

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	岸部 幹
学位論文題目			
<p data-bbox="204 611 1066 645">Production of NGF by Mouse Hepatocellular Carcinoma Cells</p> <p data-bbox="212 696 858 730">(マウス肝癌細胞による神経成長因子の産生)</p>			
<p data-bbox="1023 797 1150 831" style="text-align: right;">共著者名</p> <p data-bbox="1023 842 1350 875" style="text-align: right;">山田 能久、小川 勝洋</p> <p data-bbox="1015 943 1123 976" style="text-align: right;">未公表</p>			
研究目的			
<p data-bbox="172 1189 1430 1406">肝癌はヒトの代表的な悪性腫瘍のひとつであるが、発癌の分子メカニズムはほとんど分かっていない。一方、癌では様々な遺伝子発現の異常が見られるが、それらの異常は癌の生物学的特性と深く関わっている可能性がある。したがって、肝癌で特異的に発現異常を示す遺伝子を検出し、癌細胞におけるその働きを究明することは、発癌メカニズムの解明に役立つものと考えられる。マウス肝発癌モデルでは少数の癌関連遺伝子について発現異常が報告されているが、ゲノム全体について広く検討された報告はほとんどない。</p>			
<p data-bbox="172 1424 1430 1697">近年、細胞間の遺伝子発現の違いを比較する方法として cDNA array 法が開発された。cDNA array 法は、ナイロン膜などの支持体に遺伝子を数百から数万種類配列したものに、発現を調べたい組織や細胞由来の cDNA を hybridize させて各遺伝子スポットを数値化し、遺伝子発現量を調べる方法である。この方法では一度に多数の遺伝子発現を調べる事が可能で、かつ検出感度は極めて高い。我々は cDNA array 法によりマウス正常肝組織と肝癌について遺伝子発現の違いを検索し、nerve growth factor (NGF) の発現が肝癌で亢進している事を見出した。</p>			
<p data-bbox="172 1715 1430 2065">NGF は最も初期に発見された増殖因子で neurotrophin family に属し、神経細胞の分化や生存を促進することが知られている。NGF は細胞表面に発現している TrkA と p75NTR の 2 種類のレセプターと反応する。TrkA は細胞内ドメインに serine threonine kinase 活性を有し、様々の細胞内シグナル伝達により神経細胞の分化、生存に関わるが、p75NTR については不明な点が多くアポトーシスに関わる可能性や、TrkA の働きを補助する可能性が指摘されている。一方、NGF/NGF レセプターの発現は神経細胞以外に様々の細胞で見出されており、皮膚や免疫系細胞では重要な生理的機能をもつことが知られている。さらに近年、様々の癌細胞で TrkA、p75NTR の発現が見られることから、発癌のメカニズムにも関与する可能性も指摘されている。本研究ではマウス肝発癌モデルを用いて発癌における NGF の役割を検討した。</p>			

材 料・方 法

cDNA array: 肝癌は雄性 B6C3F₁ マウスに diethylnitrosamine (DEN) を生後 2 週目に投与して誘発した。肝癌組織は DEN 投与後 8~12 ヶ月でマウスを屠殺して採取し、肝癌および正常肝組織より mRNA を抽出してサンプルとした。cDNA array は 588 種類の遺伝子がスポットされている Clontech 社の Mouse Atlas cDNA expression array を用いた。サンプルの mRNA は reverse transcriptase、³²P-dATP を用いて cDNA に逆転写、標識したのち、cDNA array に hybridize した。メンブラン上の各遺伝子の発現は、densitometer を用いて数値化し、肝癌と正常肝で比較した。

RT-PCR: 多数の肝癌組織及び肝癌細胞株について RT-PCR により α 、 β -NGF の発現を検討した。また、正常発生過程の肝組織、部分肝切除後の再生肝及び初代肝細胞培養での NGF の発現も検討した。さらに、NGF レセプターである TrkA、p75NTR についても発現を検討した。

