

鬼丸康之論文内容の要旨

主 論 文

Autocrine and/or paracrine growth of aggressive ATLL cells caused by HGF and c-Met

肝細胞増殖因子（HGF）と c-Met のオートクライン/パラクライン機構による aggressive ATLL 細胞の増殖

INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY (in press)

鬼丸康之，塚崎邦弘，村田 健，今泉芳孝，崔 永林，長谷川寛雄，菅原和行，山田恭暉，林徳眞吉，中島正洋，田口 尚，間野博行，上平 憲，朝長万左男

長崎大学大学院医学研究科内科学専攻
(指導教授：朝長 万左男教授)

緒 言

成人T細胞白血病リンパ腫（ATLL）は多臓器に広汎に浸潤する難治性の成熟 T 細胞腫瘍である。我々は、慢性型および急性型 ATLL で純化白血病細胞の発現プロファイルを DNA chip で比較したところ、チロシンキナーゼ型受容体 c-Met の発現が急性型で高まっており、そのリガンドである HGF の血漿中濃度も同型で高値であったことを 2007 年に報告した。

目 的

ATLL の多段階発癌における c-Met/HGF 発現の意義の検討

方 法

c-Met、HGF、および間質細胞に HGF 産生を誘導する IL-6 について、①新鮮 ATLL 細胞、ATLL 細胞株(②IL-2 非依存性, ③IL-2 依存性)、④剖検肝組織を解析した。

①新鮮末梢血単核球：急性型 14 例、慢性型 7 例、健常人 6 例

②ATLL 細胞株（IL-2 非依存性）：Hut102

③ATLL 細胞株（IL-2 依存性）：KK1、ST1、S04、OMT、KOB、LMY-1、LMY2

④剖検例の肝組織：急性型 2 例

CD4、CD25 陽性細胞での c-Met の発現をフローサイトメトリー法(FCM)にて解析した。細胞株は分離なし、新鮮 ATLL 細胞では Ficoll にて単核球分離後にまずマウス抗ヒト c-Met MoAb(Do-24(Upstate))を反応させ、続いてマウス抗マウス IgG1-FITC(DAKO)を反

応させた後、CD4-perCP (DAKO) と CD25-PE (DAKO) で染色し 3 カラー FCM で解析した。

HGF 添加による増殖実験を MTS assay で行った。

48 時間培養後に CellTiter96Aqueous Non-Radioactive cell proliferation Assay (Promega 社) で測定した。

HGF human recombinant (SIGMA 社)、マウス抗ヒト HGF R(c-Met) Antibody (R&D 社) 及びマウス抗ヒト HGF Antibody (R&D 社) を使用した。

HGF, IL-6 の測定を ELISA 法で行った。

IL2 添加 48 時間培養上清または血漿で、Quantikine (R&D 社) を用いて HGF, IL-6 を測定した。

c-Met のリン酸化を免疫沈降法で解析した。

ラビット抗ヒト c-Met antibody (SC-10, SANTA CRUZ 社) を用いて免疫沈降を行いその後、マウス抗ヒト anti-phosphotyrosine antibody (4G10, upstate 社) を一次抗体、抗マウス P0 antibody を二次抗体として Western blot を行った。Stripping 後、SC-10 を一次抗体、抗ラビット-P0 antibody を二次抗体として同様に Western blot を行った。

剖検肝組織を免疫染色し、c-Met 及び HGF の発現を検討した。

一次抗体として SC-10 とウサギ抗ヒト HGF antibody (SC-7949, Santa Cruz 社) を 20 倍希釈で使用した。

結 果

FCM 解析では急性型 12/14 例、IL-2 依存性細胞株 2/8 例、慢性型 0/7 例が c-Met 陽性であった。急性型は c-Met 陽性の細胞株 KK1 と同様、新鮮 ATLL 細胞の HGF 添加時 DNA 合成を MTS アッセイで認め、これは抗 HGF 抗体または抗 c-Met 抗体で抑制された。患者血漿中の HGF の濃度は慢性型より急性型で有意に高値であった。新鮮 ATLL 細胞の IL-2 添加短期培養上清では、それぞれ一部の急性型および慢性型症例で HGF および IL-6 は高値であった。HGF 添加時の c-Met リン酸化を検討したところ、KK1 と同様に c-Met 陽性の急性型 ATLL 細胞ではリン酸化を認めたが、陰性例では認めなかった。肝浸潤した ATLL 細胞は c-Met と HGF が陽性であり隣接する間質細胞では、HGF が陽性であった。

考 察

c-Met 陽性の急性型症例では、HGF/c-Met 系のオートクライン/パラクライン機構による ATLL 細胞の増殖と肝臓浸潤の存在が示唆された。この系は、ATLL 治療の分子標的となる可能性がある。