

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：34104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790865

研究課題名(和文) プロテインCインヒビターによるアノイクス誘導に基づく新規腎癌治療法の開発

研究課題名(英文) The development of a new treatment for renal cancer based on the induction of anoikis by protein C inhibitor

研究代表者

秋田 展幸 (AKITA, NOBUYUKI)

鈴鹿医療科学大学・医用工学部・助教

研究者番号：70597327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞増殖因子(HGF)による肝細胞におけるプロテインCインヒビター(PCI)発現に及ぼす影響と共にPCI発現B16メラノーマ細胞及び肝臓でヒトPCIを産生・分泌するヒトPCI遺伝子トランスジェニックマウスを用いて、細胞が発現するPCI及び血漿PCIの癌の増殖、転移に及ぼす影響について検討した。その結果、HGFは肝細胞におけるPCI産生を低下させることで癌の増殖を促進する可能性が示された。また、細胞が発現するPCI及び血漿PCIは癌細胞の増殖を阻害し、細胞が発現するPCIはその転移を阻害するが、血漿PCIはアノイクス阻害による転移の抑制というよりは凝固促進により転移を促進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the effect of hepatocyte growth factor(HGF) on protein C inhibitor(PCI) expression in liver cells, and the effect of cell-expressing PCI and host plasma PCI on the growth and metastasis of cancer using PCI-expressing B16 melanoma cells and PCI gene transgenic mice which secrete human PCI from their liver. We showed that HGF reduces PCI expression in the liver. Further, we suggested that both cell-expressing PCI and host plasma PCI inhibit cancer growth, and cell-expressing PCI inhibits its metastasis, whereas host plasma PCI promotes cancer metastasis by enhancing blood coagulation, not inhibition of anoikis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：プロテインCインヒビター 癌細胞 転移 アノイクス

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、腎臓ではプロテインCインヒビター (PCI) が近位尿細管上皮細胞 (Renal proximal tubular epithelial cells: RPTEC) で産生され、RPTEC 由来の腎癌では PCI の発現が著しく低下すること、およびその低下が腎癌部における DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMT) 1 の過剰発現に伴う PCI 遺伝子の転写調節領域中の特定の CpG 配列のメチル化に起因すること、さらには PCI 強制発現癌細胞を用いた時、PCI がそのプロテアーゼ阻害活性非依存的に *in vivo* での癌細胞の増殖、転移および血管新生を阻害することを見出した。また最近では、PCI による腫瘍の増殖の抑制が、PCI の血管新生抑制活性と共にその肝細胞増殖因子活性化因子 (HGFA) 阻害による活性型肝細胞増殖因子の低下に起因すること、および前者には PCI 分子上のヘパリン結合部位、および内皮細胞上のヘパリン様糖鎖が密接に関係することを明らかにしている。一方で、複数の研究グループにより、種々のヘパリン結合性セリンプロテアーゼインヒビターが特異的に、腫瘍の増殖、転移および血管新生を阻害すること、それらの血管新生阻害活性にはセリンプロテアーゼインヒビター分子上のヘパリン結合部位および内皮細胞上のヘパリン様糖鎖が密接に関係することが明らかにされたが、PCI の HGFA 阻害による癌細胞の増殖抑制活性、PCI およびヘパリン結合性セリンプロテアーゼインヒビターによる腫瘍の転移の抑制機序に関しては、いまだ明らかではない。他方、癌細胞はアノキス (anoikis: マトリクスとの相互作用を消失した細胞はアポトーシスを引き起こす現象) 抵抗性を有し、このアノキス抵抗性が、癌細胞の転移能に密接に関わることが知られているが、ごく最近、我々は腎癌細胞のアノキス抵抗性獲得には PCI の発現低下が密接に関係し、*in vitro* では腎癌細胞のアノキス抵抗性が、プロテアーゼ切断型

PCI の N 末端側領域 (N-terminal region of PCI: NT-PCI) により特異的に抑制されることを見出した。さらには PCI が HGFA の阻害を介して HGF の活性化を制御することから、PCI が活性型 HGF の生成の抑制を介して癌細胞の増殖を抑制する可能性を示唆してきた。

2. 研究の目的

本研究では、HGF による肝細胞における PCI 発現調節機構を明らかにするとともに、ヒト PCI と類似した発現臓器分布を有するヒト PCI 遺伝子トランスジェニック (hPCI-TG) マウスを用いて、*in vivo* での腎の癌化、増殖および浸潤・転移における PCI の役割を明らかにし、PCI を用いた腎癌治療の有用性について解析を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 初代培養ヒト肝細胞あるいは HepG2 細胞の培養上清中の PCI および proHGFA 濃度はそれぞれに特異的な ELISA 法を用いて検討した。それらの mRNA 発現については Real-time PCR 法を用いて検討した。

