

口腔扁平上皮癌細胞の浸潤におよぼすHGFの影響

学位論文内容の要旨

緒言

医学の進歩により癌の治療成績は向上したが、一方で遠隔臓器に転移をきたした場合には治療が困難となり致死的となる。このため、癌の浸潤転移機構の解明が急がれているが、そのメカニズムは複雑で未だ不明な点が多い。また癌の浸潤転移は、癌細胞自身と周囲間質細胞組織の相互作用により成り立ち、癌細胞自身の性格に加え、間質細胞の産生する増殖因子やサイトカインによって影響を受けることが報告されている。

HGF (hepatocyte growth factor) は、肝再生因子として1984年に発見され、上皮細胞の増殖促進、細胞運動促進、細胞分化促進など多様な生物活性を持つことが報告されている。またHGFは線維芽細胞などの間葉組織由来細胞によって産生分泌され、HGFレセプターである c-met を持つ上皮細胞に作用し、その増殖や機能を制御するバラクライン因子としての作用が特徴である。最近になり、HGFは正常細胞のみならず癌細胞に対しても作用し、種々の癌細胞の浸潤、転移を強力に誘導することが明らかにされ、胃癌、肺癌などでは原発組織中の c-met の発現とHGFレベルが、悪性度ならびに予後と相関することが報告されている。しかしながら、HGFが癌細胞の浸潤転移能を活性化する機序には不明な点が多く、また、口腔扁平上皮癌についての報告は少ない。

そこで本研究では、HGFが口腔扁平上皮癌細胞の浸潤転移におよぼす影響とそのメカニズムを明らかにする目的で、癌細胞の *in vitro* 運動能ならびに浸潤能、細胞外マトリックス分解酵素産生能におよぼす影響について検索するとともに、*in vitro* 三次元浸潤モデルを作製しその生物学的活性について検討した。

材料ならびに方法

ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株HSC3と二種類のヒト線維芽細胞株MRC5、Gin1を用いた。HGFはリコンビナント・ヒトHGF、HGF抗体は抗ヒトHGFモノクローナル抗体 (HGF α 鎖を認識) を用いた。

各細胞のHGFならびに c-met タンパクと mRNA の発現をウエスタンブロット法およびノーザンブロット法を用いて検索し、HGFならびに線維芽細胞の培養上清が癌細胞の *in vitro* 運動能ならびに浸潤能に及ぼす影響を、それぞれポイデンチェンバー、マトリゲルを用いて検索した。次に *in vitro* 三次元浸潤モデルを作製し、浸潤基質の違いによる癌細胞の浸潤動態を形態学的に観察した。続いて HGF が癌細胞の細胞外マトリックス分解酵素、特にマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 産生に及ぼす影響を検索するために、HGF を添加した無血清培地で癌細胞を培養し、MMP 遺伝子の発現をノーザンブロット法でさらに分解酵素の活性をザイモグラム法で検索した。

結果

1) HGF ならびに c-met (HGF レセプター) の発現

c-met は癌細胞の HSC3 に認められ、HGF は線維芽細胞である MRC5、Gin1 に認められた。HGF の発現は mRNA ならびにタンパクレベルにおいても Gin1 に比べ MRC5 で高く、さらに培養上清中に分泌された HGF 濃度も Gin1 に比べ MRC5 で高かった。

2) HGF ならびに線維芽細胞培養上清の癌細胞の *in vitro* 運動能、浸潤能に及ぼす影響

癌細胞の運動能、浸潤能は、HGF ならびに線維芽細胞の培養上清により亢進し、抗 HGF 抗体で抑制された。

3) *in vitro* 三次元浸潤モデルにおける癌細胞の浸潤動態の検索

癌細胞と線維芽細胞を混入したコラーゲンゲルによる三次元浸潤モデルでは、癌細胞のゲル内への浸潤は HGF 高産生性の MRC5 で著しく、HGF 低産生性の Gin1 では浸潤傾向を示さなかった。さらに、癌細胞と線維芽細胞を含まないコラーゲンゲルによるモデルでは、HGF を添加することにより癌細胞がゲル内へ浸潤することが観察され、この現象は I 型コラーゲン単独ゲルに比べ I 型と IV 型の混合ゲルで著明であった。