Northern blotting: 肝癌及び正常肝組織より抽出した mRNA を denaturing formamide/agarose gel にて電気泳動し、ナイロンメンブランに blot した。上記の RT-PCR にて増幅した fragment を TA クローニングベクターに組み込んでサブクローニングし、³²P-dCTP を用いランダムプライム法にて標識して probe とし、メンブランに hybridize した。さらにメンブランは Kodak X-OMAT film に over night expose し、オートラジオグラフィーを行った。

免疫染色: DEN 投与後 10 カ月のマウスの肝臓を 10%ホルマリン PBS にて灌流固定後、パラフィン包埋し、連続切片を作製した。各腫瘍病変は HE 染色により preneoplastic focus, adenoma, carcinoma (HCC) の 3 段階に分類した。免疫染色はウサギ抗 NGF 抗体及びマウス抗 Neuropeptide Y (NPY) 抗体を一次抗体として ABC 法にて行った。

Catecholamine 染色: 肝組織を短時間 Krebs-Ringer 液で灌流後、0.5% ホルマリン、2% glyoxylic acid 液にて固定した。肝組織はクリオスタットにて 10-20 μ m に薄切し、4% glyoxylic acid 液にてさらに incubation して乾燥したのち、glycerol にて封入して蛍光顕微鏡下で観察した。

NGF bioassay: ラット褐色細胞腫の cell line である PC12 細胞に肝癌細胞株の培養上清を加えて incubation し、4 日目での突起伸展がその細胞体より長いものを陽性とした。また、突起伸展が NGF により特異的に起こっていることを明らかにするため、NGF 中和抗体を用いた抑制実験もあわせて行った。

結 果

NGF の発現: 正常肝と肝癌での cDNA array による解析の結果、両者で発現差のある遺伝子が多数検出された。その中で α -NGF および β -NGF の肝癌での発現は、正常肝組織に対してそれぞれ 15.67 倍、4.05 倍と増加していた。正常肝、肝癌組織及び肝癌細胞株の多数のサンプルを用いて RT-PCR を行った結果、 α -NGF は 27 cycle、 β -NGF については 35 cycle ともに肝癌ではすべて陽性であった。一方、正常肝組織については 40 cycle PCR を行うと弱く発現が認められたが、 α -NGF については 27 cycle、 β -NGF については 35 cycle で発現が認められなかった。また、Northern blot 法では α -NGF、 β -NGF 共に肝癌で発現が認められたが、正常肝では検出できなかった。また、部分肝切除後の肝組織では術後 2 日目から、初代培養肝細胞では培養開始後 2 日目以降で持続的発現が見られた。しかし、発生成長過程の肝臓では生後 2 週目までは発現を認めず、成熟マウスのみ軽度の発現が認められた。免疫染色では NGF の発現は、正常肝組織では陰性であったが、全ての preneoplastic focus、adenoma、HCC で認められた。

NGF bioassay: 全例の肝癌細胞株培養上清で、陰性コントロールに比較して有意に PC12 細胞の突起伸展が認められた。また、NGF 中和抗体を用いた抑制実験では、中和抗体非存在下に比べて全例で有意に突起伸展が抑制された。

NGF receptor の発現: NGF レセプターである TrkA, p75NTR は、正常対照として用いた脳組織では発現が認められたが、正常肝、肝癌ともに発現は認められなかった。

NPY, catecholamine 染色: NPY 及び catecholamine 陽性の神経線維は正常肝組織ではグリソン鞘の主に肝動脈枝の壁に一致してわずかに見られた。一方、肝癌では枝分かれした動脈枝が強く発達しており、その壁に多数の NPY 及び catecholamine 陽性線維が認められた。またごくまれに腫瘍内に入る NPY 及び catecholamine 陽性線維も見られた。

