注射し、腫瘍の増殖速度を検討した。また、RT-PCR で腫瘍での PEDF mRNA の発現を検討した。

【結果】

1) Huh7、HepG2 で PEDF の mRNA、蛋白の発現を認めたが、PLC/PRF/5 では検出できなかった。Southern blot ではいずれの肝癌細胞株においても PEDF 遺伝子増幅、欠失など認めなかった。また、低酸素条件下において、HepG2 では VEGF の分泌は亢進していたが PEDF は western blot で逆に低下していた。PEDF mRNA の発現は同条件下で差は認めなかった。

2) 健常人、慢性肝炎と比較し、肝硬変、肝硬変を伴う肝癌の患者では PEDF 濃度が低下する傾向であった。また、PEDF を除去した肝癌患者の血清と除去していない血清を HUVEC に添加したところ、細胞増殖に差を認めたことから血清中 PEDF は血管新生抑制効果を有することが示唆された。

3) PEDFcDNA を遺伝子導入した各肝癌細胞株において、その肝癌細胞自身の増殖に PEDF の影響は認めなかった。一方、培養上清は HUVEC の増殖と遊走を抑制した。

4) コントロールと比較し PEDF は腫瘍の増殖を抑制した。また、PEDF 遺伝子導入された腫瘍での PEDF mRNA の発現は亢進していた。

【考案】

各種肝癌細胞株における PEDF の発現は様々であり、転写あるいは翻訳レベルで調節を受けていると考えられた。患者血清中 PEDF 蛋白は血管新生抑制作用を有すると思われ、さらに PEDF 産生能と肝予備能との関連が示唆されることから、PEDF は肝癌の血管新生に対する一定の役割を果たしていると思われる。*In vitro* において、PEDF 高発現が血管内皮細胞の増殖、遊走を抑制した。Athymic mouse model では、PEDFcDNA をリポフェクチン法で直接腫瘍に局注射し PEDF 高発現状態を誘導することで、腫瘍中の PEDF 局所濃度を上昇させ、腫瘍増殖を抑制したと思われた。以上より、*In vitro*、*in vivo* いずれにおいても、PEDF を利用した肝癌に対する血管新生抑制遺伝子治療は有効な治療法となる可能性が示された。