(2) 癌細胞にはマウス由来 B16 メラノーマ (B16) 細胞を用い、癌細胞の発現する PCI および宿主 PCI の癌細胞の増殖に及ぼす影響は、野生型 B16 細胞あるいは PCI 強制発現 B16 細胞を野生型マウスあるいは hPCI-TG マウスの腹部皮内に注入し、経時的に腫瘍径を測定することにより、転移能は、野生型 B16 細胞あるいは PCI 強制発現 B16 細胞を野生型マウスあるいは hPCI-TG マウスの尾静脈に投与し、2 週間後に肺転移数を計数することにより評価した。さらには、hPCI-TG マウスで認められた B16 細胞の転移促進に及ぼす抗ヒト PCI ウサギ IgG、あるいは可溶性トロンボモジュリンや活性型プロテイン C (APC) などの抗凝固薬の影響については、それぞれを尾静脈に野生型 B16 細胞投与日から 3 日間連続投与し、同様に肺転移数を計数することにより行っ

た。

4. 研究成果

(1) HGF は、ヒト初代培養肝細胞における proHGFA 産生には影響を及ぼさなかったが、PCI 産生をその濃度依存性に低下させた。HepG2 細胞についても初代培養肝細胞と同様に検討した結果、HGF は proHGFA の産生には影響しなかったが、PCI の産生をその濃度依存性に低下させ、その低下は HepG2 細胞における PCI mRNA 発現低下に起因することが明らかになった。各種細胞内シグナル伝達因子に対する阻害剤を用いた検討では、HGF による PCI の産生低下は、NFκB、p38MAPK および JNK インヒビターでは抑制されず、MEK インヒビターにより抑制されることが明らかになった。以上の結果から、PCI により活性型 HGF の生成が阻害されるが、逆に活性型 HGF は、肝臓における PCI の発現低下を惹起することにより、活性型 HGF による癌細胞の転移の促進に有利な環境をつくる可能性が示唆された。

(2) 野生型 B16 細胞の増殖は、野生型マウスに比較して hPCI-TG マウスで有意に低下するが、野生型 B16 細胞の転移は、野生型マウスに比較して hPCI-TG マウスで有意に促進された。一方で、hPCI-TG マウスにおける野生型 B16 細胞および PCI 強制発現 B16 細胞の増殖および転移は、両者ともに野生型 B16 細胞に比較して PCI 強制発現 B16 細胞で低下した。この hPCI-TG マウスで認められる野生型 B16 細胞の転移の促進は、抗ヒト PCI 抗体の投与により抑制されることが明らかになった。さらに、この hPCI-TG マウスに認められる野生型 B16 細胞の転移の促進は、抗凝固薬であるヒト APC および組換えヒトトロポモジュリンの投与によっても抑制されることが明らかになった。以上の結果から、宿主 PCI もまた癌細胞の増殖を抑制するが、その抑制には PCI による肝細胞増殖因子アクチベータ阻害

を介した活性型肝細胞増殖因子生成阻害等の癌細胞が発現する PCI とは異なる機構が関係する可能性があること、および宿主 PCI は、in vivo では、その向凝固活性に基づく癌細胞の転移促進作用が、そのアノイキス抵抗性抑制活性に基づく癌細胞の転移抑制作用に勝る可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 件)

[学会発表](計 7 件)

Akita N, Okamoto T, Nishioka J, Suzuki K, Hayashi T. Host protein C inhibits tumor cell growth, but promotes tumor cell metastasis by its procoagulant properties in vivo. 第 75 回日本血栓止血学会学術集会 2013 年 10 月 11-13 日 北海道

Akita N, Okamoto T, Nishioka J, Suzuki K, Hayashi T. Effect of protein C inhibitor on tumor cell growth and metastasis. 第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 11-13 日 横浜

Akita N, Okamoto T, Nishioka J, Suzuki K, Hayashi T. Hepatocyte growth factor down-regulates protein C inhibitor expression in hepatocytes via MEK pathway. The International Society on Thrombosis and Haemostasis June 29-July 4, 2013 Amsterdam

秋田展幸, 岡本貴行, 西岡淳二, 鈴木宏治, 林辰弥. 宿主プロテイン C インヒビターは癌細胞の増殖を抑制し転移を促進する. 第 35 回 日本血栓止血学会学術集会 2013 年 5 月 30 日-6 月 1 日 山形
秋田展幸, 北澤剛, 打田和代, 岡本貴

行, 西岡淳二, 鈴木宏治, 林辰弥. 肝細胞増殖因子は MEK を介して肝細胞におけるプロテイン C インヒビターの発現を低下させる. 第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 14-16 日 福岡

Akita N, Kitazawa T, Uchida K, Okamoto T, Nishioka J, Suzuki K, Hayashi T . Hepatocyte growth factor reduces protein C inhibitor expression in hepatocytes. 第 74 回日本血液学会学術集会 2012 年 10 月 19-21 日 京都

秋田展幸, 加藤千恵美, 北澤剛, 打田和代, 岡本貴行, 西岡淳二, 鈴木宏治, 林辰弥. 肝細胞増殖因子は肝細胞におけるプロテイン C インヒビターの発現を低下させる. 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 2012 年 6 月 7-9 日 東京

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.suzuka-u.ac.jp/education/engineering/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋田 展幸 (AKITA NOBUYUKI)

鈴鹿医療科学大学・医用工学部・助教

研究者番号: 70597327

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし