

論文内容の要旨

論文提出者氏名 松村 篤

論文題目

HGF regulates VEGF expression via the c-Met receptor downstream pathways, PI3K/Akt, MAPK and STAT3, in CT26 murine cells

論文内容の要旨

血管新生は悪性腫瘍の進行に不可欠であるが、これには、様々なホルモン、サイトカイン、成長因子などが関わっている。その中の 1 つである VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) は、血管新生において特に重要な役割を担っている。VEGF 発現を制御する主要な転写因子は HIF1 α (Hypoxia-Inducible Factor-1 α) であり、低酸素条件下で安定・蓄積する。そして、HIF1 α は HIF1 β と二量体を形成して核内へ移行し、HRE (Hypoxia Responsive Element) と結合して VEGF 遺伝子の発現を促進する。

一方、HGF (Hepatocyte Growth Factor) は肝再生を担う有力な増殖因子として同定されたが、今や腫瘍-間質相互作用を仲介する多能性サイトカインとして認識されている。実際、HGF とその受容体である c-Met は様々な癌で高発現しており、予後との相関が見られる。さらに、HGF は腫瘍血管新生を促進することも分かっている。そこで、我々は間質由来の HGF が腫瘍細胞の VEGF 発現を促進させ、結果として腫瘍血管新生を促すのではないかと仮定した。

以前我々は、HGF アンタゴニストである NK4 が、マウス大腸癌細胞株 (CT26) 腫瘍の成長や血管新生を阻害することを示した。しかし、HGF/c-Met シグナルが、低酸素条件下の腫瘍環境の中で、VEGF 発現を制御するメカニズムは明らかでない。今回、HGF と VEGF の協調で誘導される血管新生のメカニズムの解明を行うことを目的とした。

CT26 に NK4 発現プラスミドを電気穿孔法により導入し、NK4 安定発現細胞株 (CT26-NK4) を樹立した。コントロール群として、MOCK 遺伝子導入細胞株 (CT26-NEO) を用いた。In vivo における NK4 による VEGF 発現への影響を調べるため、同系マウス (BALB/c female mice, 8-10w) に CT26 皮下移植モデルを作成した。腫瘍径が 10mm になると摘出し、移植片ホモジネート中の VEGF 濃度を ELISA 法で定量した。In vitro においては、CT26-NEO および CT26-NK4 を正常酸素/低酸素条件下で培養し、HGF、NK4、抗 HGF 抗体添加の有無による培養上清中の VEGF 濃度を比較した。さらに、HGF/c-Met シグナルの細胞内経路である PI3K/Akt、MAPK、STAT3 のそれぞれのインヒビターを添加し、培養上清中の VEGF 濃度を比較した。HIF1 α 転写活性には CT26-NEO および CT26-NK4 を各 signal pathway インヒビターで前処理し、正常酸素/低酸素条件下で HGF 添加のもと 8 時間培養した後、抽出した核タンパクを用いた。核タンパク中の HIF1 α の

DNA 結合活性を ELISA 法で定量的に測定した。また HIF1 α の発現はこの核タンパクを用いてウェスタンブロットング法で検出した。上記と同様の方法で Total RNA を抽出し、Real-time PCR を用いて、VEGF、HIF1 α RNA の発現を $\Delta\Delta$ Ct 法で解析した。

CT26-NK4 移植片のホモジネート中の VEGF 濃度は、CT26-NEO に比べて有意に低値であった。また、CT26-NEO の培養上清中の VEGF 濃度は、HGF 添加で上昇し、NK4 や抗 HGF 抗体添加で抑制された。低酸素条件下では、ベースラインの VEGF 濃度上昇がみられ、HGF、NK4、抗 HGF 抗体の添加による反応は正常酸素条件下と同様であった。一方、CT26-NK4 では CT26-NEO と比べ、ベースラインの VEGF 濃度が低値で、HGF 添加や低酸素条件でも VEGF 濃度上昇は抑制されていた。これらの結果より、CT26 細胞の VEGF 発現は、HGF/c-Met シグナルによって制御されており、NK4 は、たとえ低酸素条件下でも CT26 細胞の VEGF 発現を抑制した。また、PI3K/Akt、MAPK、STAT3 pathway のそれぞれのインヒビターを添加すると、正常酸素/低酸素条件下のいずれにおいても VEGF 発現が抑制された。このことは各 pathway が低酸素条件下で誘導される VEGF 発現の調節に関わっていることを示している。HIF1 α タンパクの合成や転写活性も、HGF 添加や低酸素条件下で上昇を認めたが、これらは、各 pathway のインヒビターで抑制された。CT26-NK4 の HIF1 α タンパクの合成や転写活性は、CT26-NEO と比べて、HGF 添加や低酸素条件下でも抑制されていた。すなわち、HGF/c-Met シグナルは HIF1 α の発現や転写活性を制御していた。VEGF mRNA 発現は HGF 添加や特に低酸素条件下で上昇した。これは、各 pathway のインヒビターで抑制された。また、CT26-NK4 の VEGF mRNA 発現は、CT26-NEO と比べて、HGF 添加や低酸素条件下でも抑制されていた。HIF1 α mRNA は低酸素条件により、同等かむしろ低下していた。HGF により誘導される HIF1 α mRNA は、STAT3 インヒビターによってのみ抑制された。このことから PI3K/Akt、MAPK pathway は HIF1 α タンパクの翻訳を、STAT3 pathway は HIF1 α mRNA 発現を制御することが示唆された。

今回の研究で、NK4 の抗腫瘍効果は、HGF/c-Met シグナルによる VEGF 発現を減弱させることによるという我々の仮説が、in vivo と in vitro の結果で支持された。さらに、HGF は PI3K/Akt、MAPK、STAT3 の活性化を介して、HIF1 α さらに VEGF の発現を促進すると考えられた。