

研究テーマ： -fetoprotein の肝がん抑制機能の検証	
研究代表者（職氏名）：准教授・矢間 太	連絡先 (E-mail 等) : fyzma@pu-hiroshima.ac.jp
共同研究者（職氏名）：准教授・吉野 智之、助教・有馬 寿英	

1. 研究の背景

1-1. 研究代表者は実験的マウス停留精巢(以下、モデルマウス)の系を用い、モデルマウスでは血液精巢閉門は正常に機能しているが半数体生殖細胞が欠落することを報告し、モデルマウスでは精母細胞の減数分裂が抑制されることを示唆した(F.Yazama, J.R.D., 2008)。さらにモデルマウスのプロテオーム解析の結果、モデルマウスでは -fetoprotein (以下、AFP)が精巢特異的に発現すること、また AFP は精母細胞に局在することから、AFP が精母細胞の減数分裂を停止・抑制する可能性を示唆すると共に、AFP は熱ショックに起因する男性不妊症バイオマーカーとして有効であることを提唱した(JST、平成 19 年度シーズ発掘試験)。

1-2. AFP は胎生期の肝臓で産生される主要血漿タンパク質の1つであり、出生後健康な生体では産生されない。しかし肝細胞ががん化・脱分化すると再度 AFP が産生されるので、AFP は肝がんのマーカースとして現在広く臨床応用されている。がん化した肝細胞は脱分化によって胎生期同様に活発な細胞分裂・増殖能力を再び獲得するために、がん化した肝細胞が AFP を産生すると一般的に理解されているが、胎生期 AFP の機能は殆ど解明されていない。

1-3. AFP が熱ショック条件下で雄性生殖細胞に発現すること、さらに AFP が細胞分裂停止機能を有する可能性は今までに報告のない新知見である。胎生期 AFP の機能は現在明らかにされていないが、胎生期 AFP もまた細胞分裂停止機能を有する可能性が考えられる。なぜなら、胎児期の肝細胞が際限なく細胞分裂・増殖を繰り返すなら、正常な肝形態形成は望めない。何らかがタイミングよく肝細胞の分裂を抑制・停止することで胎児の正常な肝形態形成が遂行される筈である。本研究では、非がん細胞由来の AFP が細胞分裂停止機能を有するという作業仮説を立て、AFP の肝形態形成への関与および肝がん抑制機能を検証する事を目的とした。

2. 実験内容の概要

実験 1. 動物実験 (矢間分担)

肝再生には細胞増殖のみならず、過度の細胞増殖を抑制し正常な形態・機能を回復させる最終的なプロセスが必須であると考えられる。肝部分切除(partial hepatectomy; 以下、PH)を行なうと、炎症性タンパク質である cyclooxygenase-2 (以下、COX-2)が肝切除部に発現し、COX-2 がプロスタグランジン(以下、PG)を誘導し、PG が細胞増殖、すなわち肝再生を促進することが報告されている。しかし、PG 下流に存在する筈の過度の細胞増殖を抑制する細胞増殖抑制因子は不明である。AFP が細胞分裂抑制機能を示唆する新知見を得ているので、PG 下流に AFP が関与する細胞増殖抑制シグナル経路があると仮定し、PH / 肝再生系を用いた動物実験を行なった。

実験 2. 培養系実験および走査型プローブ顕微鏡観察 (吉野分担)

ヒト肝がん由来 HepG2 細胞(2×10^4 個 / ml)を3次元細胞培養ディッシュに播種し、無血清培地を用いて培養した。ヒト胎盤由来 AFP を 5mg/L および 10mg/L 濃度で培養3日後培地に添加した。AFP 添加7日後に、各群の細胞増殖活性を MTT アッセイ法によって定量した。さらに、走査型プローブ顕微鏡(以下、SPM)を用いて AFP 無添加・コントロール群、AFP 10 mg/L 添加群の HepG2 細胞を観察した。

実験 3. 遺伝子工学的実験 (有馬分担)

HepG2 細胞における AFP 遺伝子に関するその発現解析を行うために、HepG2 細胞から total RNA を抽出後、RT-PCR 法についてのそれらの条件検討等を行なった。

