



Intraperitoneal infusion of recombinant plasminogen activator inhibitor type 2 induced apoptosis in implanted human colon cancer and inhibited its growth and liver metastasis

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2010-10-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 諏訪, 大八郎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1960

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 469号	学位授与年月日	平成21年9月18日
氏 名	諏訪 大八郎		
論文題目	Intraperitoneal infusion of recombinant plasminogen activator inhibitor type 2 induced apoptosis in implanted human colon cancer and inhibited its growth and liver metastasis (遺伝子組み換えプラスミノゲンアクチベーターインヒビタータイプ2はヒト大腸がん移植モデルにおいて腹腔内投与によりアポトーシスを誘導し腫瘍増殖と肝転移を抑制した)		

博士(医学) 諏訪 大八郎

論文題目

Intraperitoneal infusion of recombinant plasminogen activator inhibitor type 2 induced apoptosis in implanted human colon cancer and inhibited its growth and liver metastasis

(遺伝子組み換えプラスミノゲンアクチベーターインヒビタータイプ 2 はヒト大腸がん移植モデルにおいて腹腔内投与によりアポトーシスを誘導し腫瘍増殖と肝転移を抑制した)

論文の内容の要旨

[はじめに]

プラスミノゲンアクチベーター (PA) -プラスミン系は腫瘍の増殖、浸潤、転移を促進するとされ、ウロキナーゼタイプ PA (uPA) は細胞表面の特異的レセプター(uPAR)と共にその中心的役割を担う。uPA の生理的インヒビターとして、PA インヒビタータイプ 1 (PAI-1) およびタイプ 2 (PAI-2) が存在し、悪性腫瘍と PAI-1、PAI-2 についての臨床的検討においては PAI-1 が高値であるほど予後不良であるとされるのに対し、PAI-2 は高値であるほど予後が良好との報告が多い。浜松医科大学外科学第二講座でも胃がん、乳がんにおいて同様の結果を報告してきた。PAI-2 の腫瘍増殖抑制効果および転移抑制効果を検討するためにマウスにおけるヒト大腸がん同所移植モデルにおいて PAI-2 の腹腔内投与を行い PAI-1 との比較を行った。

[材料ならびに方法]

遺伝子組み換え PAI-1(rPAI-1):プラスミド(pDL06)を含む大腸菌株 (SG20043) より精製。遺伝子組み換え PAI-2(rPAI-2):プラスミド(pPM7)を含む大腸菌株 (SG20043) より精製。ヒト大腸がん腫瘍 TK4 を BALB/c ノードマウスに同所移植した肝転移モデルを作成した。

対照群 (n=15)、rPAI-1 群 (n=19)、rPAI-2 群 (n=19)に無作為に分類し rPAI-1 群、rPAI-2 群はそれぞれ 300 IU/day を 6 day/week で 6 週間腹腔内投与、対照群は PBS (Phosphate-buffered saline)を投与し移植 6 週間後に評価した。

[結果]

(1) 移植腫瘍への影響

腫瘍増殖:移植腫瘍重量は、対照群 (0.73 ± 0.24 g)、rPAI-1 群 (0.62 ± 0.29 g)、rPAI-2 群(0.45 ± 0.13 g)と、rPAI-2 群では他の 2 群に比し有意に少なく、rPAI-2 の腫瘍増殖抑制効果を認めた。

組織学的特徴:対照群と rPAI-1 群では組織学的な差を認めなかったが、rPAI-2 群では腫瘍がより未成熟で間質の占める割合が優勢であった。また移植部腫瘍において、アポトーシスが rPAI-2 群 (4.64 ± 2.12 %)で他の 2 群 (対照群: 1.94 ± 0.82 %, rPAI-1 群: 2.08 ± 1.07 %)に比し有意に高率に認められた。

移植腫瘍中の uPA、uPAR、PAI-1、PAI-2 量:uPA 抗原量は rPAI-1 群 (4.77 ± 1.81 ng/mg)、rPAI-2 群 (4.71 ± 1.59 ng/mg)の両群において対照群 (6.43 ± 1.45 ng/mg)に比し有意に低値であった。uPAR 抗原量は各群間で差はなかった。

