

論 文 要 旨

A Novel Function of the Receptor for Advanced Glycation End-Products (RAGE) in Association with Tumorigenesis and Tumor Differentiation of HCC

〔 肝細胞癌の癌化、腫瘍分化に関連する RAGE の新しい機能 〕

樋 渡 清 司

【序論および目的】

Receptor for advanced glycation end products (以後 RAGE と記す)は様々な ligand と結合することにより、p38 and p44/42 MAP kinase, NF- κ B, cdc42/rac, reactive oxygen species などを活性化し、腎臓病、神経疾患、眼疾患、リウマチ、炎症性腸疾患、敗血症の発症、進展に関係することが示されてきた。さらに、癌細胞の亜急性の炎症性メディエーターである、High mobility group box-1 (以後 HMGB1 と記す) と結合し、浸潤能や転移能の増強に関与することが示されている。現在、胃癌、大腸癌、前立腺癌などで RAGE 発現と悪性度との関係についての研究が進められている。今回、申請者らは炎症が発癌に関与する代表的な癌である肝細胞癌と RAGE 発現の臨床病理学的因子の解析を行った。次に、RAGE 発現細胞の低酸素下での癌細胞の耐性能の有無について細胞株を用いて検討した。

【材料および方法】

インフォームドコンセントが得られた肝細胞癌患者の癌部、非癌部、転移性大腸癌患者の正常肝について RAGE 蛋白、RAGE mRNA、HMGB1 蛋白、HMGB1 mRNA の存在を確認するために western blott 法および PCR 法を用いて解析した。

2000 年から 2005 年の間で、臨床検体より mRNA の抽出が可能であった肝細胞癌 36 例を用いて、RAGE の発現について real time PCR と免疫染色を行った。

RAGE transfect Cos7 と Mock Cos7 の細胞を用いて、それぞれ低酸素下で培養を行い、生存率を MTT assay で比較した。さらに RAGE transfect Cos7 については、RNAi で RAGE をノックダウンし、低酸素下での生存率を比較した。

統計は RT-PCR, MTT assay については、student's t-test, Mann-Whitney U test で解析した。免疫染色については 10%以上の発現があるものを陽性と判定し、カイ 2 乗検定で統計解析を行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】

- ①肝細胞癌患者の癌部、非癌部、転移性大腸癌患者の正常肝で RAGE 蛋白、RAGE mRNA、HMGB1 蛋白、HMGB1 mRNA の存在が確認された。
- ②RAGE mRNA 発現は正常肝<非癌部組織（肝炎組織）<癌部の順に上昇することが確認された。臨床病理学的所見と比較すると、RAGE の発現は腫瘍マーカーである PIVKA-II の上昇や再発と逆相関がみられた。癌組織での RAGE mRNA 発現は高分化型から中分化、さらに低分化へと脱分化していきにしたがって低下していくことが示された。免疫組織学的検討でも RAGE mRNA の発現を支持する同様な結果が得られた。
- ③RAGE transfect Cos7, Mock Cos7 を低酸素下で培養したところ、開始後 48 時間では RAGE transfect Cos7 が Mock Cos7 に比べ高い生存率を示した。さらに RAGE transfect Cos7 と RNAi で RAGE をノックダウンした RAGE transfect Cos7 を用いて同様の実験を行った結果、RAGE をノックダウンしていない RAGE transfect Cos7 の生存率が高かった。

【結論及び考察】

肝細胞癌は正常肝→肝炎→前癌病変→高分化型肝癌→中分化型肝癌→低分化型肝癌と多段階発癌すると考えられている。申請者らの実験結果では、正常肝から肝炎になるに従い、徐々に RAGE の発現が高まり、発癌初期の高分化型肝癌の状態の時に RAGE 発現が最も高くなる。以後、中分化から低分化と脱分化するにつれて RAGE の発現は低下するという結果が得られた。この所見はこれまで胃癌や大腸癌での臨床例で報告されてきた RAGE 発現と悪性度が相関するといういくつかの結果と比べると、逆の結果であった。一方、RAGE の発現と悪性度は逆相関するという報告が肺非小細胞癌でみられており、現在のところ見解の一致が見られていない。横紋筋肉腫の cell line で RAGE を発現させると増殖能や浸潤能が低下するという最近の報告がある。RAGE は multiple ligand receptor であり、ligand の種類によりその性質が変わることが推測された。

肝細胞癌は門脈と動脈の二重血流支配であり、血流は前癌病変から高分化型肝癌の状態でも最も少なく、腫瘍が増大し、低分化型になるにつれて動脈支配が優位となる。このように腫瘍の血流が上昇するという現象は、造影 CT 検査や造影超音波検査による画像解析結果から明らかにされている。すなわち、RAGE が高発現している時には肝組織は低酸素状態であることが推察される。この結果を基に、RAGE の発現は低酸素耐性に寄与しているという仮説を立てた。RAGE transfect Cos7, Mock Cos7 の細胞を用いて実験を行い、RAGE 発現細胞は低酸素耐性をもっているという結果が得られた。これは RAGE の新しい機能を示した所見と考えられた。