3. 実験結果

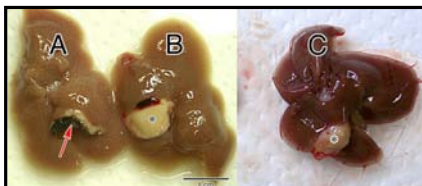


図1. 肝再生におよぼすニメスリドの影響
Aはネガティブコントロール、Bはニメスリド投与群、Cはニメスリド無投与群、*は肝再生部位を示す。

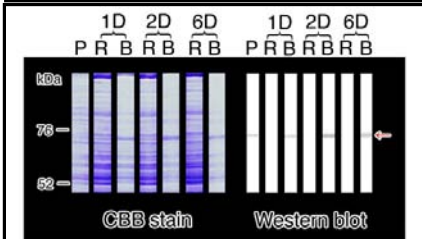


図2. AFPの発現および発現量の変化
Pはポジティブコントロール、Rは残余肝、Bは肝再生部、DはPH後の日数を示している。

実験 1. 動物実験による結果 (矢間分担)

PG 下流に AFP が関与する細胞増殖抑制シグナル経路があると仮定し、COX-2 阻害剤 (ニメスリド) によって間接的に AFP 発現を抑制することによって肝臓は形態的にほぼ完全に再生され (図 1B, PH 後 6 日)、かつ、コントロール群に対し再生時間が著しく短縮された (図 1C, PH 後 14 日)。この結果より、AFP が PG の下流において細胞増殖抑制因子として機能する可能性が示唆された。さらに、肝がん等の疾病には起因しない生後健康な生体で、PH / 肝再生系において AFP が関与することを Western blotting 法を用いて確認した (図 2, 矢印)。また、AFP の発現量は PH 術後時間を経る程、再生後期に発現量が上昇する傾向が認められたことから、再生初期の細胞増殖に関与するのではなく、AFP が PG の下流において細胞増殖抑制因子として機能し、細胞増殖を抑制し正常な形態形成・再生を完了させているのではないかと推察された。

実験 2. 培養系実験および走査型プローブ顕微鏡観察による結果 (吉野分担)

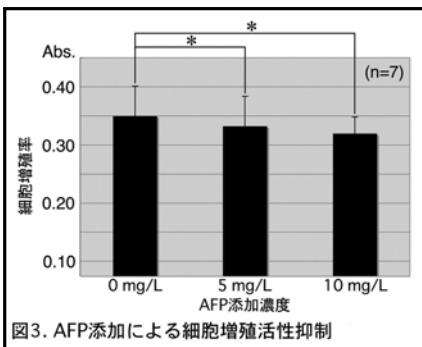


図3. AFP添加による細胞増殖活性抑制

HepG2 細胞を培養し、その培養液にヒト胎盤由来 AFP を添加することで HepG2 細胞の増殖を有意 (* $p < 0.05$) に抑制することを確認した (図 3)。さらに SPM 観察によって、AFP 無添加・コントロール群 HepG2 細胞では細胞の伸展活動が活発であるのに対し、AFP 10 mg/L 添加群 HepG2 細胞では細胞の伸展活動が抑制されたことが推察された (図 4)。

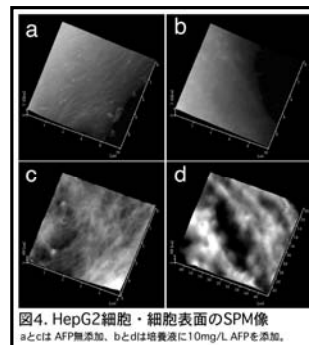


図4. HepG2細胞・細胞表面のSPM像
aとcは AFP無添加、bとdは培養液に10mg/L AFPを添加。

実験 3. 遺伝子工学的実験による結果 (有馬分担)

培養液に添加した胎児性 (胎盤由来) AFP は、HepG2 細胞における AFP 遺伝子に関するその発現を変化させることで細胞分裂を抑制するのではなく、メカニズムは不明であるが、添加した胎児性 AFP がタンパク質レベルにおいて HepG2 細胞の細胞増殖、すなわち細胞分裂を抑制することが示唆された (図 5)。

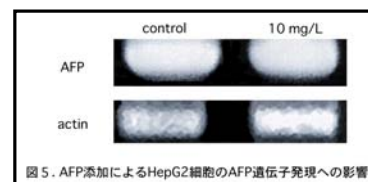


図5. AFP添加によるHepG2細胞のAFP遺伝子発現への影響

4. 研究成果

【論文】

F. Yazama

Continual maintenance of the blood-testis barrier during spermatogenesis: the intermediate compartment theory revisited

J. Reprod. Dev., 54: 299-305, 2008.

【特許】

整理番号: KH0906188

特願 2009-16912

発明の名称: 抗がん剤及び細胞分裂抑制方法

発明者: 矢間 太、吉野 智之、山田 學