4) HGF の MMP 産生に及ぼす影響

HGF 添加無血清培地で培養した HSC3 では、HGF の濃度に比例して転写因子 E1AF mRNA の発現が亢進し、同時に MMP-1、3、9 mRNA の発現も亢進した。さらに同培養上清を用いたザイモグラムでは、HGF の濃度に比例して 92KD-IV 型コラーゲナーゼ (MMP-9) の増加が認められた。

考察

癌の浸潤転移は多数の過程を経て起こる複雑な生体现象であると考えられ、この過程には癌細胞の運動、基底膜成分の分解、癌細胞と基底膜の接着の 3 つの要素が関与している。癌細胞が周囲組織に浸潤していく際には、基底膜や結合組織の構成タンパクを局所的に

分解する種々のプロテアーゼの作用が不可欠で、なかでも癌細胞の浸潤転移にはMMPが重要な役割を果たしていることが報告されている。本研究では、このうち特に基底膜構成成分であるIV型コラーゲンを分解するIV型コラーゲナーゼ（MMP-2、MMP-9）に着目し、HGFがMMP産生に及ぼす影響について検討した。

in vitro 三次元浸潤モデルによる形態学的検索では、コラーゲンゲル内への浸潤はHGF高産生性のMRC5で著しく、HGF低産生性のGin1では癌細胞は重層化するのみでゲル中への浸潤傾向は示さなかった。またHSC3単独モデルでは、培地にHGFを添加することにより癌細胞がゲル内へ浸潤することが観察された。これらの結果は、HGFの添加により癌細胞の分泌する細胞外マトリックス分解酵素産生が亢進したことを示しており、さらに癌細胞の浸潤はI型コラーゲン単独に比べIV型コラーゲンを含むゲルで強かったことから腫瘍細胞のIV型コラーゲン分解酵素産生亢進を強く反映しているものと思われた。遺伝子レベルの解析においても、HGFの刺激により癌細胞のMMP-1、3、9 mRNAの発現が特異的に誘導され、ザイモグラムによりタンパクレベルでのMMP-9の酵素活性が亢進することが確認された。

遺伝子レベルでの解析から、HGFによるMMP-1、3、9の転写レベルでの活性化が強く示唆されたため、MMP遺伝子の転写制御領域の解析を行った。E1AFは1993年に報告された *ets-oncogene family* に属する転写因子で、MMPの転写制御領域に存在する *ets-binding site* に結合してMMP-1、3、9の転写を活性化することが示されている。E1AF遺伝子を導入しE1AFを強制発現させた癌細胞ではMMPの転写が亢進し、その結果MMPの分泌が増加し浸潤転移能が増強されることや、高浸潤性の癌細胞ではE1AFならびにMMPの発現が強く、逆に低浸潤性の癌細胞ではE1AFならびにMMPの発現が弱いことが示されている。

本研究では、HGFの刺激によりMMPの転写因子の一つであるE1AF mRNAの発現も同時に促進されたことから、HGF/c-metによる細胞内シグナル伝達経路の下流に転写因子E1AFが存在し、E1AFを介してMMPの転写亢進が生じ、その結果MMPの産生が増加して癌細胞の浸潤性が増強されることが示唆された。

結語

本研究の結果から、間質細胞由来のHGFは癌細胞の運動性を亢進させると共に、転写因子E1AFの活性化を介して細胞外マトリックス分解酵素であるMMP遺伝子の転写を亢進させることが明らかになった。これらのことから、HGFは口腔癌の浸潤にも大きな役割を演じていることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 中 村 太 保
副 査 教 授 雨 宮 璋
副 査 教 授 福 田 博

学位論文題名

口腔扁平上皮癌細胞の浸潤におよぼすHGFの影響

審査は審査担当者全員が一堂に会して行われた。
まず、論文提出者に研究内容の概要の説明を求めた。

癌の浸潤転移は多数の過程を経て起こる複雑な生体現象であると考えられ、この過程には癌細胞の運動、基底膜成分の分解、癌細胞と基底膜の接着の3つの要素が関与している。また癌の浸潤転移は、癌細胞自身と周囲間質細胞組織の相互作用により成り立ち、癌細胞自身の性格に加え、間質細胞の産生する増殖因子やサイトカインによって影響を受けることが報告されている。

