

## 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

原 雅樹

専攻分野：遺伝子多型・機能解析学

コース：

指導教授：熊井 俊夫

主論文の題目：

Calcitonin Gene-related Peptide Inhibits Tumor Cell Proliferation of Hepatocellular Carcinoma Cells Through the Ras/MEK/ERK Pathway

(カルシトニン遺伝子関連ペプチドは Ras/MEK/ERK 経路を介して肝細胞癌細胞株の細胞増殖を抑制する)

共著者：

Yuko Takeba, Minoru Watanabe, Yuki Ohta, Takehito Ohtsubo, Toshio Kumai, Naoki Matsumoto

緒言

神経ペプチドは、生理機能を調節するだけでなく、様々な病態に関与し、抗腫瘍活性を示すものもあると報告されている。

肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma; HCC)の多くは、肝炎ウイルスの持続感染に起因し、外科的治療に加え、抗癌薬の併用療法など集学的治療が行われる。神経ペプチドの抗腫瘍活性が臨床に応用できる可能性がある。

カルシトニン遺伝子関連ペプチド(calcitonin gene-related peptide; CGRP)は、血管拡張作用を持つ神経ペプチドで末梢神経から分泌され肝臓にも分布している。しかし、CGRPのHCCに対する作用は明らかではない。そこで、肝臓癌組織におけるCGRPの産生とその受容体の発現を評価し、HCC細胞株に対する作用機序を検討した。

## 方法

当院で肝臓疾患の手術を行った患者から採取した組織を実験に供した。なお、本学生命倫理委員会の承認を得て実施した(承認番号第1207号)。CGRPの蛋白発現は免疫組織染色で評価した。NPO法人HAB研究機構より得られた移植不適合白人ドナーの正常肝組織を比較対照とした。CGRP type -1 receptor (CLR)とreceptor activity-modifying protein (RAMP)-1の2量体からなるCGRP受容体の発現は、reverse transcription polymerase chain reaction法で同定した。また肝細胞癌細胞株Huh7、HepG2にCGRP ( $10^{-8}$ ~ $10^{-12}$ M) を添加し培養後、細胞増殖反応をMTS法で検討した。さらに、細胞増殖経路であるMitogen-activated protein kinase (MAPK)ファミリー蛋白Ras、MAP kinase (MEK)1およびextracellular signal-regulated kinase (ERK)の発現をウエスタンブロット法で確認した。さらにCGRP受容体拮抗薬 (CGRP<sub>8-37</sub>) で前処理後、CGRPを添加時のERK1/2およびcAMP response element binding protein (CREB)およびリン酸化 (p) CREBの発現を検討した。統計解析は多群間比較検定法のSteel-Dwassを用いた。結果は平均値±標準誤差で示した。危険率5%未満を有意差ありとした。

## 結果

正常肝や大腸癌の肝転移の肝臓組織でのCGRPの発現は殆ど認められなかったが、肝炎由来のHCC、nonB-nonC HCCでは、非癌部および癌部位の血管周囲および癌細胞でCGRPの陽性が顕著であった。

CLR-1とRAMP-1のmRNA発現は、正常肝組織およびHCC細胞株で認められた。nonB-nonC HCCの肝臓組織でもCLR-1とRAMP-1のmRNA発現が認められたが、弱い傾向であった。

細胞増殖は、両細胞ともにCGRP $10^{-10}$ Mで有意に抑制された(Huh7;  $p=0.010$ , HepG2;  $p=0.047$ )。CGRP受容体はG蛋白共役型でありcAMP/CREBを介する。CREBおよびpCREBの発現は、CGRP $10^{-10}$ Mで有意に増強した(CREB;  $p=0.033$ , pCREB;  $p=0.034$ )。CGRP<sub>8-37</sub> $10^{-10}$ Mで前処理後、CGRP $10^{-10}$ Mを添加するとCREBまたはpCREBの蛋白発現は有意に抑制した(CREB;  $p=0.032$ , pCREB;  $p=0.015$ )。Ras、MEK 1およびERK 1/2の発現は、CGRP $10^{-10}$ Mで有意に抑制した (Ras;  $p=0.023$ , MEK;  $p=0.030$ , ERK1/2;  $p=0.016$ )。pMEK1やERK1/2の発現も有意に抑制した (pMEK1;  $p=0.017$ , pERK1/2;  $p=0.030$ )。CGRP<sub>8-37</sub> $10^{-10}$ MまたはPKA/cAMP/CREBの

阻害薬Rp-cAMP  $10^{-7}$ Mで前処理するとCGRP $10^{-10}$ MによるERK1/2の発現の抑制は回復傾向にあった。

#### 考察

HCC組織の非癌部や癌部でCGRPが産生され、病態に何らかの作用を及ぼすと考えた。CLRとRAMP-1は正常肝組織やHCC細胞株で発現していたが、HCC組織では軽度であった。これは、組織中に壊死組織も含まれていた理由もあるが、病態で受容体発現が変化する可能性も考えられた。HCC細胞株にCGRPを添加した時の細胞増殖は生体内濃度に近い $10^{-10}$ Mで抑制された。

CGRP受容体の下流はPKA/cAMP/CREB経路を介する。CGRPはCREBやpCREBの発現を有意に増加させ、その発現は、受容体を介して誘導することが示された。HCCでは、CREB活性化とRas/MAPK経路が癌細胞増殖を修飾することが報告されており、発癌や進行の際に早期から発現する。CGRP $10^{-10}$ MはRas/MEK1/ERKの活性化を有意に抑制した。ERKの抑制は、CGRP<sub>8-37</sub>やRp-cAMPで抑制が回避される傾向にあった。

CGRPは生体内の生理活性物質であることから、将来HCC治療に利用可能となれば、副作用の少ない治療薬となりうる。

#### 結論

CGRPのHCCへの作用は、CREBを介したMAPKカスケードの発現を抑制し、癌細胞増殖を阻止することが示唆された。