本研究の結果から今後の RAGE の臨床応用として、発癌時の腫瘍マーカーとしての役割、遺伝子治療の一つとして、肝細胞癌に入れこみ浸潤・増殖を阻止するなど、診断や治療へ展開が考えられた。

(Annals of surgical oncology 掲載予定)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 41 号	学位申請者	樋渡 清司
審査委員	主査	坪内 博仁	学位
	副査	有田 和徳	副査
	副査	桶谷 真	副査
			古川 龍彦

A Novel Function of the Receptor for Advanced Glycation End-Products (RAGE) in Association with Tumorigenesis and Tumor Differentiation of HCC
〔肝細胞癌の癌化、腫瘍分化に関連する RAGE の新しい機能〕

肝細胞癌の多くは、ウイルス性肝炎などによる持続性炎症やこれに伴う線維化を背景として発生する。炎症は細胞の壊死 (necrosis) に起因して生ずるが、細胞壊死の際に内因性の炎症促進物質 High mobility group box-1 (HMGB1) が分泌される。Receptor for advanced glycation end products (RAGE) は HMGB1 のレセプターであり、それと結合することにより Nuclear factor kappa-B (NF- κ B), Mitogen-activated protein kinase (MAPK), Matrix metalloproteinase (MMP) などが活性化される。HMGB1 と RAGE の結合により、胃癌や大腸癌、前立腺癌などは腫瘍発生やその促進方向に、一方非小細胞肺癌や横紋筋肉腫では、腫瘍抑制的に働くことが報告されている。今回、申請者らは、持続性炎症を伴っている肝細胞癌 36 症例を対象に、肝組織における RAGE の遺伝子および蛋白発現を RT-PCR 法及び免疫染色法により測定し、さらに RAGE を発現した Cos 細胞の低酸素条件下での細胞増殖を検討して以下の知見を得た。

- (1) RAGE mRNA の発現は正常肝<非癌部 (肝炎、肝硬変) <肝細胞癌と炎症から癌化するに従って増加した。
- (2) 癌化した後の RAGE mRNA 量、蛋白量は、高分化型>中分化型>低分化型と、癌が進行していくに従って低下した。
- (3) RAGE を発現させた Cos 細胞は対照細胞と比較して明らかな低酸素耐性能を有していた。

肝細胞癌は持続する肝炎による肝細胞死と再生に伴なって、前癌病変が生じ、高分化型、中分化型、低分化型肝細胞癌へと進展するいわゆる多段階発癌の過程を示す。この際、肝血流量は、前癌病変や高分化型肝細胞癌の時期には低下することがあり、さらに中分化型、低分化型に進展するにつれて増加する。このような肝細胞癌の特性と、今回の研究結果を合わせて考えると、肝臓における RAGE 発現は、肝細胞癌発生初期における低酸素状態において細胞生存能を上昇させ、肝がんの発生と早期の促進に作用する可能性が示唆された。

本研究は、RAGE が発癌時の腫瘍マーカーとして臨床応用できる可能性や、早期の肝細胞癌の治療標的となる可能性など、診断や治療へ展開できる可能性を示した点で意義が大きい。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 41 号	学位申請者	樋渡 清司	
審査委員	主査	坪内 博仁	学位	博士 (医学)
	副査	有田 和徳	副査	岸田 昭世
	副査	桶谷 真	副査	古川 龍彦
<p>主査および副査の5名は、平成20年4月21日、学位申請者 樋渡 清司君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) 肝細胞癌の血流状態について、正常肝での血流を正常とすると、前癌病変、高分化型肝細胞癌は低く、中分化型肝細胞癌、低分化型肝細胞癌と進展するにつれ徐々に増えていくという説明であるが、これはコンセンサスが得られている事実なのか。</p> <p>(回答) 異なった施設での造影エコーならびに造影CTで同様の結果が数多く報告されており、コンセンサスが得られているものと考えている。</p> <p>質問2) RAGEの発現が、男女間で有意差があり、また、65歳以上と以下の年齢でも有意差があることが、示されているが、これについてどのような解釈をしているのか。</p> <p>(回答) RAGEは糖終末代謝産物 Advanced glycation end products (AGE)のレセプターでもあり、年齢を経るにつれAGEへの暴露が増えるため、RAGE発現が上昇することが他の論文でも報告されている。男女間の発現の差についても、理由はわからないが、女性のほうが高いという報告がある。</p> <p>質問3) RAGEの機能は低酸素耐性に働くということであるが、生物が生きていくうえでは、低酸素に対してはまずは血管を発達させるということが目的だと思われる。それについてはどう考えるのか。</p> <p>(回答) RAGEとligandの結合に伴うシグナルが活性化されるとVEGFが活性化されるという報告があり、この機序はNF-κBを介する可能性が示されている。したがって、血管新生を通して細胞生存方向に働くことも考えられる。</p> <p>質問4) RAGE発現があると低酸素耐性になるということであるが、そのメカニズムについてはどのように考えているのか。</p> <p>(回答) その後行った実験で、低酸素下でRAGE transfect細胞とMock transfect細胞の蛋白を回収し、hypoxia inducible factor (HIF)とapoptosis関連蛋白のwestern blot解析を行った。結果は、RAGE transfect細胞でHIFの発現が弱まり、さらにp53の発現も弱まっていることがわかった。HIFはp53の活性を強め、apoptosis促進方向に働く。これらの結果から、RAGEはHIF、p53の反応性を弱めることにより低酸素下のその後の反応を緩和している可能性がある。</p> <p>質問5) 臓器によりRAGEの作用が変わる可能性が報告されており、本研究ではRAGEをtransfectする細胞としてサル腎癌細胞であるCos細胞を用いている。肝細胞癌 cell lineにRAGEをtransfectしたものを使うべきではなかったのか。</p> <p>(回答) 今回は、技術的、時間的制約により肝細胞癌 cell lineにRAGEをtransfectしたものを作成することはできなかった。Cos細胞は蛋白をtransfectionしやすい細胞として知られており、他論文でも研究対象の蛋白の働きを調べる場合に、Cos細胞にtransfectionして実験を行っているものが認められており、大きな問題はないものと考ええる。</p>				