PAI-2 抗原量は PAI-2 投与群 (9.04 ± 2.96 ng/mg)において対照群:(3.93 ± 1.11 ng/mg)、rPAI-1 群:(3.29 ± 1.50 ng/mg)に比し有意に高値であった。PAI-1 抗原量は各群間において有意差を認めなかった。

(2) 肝転移への影響

肝転移数: 対照群では 15 例中 14 例に肝転移を認めたのに対し、rPAI-1 群においては 19 例中 5 例、rPAI-2 群では 16 例中 1 例と、共に有意な肝転移抑制効果を認めた。特に rPAI-2 は顕著な肝転移抑制効果を示した。

[考察]

悪性腫瘍における uPA の働きはいくつかの異なったメカニズムが考えられている。プラスミノーゲンの活性化により生ずるプラスミンは直接、あるいはメタロプロテアーゼの活性化を介して基質タンパク質を分解し、腫瘍の成長、浸潤、転移を促進するとされる。この働きには細胞表面の uPAR と結合した活性型 uPA が重要とされる。また uPA/uPAR は細胞内へのシグナル伝達を介し細胞増殖を促進することも報告されている。一方 PAI に関しては uPA のプロテアーゼ活性阻害に伴う転移抑制効果と、uPA/uPAR を介する細胞増殖ならびに細胞移動を修飾する効果が示されている。今回のヒト大腸がん同所移植モデルではいずれの PAI も肝転移を抑制したが、rPAI-2 の方がより効果的であり、腫瘍増殖も強く抑制した。移植した腫瘍の大きさや組織学的な特徴は 2 種類の PAI の間では大きな違いがみられた。腫瘍の大きさは rPAI-2 群で著明に縮小しアポトーシスも高率であり、rPAI-2 群では腫瘍細胞のアポトーシスを誘導し効果的に腫瘍増殖を抑制した。PAI-1 と PAI-2 の腹腔内投与が移植腫瘍内 uPA 抗原量を減少させ肝転移を抑制したことはいずれの PAI も uPA の酵素活性を阻害し細胞増殖ならびに転移を抑制したことを示した。更に組織学的所見において PAI-2 投与群ではがん病巣の形成が他の群より小さく未成熟であり、PAI-2 の腫瘍増殖抑制効果によると考えた。これには PAI-2 が uPA/uPAR の細胞増殖作用を強く抑制してアポトーシスを高率に誘導する機構が関与したと考えられた。

[結論]

ヒト大腸がん同所移植モデルにおいて PAI-1 と PAI-2 による肝転移抑制効果が示された。これにより PAI の臨床応用の可能性が示唆された。また、PAI-1 と PAI-2 投与により原発腫瘍の増殖抑制効果や組織学的変化において相違を認めた。このことは、臨床例において報告されている両者の腫瘍増殖および転移に対する異なる作用を裏付けるものであり、各々の調節機構を解明することにつながる成果として期待される。

論文審査の結果の要旨

腫瘍のマトリックスはフィブリンが重要な役割を担っており、これを分解するプラスミンは腫瘍の増殖、浸潤、転移に密接に関連することが知られている。プラスミンはプラスミノーゲンアクチベーター (PA) によってプラスミノーゲンが分解され産生される。PA の受容体は細胞表面の特異的レセプター (uPAR) であり、PA と uPAR が結合するとプラスミンの産生のみならず、細胞に様々なシグナルが伝達される。uPA の生理的インヒビターとして、PA インヒビタータイプ 1 (PAI-1) およびタイプ 2 (PAI-2) が存在する。悪性腫瘍患者の予後と PAI-1、PAI-2 の関連について PAI-1 が高値であるほど予後不良であるとされるのに対し、PAI-2 は高値であるほど予後が良好との報告がされている。PAI-2 が高値の担癌患者がなぜ予後が良いのかについてはほとんど検討されていない。申請者らは PAI-2 が腫瘍増殖抑制効果および転移抑制効果を有するか否かについて基礎的検討を行っ