HGF (hepatocyte growth factor) は、肝再生因子として1984年に発見され、上皮細胞の増殖促進、細胞運動促進、細胞分化促進など多様な生物活性を持つことが報告されている。またHGFは線維芽細胞などの間葉組織由来細胞によって産生分泌され、HGFレセプターである c-met を持つ上皮細胞に作用し、その増殖や機能を制御するパラクリン因子としての作用が特徴である。最近になり、HGFは正常細胞のみならず癌細胞に対しても作用し、種々の癌細胞の浸潤、転移を強力に誘導することが明らかにされ、胃癌、肺癌などでは原発組織中の c-met の発現とHGFレベルが、悪性度ならびに予後と相関することが報告されている。しかしながら、HGFが癌細胞の浸潤転移能を活性化する機序には不明な点が多く、また、口腔扁平上皮癌についての報告は少ない。

そこで本論文提出者は、HGFが口腔扁平上皮癌細胞の浸潤転移におよぼす影響とそのメカニズムを明らかにする目的で、癌細胞の *in vitro* 運動能ならびに浸潤能、細胞外マトリックス分解酵素産生能に及ぼす影響について検索するとともに、*in vitro* 三次元浸潤モデルを作製しその生物学的活性について検討した。

材料および方法

ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株HSC3と二種類のヒト線維芽細胞株MRC5、Gin1を用いた。HGFはリコンビナント・ヒトHGF、HGF抗体は抗ヒトHGFモノクローナル抗体 (HGF α 鎖を認識) を用いた。

各細胞のHGFならびに c-met タンパクと mRNA の発現をウエスタンブロット法およびノーザンブロット法を用いて検索し、HGFならびに線維芽細胞の培養上清が癌細胞の *in vitro* 運動能ならびに浸潤能に及ぼす影響を、それぞれポイデンチェンバー、マトリゲルを用いて検索した。次に *in vitro* 三次元浸潤モデルを作製し、浸潤基質の違いによる癌細胞の

浸潤動態を形態学的に観察した。続いてHGFが癌細胞の細胞外マトリックス分解酵素、特にマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 産生に及ぼす影響を検索するために、HGFを添加した無血清培地で癌細胞を培養し、MMP遺伝子の発現をノーザンブロット法で、さらに分解酵素の活性をザイモグラム法で検索した。

実験結果および結論

- 1) c-met (HGFレセプター) は癌細胞のHSC3に、HGFは線維芽細胞であるMRC5、Gin1に認められた。HGFの発現は mRNAならびにタンパクレベルにおいてもGin1に比べMRC5で高かった。
- 2) 癌細胞の運動能、浸潤能は、HGFならびに線維芽細胞の培養上清により亢進し、抗HGF抗体で抑制された。
- 3) 三次元浸潤モデルにおいて、HGF添加により癌細胞はコラーゲンゲルを分解してゲル中に浸潤した。また癌細胞と線維芽細胞を混入したコラーゲンゲルによるモデルでは、癌細胞の浸潤はHGF高産生性のMRC5で著しく、HGF低産生性のGin1では浸潤傾向を示さなかった。
- 4) HGF添加により転写因子E1AF mRNAの発現が亢進し、同時にMMP-1、3、9 mRNA の発現も亢進した。さらにタンパクレベルでも92KD-IV型コラーゲナーゼ (MMP-9) の増加が認められた。
- 5) 本研究の結果から、間質細胞由来のHGFは癌細胞の運動性を亢進させると共に、転写因子E1AFの活性化を介して細胞外マトリックス分解酵素であるMMP遺伝子の転写を亢進させることが認められた。これらのことから、HGFは口腔癌の浸潤にも大きな役割を演じていることが示唆された。以上が本論文の要旨である。

続いて、各審査担当者から以下の様な種々の質問がされた。

- 1) 実験法に関する詳細。
 - 2) 本研究に関連する他の研究の状況。とくに癌細胞の運動性に関してHGFと細胞接着因子、細胞骨格との関係についての詳細。さらに本研究に用いた細胞株以外の癌細胞での状況の詳細など。
 - 3) 本研究の独創性。
 - 4) 本研究の今後の発展性および臨床応用。
- これらの各質問に対して、論文提出者からそれぞれ明快な説明および回答が得られ、本論文提出者が本研究を中心に広い学識を有することが認められた。また、本研究内容も高く評価された。以上より、本論文提出者が博士 (歯学) の学位授与に値するものと認められた。