考 察

本研究では、cDNA array 法によりマウス肝癌で NGF の発現が亢進していることが明らかになった。NGF は神経細胞の生存、維持に重要な働きをする因子であるが、免疫系、皮膚、胸腺などの非神経系組織にも重要な働きをもつことが知られている。また、最近 NGF は発癌に関与する可能性が指摘されており、前立腺癌、乳癌、膵癌などでは癌細胞の増殖、浸潤、転移を促進することが報告されている。しかし、多くの癌では NGF レセプターの発現が亢進しているが、腫瘍自体が NGF を産生する例はあまり知られていない。本研究では、RT-PCR、Northern blot 法、免疫組織化学により全てのマウス肝癌組織及び cell line で NGF の発現が亢進していた。さらに、NGF の発現は HCC のみでなく、focus、adenoma にも見られたことから肝発癌過程のきわめて初期から起こることが明らかとなった。また、NGF は部分肝切除後の再生肝、初代培養肝細胞でも増加しており、肝細胞の増殖に関与することが示唆された。しかし、増殖活性の高い胎児新生児肝では NGF が検出されなかったことは、NGF の発現は単に肝細胞の増殖活性の高さを反映するものではないと考えられた。

一方、肝癌では NGF レセプターの発現が認められないことから、NGF は肝癌細胞自身に作用せず、肝癌細胞以外の組織成分に作用するものと考えられた。肝組織には肝細胞以外に、胆管上皮、類洞内皮細胞、Ito 細胞、Kupffer 細胞などが存在するほか、交感神経、副交感神経線維が発達している。NGF は神経突起の伸展を強力に促進することや、交感神経は様々な組織で trophic 作用を持つことから、NGF は神経に作用して肝癌の増殖に関わっている可能性がある。肝組織には NPY、catecholamine 陽性の神経枝が分布していることから、肝癌組織についてそれらの分布を検討した。その結果、肝癌周囲の動脈壁で神経線維が強く増加している事が明らかになった。最近、NPY は強力な angiogenic factor であることや、神経細胞が vascular endothelial growth factor (VEGF) を産生することが報告されている。一方、肝癌は血管豊富な腫瘍であるだけでなく、血流支配が門脈優位から肝動脈優位へと変化することが知られており、血管新生は肝癌の発育に重要な因子である。したがって、肝癌細胞の産生する NGF は、神経線維の誘導を介して腫瘍血管新生を促進することにより paracrine factor として重要な働きをする可能性が考えられる。

結 論

1. cDNA array 法によりマウス肝発癌過程で、 α -NGF、 β -NGF の発現が亢進することを見い出した。
2. NGF は肝癌組織、肝癌細胞株、部分肝切除後の肝組織で発現増加を認めたことから、NGF は肝細胞の増殖に関与することが示唆された。
3. 肝癌では NGF レセプターである TrkA、p75NTR の発現が認められないことから NGF は、肝癌細胞自体に働くのではなく他の組織成分に作用すると考えられる。
4. 肝癌組織の周囲では血管にともなって神経線維が強く発達していることから、NGF は paracrine に作用して神経線維を増生させることにより血管新生に関与する可能性が考えられる。

引 用 文 献

- 1) Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA. *Science* 1995, 270: 467-470
- 2) Bothwell M (Ed.): Neuronal growth factors. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1991, 165
- 3) Zukowska-Grojec Z, Karwatowska-Prokopczuk E, Rose W, Rone J: Neuropeptide Y: a novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium. *Circ Res*. 1998, 83: 187-195

参 考 論 文

- 1) Ogawa K, Yamada Y, Kishibe K, Ishizaki K, Tokusashi Y: β -catenin mutations are frequent in hepatocellular carcinomas but absent in adenomas induced by diethylnitrosamine in B6C3F1 mice. *Cancer Res* 1999, 59: 1830-1833
- 2) 岸部 幹, 小川勝洋: マイクロアレイ *Med.Technol.* 1999, 27: 1180-1181