た。

申請者らは PAI-1、PAI-2 を遺伝子組み換え PAI-1 (rPAI-1) および PAI-2 (rPAI-2) プラスミドを含む大腸菌株より精製した。ヒト大腸がん腫瘍 TK4 を BALB/c ノードマウスに移植し肝転移モデルを作製した。rPAI-1 群、rPAI-2 群、対照群に無作為に分類し rPAI-1 群、rPAI-2 群はそれぞれ 300 IU/day を 6 day/week で 6 週間腹腔内投与を行った。投与終了後、1) 移植腫瘍におけるアポトーシスの検討、2) 移植腫瘍中の uPA、uPAR、PAI-1、PAI-2 量、3) 肝転移率を検討した。

申請者らは以下のような結果を得た。

1) 移植腫瘍への影響

腫瘍増殖: 移植腫瘍重量については、rPAI-2 群では他の 2 群に比し有意に少なく、rPAI-2 の腫瘍増殖抑制効果を認めた。組織学的特徴では対照群と rPAI-1 群では組織学的な差を認めなかったが、rPAI-2 群ではアポトーシスが亢進していた。uPA 抗原量は rPAI-1 群、rPAI-2 群の両群において対照群に比し有意に低値であった。uPAR 抗原量は各群間で差はなかった。PAI-2 抗原量は PAI-2 投与群において対照群および rPAI-1 群に比し有番に高値であった。PAI-1 抗原量は各群間において有意差を認めなかった

2) 肝転移への影響

対照群では 15 例中 14 例に肝転移を認めたのに対し、rPAI-1 群においては 19 例中 5 例、rPAI-2 群では 16 例中 1 例と、共に有意な肝転移抑制効果を認めた。

悪性腫瘍における uPA の働きはいくつかの異なったメカニズムが考えられている。プラスミノーゲンの活性化により生ずるプラスミンは直接、あるいはメタロプロテアーゼの活性化を介して基質タンパク質を分解し、腫瘍の成長、浸潤、転移を促進するとされる。この働きには細胞表面の uPAR と結合した活性型 uPA が重要とされる。申請者らのヒト大腸がん同所移植モデルでは肝転移については PAI も肝転移を抑制したが、rPAI-2 の方がより効果的であった。腫瘍増殖に関しては rPAI-2 群で著明に縮小しアポトーシスも高率であり、rPAI-2 群では腫瘍細胞のアポトーシスを誘導し効果的に腫瘍増殖を抑制した。申請者らは PAI-2 が uPA/uPAR の細胞増殖作用を強く抑制してアポトーシスを高率に誘導する機構を指摘している。

以上より申請者らはヒト大腸がん同所移植モデルにおいて PAI-2 による移植腫瘍増殖抑制効果および PAI-2 による肝転移抑制効果を見出した。PAI-2 が移植腫瘍の増殖抑制と肝転移抑制作用を発見したのは特筆すべきことである。大腸がんは本邦でも罹患者が急激に増加しており、その制御は重要な問題である。本研究により PAI-2 の腹腔内投与が大腸がんの増殖抑制、転移抑制につながる事が明らかにされた。申請者らの結果は臨床レベルにおける大腸がんの新規治療法として期待されるものであり、審査委員会では高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) PAI-1 と PAI-2 の精製法および純度について
- 2) PAI-1 と PAI-2 の血中濃度と組織中濃度の比較について
- 3) PAI-1 と PAI-2 活性と抗原量との関連について
- 4) PAI-1 と PAI-2 の腹腔内投与量の設定について
- 5) 盲腸に移植した大腸がん組織と肝転移の関連について
- 6) PAI-2 が PAI-1 より腫瘍増殖抑制能が強い理由について

- 7) PAI-2 の肝転移抑制能の機序について
- 8) PAI-2 のアポトーシス抑制機序について
- 9) 腫瘍血管新生における PAI-2、uPA の役割について
- 10) PAI-1、PAI-2 を同時投与したときの相乗効果について
- 11) PAI-2 将来の臨床展開について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した

論文審査担当者	主査	金山 尚裕		
	副査	梶村 春彦	副査	峯田 周幸