最終試験の結果の要旨

質問 6) 同一症例での癌部と非癌部の RAGE 発現量の比較について、RAGE 発現が癌部で高い症例と低い症例があるが、この違いについては何か特徴があるのか。

(回答) 種々の臨床病理学的因子との関連を検討したが、両者間で明らかな差のある因子は見出せなかった。RAGE 発現が癌部で高いものは 26 症例、非癌部で高いものは 6 症例、同等なものは 4 症例であった。

質問 7) RAGE 発現の検出方法について、mRNA の定量性は正確か？

(回答) Light cycler を用いた real time PCR で行っており、定量性が担保されているものとする。

質問 8) Western blot による肝細胞癌 cell line の RAGE 発現の検討について、RAGE 発現が少ない HepG2 と Huh7 では、Beta-actin の発現も少ない。Beta-Actin で補正しても、HepG2 細胞などでは RAGE の発現が低下しているのか。

(回答) これらの cell line を用いた western blot による蛋白量の定量は何回もおこなっているが、HepG2 と Huh7 では Beta-actin は低く出やすい傾向にある。蛋白抽出については問題ないと考えている。

質問 9) RAGE 発現は再発率と逆相関を示しているわけであるが、RAGE を抑制すれば肝発癌あるいは再発が抑えられると考えているか。

(回答) Real time PCR、免疫染色の結果で示したように、RAGE の発現が高いものは高分化から中分化型肝細胞癌で、癌化の初期段階であるため、RAGE 発現を抑えると炎症からの発癌を、ひいては多中心性の再発も抑えられる可能性があると考えている。

質問 1 0) RAGE transgenic マウスや knock out マウスは作出されているか。いるとすれば、そのマウスはどんな表現型を示すか。また、そのようなマウスを使えば、より RAGE の意義が明らかになると考えられるが、どうか。

(回答) RAGE knock out マウスは作られている。前段階としての wild type のマウスでの N-nitrosodiethylamine 投与による肝発癌を試みたが、肝発癌を誘発することができなかつたため、RAGE knock out mice での実験は行っていない。重要な検討項目であると考えている。

質問 1 1) RAGE を発現していると低酸素耐性ということであるが、低酸素により RAGE の発現が亢進することはあるのか。

(回答) 最近マウス脳梗塞モデルの実験で、神経細胞を低酸素下で培養すると RAGE 発現が亢進すると報告された。また、RAGE knock out マウスでは wild type に比べると脳梗塞が起こりやすい。つまり、RAGE には低酸素での神経保護的作用があることが報告されている。

質問 1 2) RAGE 免疫染色について、細胞膜以外にも染色されている部位が認められるが、どう考えるのか。

(回答) 中には Non specific な染色により判定できない症例もあった。細胞膜が染まっているものが RAGE であり、細胞質内に染色されているものは non specific な染色の可能性もある。

質問 1 3) RAGE が腫瘍マーカーになりうると論文中に記載されているが、具体的にはどのようなことを考えているのか。

(回答) 我々の結果では、肝炎から肝癌になるときに RAGE mRNA の上昇が見られるので、肝炎の患者さんの採血を行い、ELISA キットで血中 RAGE 蛋白発現量を観察し、上昇が見られたら画像検査を併用するなどという方法を想定している。

質問 1 4) 肝細胞癌では RAGE と血流、低酸素耐性の関係が示されたわけだが、他臓器において似たような結果が示されたものはあるのか。

(回答) RAGE と低酸素耐性については我々が初めて示したものであり、血流との関係が示されている論文は現在のところ、他臓器では存在しない。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。