

(後藤貴史) 論文内容の要旨

主 論 文

Tum-1, a tumstatin fragment, gene delivery into hepatocellular carcinoma suppresses tumor growth through inhibiting angiogenesis

肝細胞癌への Tum-1(タムスタチン断片)遺伝子導入は
血管新生抑制を介して腫瘍増殖を抑制する

後藤貴史 石川博基 松本幸二郎 西村大介 草場麻里子 田浦直太 柴田英貴
宮明寿光 市川辰樹 濱崎圭輔 中尾一彦 前島洋平 江口勝美

INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY 2008 Jul; 33(1): 33-40

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：中尾一彦教授)

緒 言

Tumstatin は血管基底膜成分の一つである IV 型コラーゲンの C 末端 $\alpha 3$ 鎖 NC1 ドメインの 28kDa の切断断片であり、 $\alpha v \beta 3$ integrin を介して血管新生抑制因子としての機能を持つ。これまで、Tumstatin によるヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) をはじめ種々の血管内皮細胞の増殖抑制が報告されている。一方、肝細胞癌は腫瘍血管に富む hypervascular tumor であり、血管新生抑制療法の有効性が期待される。我々はこれまでに Angiostatin、Pigment epithelium derived factor (PEDF) の血管新生抑制遺伝子を導入することで、ヌードマウス皮下移植肝細胞癌の増殖が抑制されることを報告してきた。今回、Tumstatin を用いた肝細胞癌に対する血管新生抑制遺伝子治療の基礎検討を行った。

対象と方法

1. Tumstatin の断片である tum-1 の cDNA を組み込んだ 6His tag を持つ plasmid (pSeqTag2B-tum-1) を作成。肝癌細胞株 (Huh-7, PLC/PRF/5) に lipofectin を用いて遺伝子導入し培養上清中の tum-1 (6His) の発現を western blotting にて確認した。PLC/PRF/5 では Zeocin を使い tum-1 の恒常発現株を作成した。
2. PLC/PRF/5 の tum-1 の恒常発現株自身の増殖をみるとともに、tum-1 を含む培養上清 (CM-tum-1) を PLC/PRF/5 に添加し増殖への影響を確認した。また一過性遺伝子導入後の Huh-7 増殖への影響をみた。コントロールとして遺伝子導入していない肝癌細胞株の培養上清 (CM-N)、pSeqTag2B (vehicle) を遺伝子導入した

培養上清(CM-Mock)、CM-tum-1をHis trapした培養上清(CM-tum-1 Δ His)を使用した。

3. tum-1を発現する肝癌細胞株の培養上清をHUVECに添加しproliferation assayとmigration assayを施行した。また、western blottingで細胞内シグナルについて検討した。VEGF添加による変化についても同時に検討した。
4. ノードマウス皮下に移植したHuh-7にtum-1を発現するplasmidをlipofectinと共に局注し、腫瘍の増殖速度をコントロールと比較した。また、移植した腫瘍を摘出し、血管密度を免疫染色(CD34, α SMA)で検討し、tum-1の発現をRT-PCRで確認した。

結 果

1. tum-1を遺伝子導入したHuh-7, PLC/PRF/5の培養上清中にtum-1(6His)の発現が確認された。
2. PLC/PRF/5のtum-1恒常発現株はコントロールと比較し増殖速度が軽度ながら有意に低下し、tum-1を含む培養上清の添加でも同様の結果が得られた。tum-1をHuh-7に一過性遺伝子導入するとHuh-7の増殖速度はコントロールと比較して有意に低下した。
3. tum-1発現肝癌細胞株の培養上清をHUVECに添加したところ、コントロールと比較してHUVECの増殖、遊走は有意に抑制され、Aktのリン酸化も抑制された。VEGFはHUVECの増殖、遊走を有意に促進し、AktとERKのリン酸化も促進したが、tum-1発現肝癌細胞株の培養上清を添加するとこれらのVEGFの作用は抑制された。
4. ノードマウス皮下にHuh-7を移植し、tum-1を発現するplasmidを局注したところ、コントロールと比較して腫瘍の増殖は有意に抑制された。腫瘍内の血管密度もコントロールと比較して有意に低下した。

考 察

今回、Tumstatinの断片であるtum-1が肝細胞癌株の増殖を直接抑制することが示唆された。Huh-7を含むいくつかの肝細胞癌株に α v β 3 integrinの発現がある事が報告されており、Tumstatinがメラノーマの増殖を抑制するとの報告もある。

今回、tum-1がHUVECのp-Akt, p-ERKを抑制することが明らかとなった。VEGFはPI3K-PKB/Akt signalingを通して血管新生を促進すること、血管新生抑制因子であるEndostatinはras-raf-ERK signalingを抑制して血管内皮細胞の遊走を抑制することから、tum-1はAkt, ERKのリン酸化抑制を介して、HUVECの増殖、遊走を抑制したものと考えられる。

Plasmid DNAの腫瘍内局注は侵襲が少ないと思われ、これを用いた血管新生抑制遺伝子導入での肝細胞癌の腫瘍増殖の抑制がみられたことは肝細胞癌の治療法への応用の可能性を示唆する。