

犬肝癌細胞に対する肝細胞増殖因子の影響

Effects of hepatocyte growth factor on canine hepatocellular carcinoma cells

山田隆紹¹, 五十嵐こずえ¹, 上村麻美¹, 北川佳奈¹, 川原井晋平¹,
石川武史¹, 荻原喜久美², 久末正晴¹, 班目広郎³, 土屋 亮¹

¹獣医学部内科学第二研究室, ²環境保健学部衛生技術学科, ³麻布大学附属動物病院

Takatsugu Yamada¹, Kozue Igarashi¹, Mami Uemura¹, Kana Kitagawa¹, Sinpei Kawarai¹,
Takefumi Ishikawa¹, Kikumi Ogihara², Masaharu Hisasue¹, Hiroo Madarame³, Ryo Tsuchiya¹

¹ Laboratory of Veterinary Internal Medicine, School of Veterinary Medicine and

² Laboratory of Hygienic Technology, College of Environmental Health,

³ Veterinary Teaching Hospital, Azabu University

Abstract. In this study, we examined the effects of feline recombinant HGF (frHGF) on proliferation of four types of canine hepatocellular carcinoma cells and normal canine hepatic cells in culture. Three types of responses were observed in the tumor cells. One was increased growth correlated with increasing HGF up to a certain concentration when a growth ceiling was reached (CHKS-rL cells). The second was growth correlated with increasing concentration of HGF, after which growth decreased gradually in inverse proportion to HGF concentration (95-1044 cells). The remaining two cell lines (KO, 930-599A) did not show a consistent reaction to HGF. Normal canine hepatic cells also proliferated at an HGF concentration close to that of CHKS-rL and 95-1044 cells. Thus, HGF for treatment of patients bearing tumors of CHKS-rL or 95-1044 cells will be ineffective; however, it is a useful treatment for patients with tumors of KO or 930-599A cells.

目 的

肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor : HGF) は、長らく実体が不明であった肝再生因子の本体と考えられる比較的新しい増殖因子であり、1984年肝再生中のラット血液から部分精製され、既知増殖因子とは性質の異なる新しい増殖因子として注目された²¹⁾。その後分子クローニングされ、全一次構造が明らかになった^{22, 25, 30)}。さらに1991年には、免疫学的手法によって、HGFレセプターがc-metプロトオンコジーン産物(c-Met)であることがわかった^{1, 4)}。c-metプロトオンコジーン産物は1984年にヒト骨肉腫細胞の癌遺伝子として発見されたものである²⁾。

リコンビナントHGFの開発により、HGFの作用の

多様性が次々と明らかにされた²⁰⁾。当初、HGFは肝実質細胞に特異的な増殖因子と考えられたが、その後、肝細胞以外の腎尿細管上皮細胞⁶⁾、皮膚ケラチノサイト¹⁴⁾、メラノサイト¹⁷⁾、肺胞Ⅱ型上皮細胞、胃粘膜上皮細胞など、多くの上皮細胞の増殖を促すことが明らかになった²³⁾。同じ頃、HGFが肝癌やメラノーマ、扁平上皮癌などに対してはその増殖を抑制することが報告され²⁹⁾、HGFの抗腫瘍活性は、特に肝癌細胞に対してその傾向が強いことが明らかにされた。HGFは正常肝細胞の強力な増殖促進因子でありながら、肝癌由来細胞株に対しては著しい増殖抑制活性を示すことが注目されている²⁸⁾。このような抗肝癌活性は実験動物を用いたin vivoの実験系においても確認され²⁷⁾、HGFは肝癌に対する制癌剤と

しても期待されている²⁴⁾。一方、HGFのアンタゴニストとしてNK4の存在も明らかにされ、NK4がHGFの腫瘍細胞増殖を抑制することが注目されている^{3, 12, 13, 15)}。HGFがヒト肝癌由来細胞株に対する増殖抑制作用が報告される一方で、各種腫瘍の増殖促進も報告されている^{26, 27)}。特に犬については基礎、応用面共にデータが皆無に等しい。本研究では、これらの背景において獣医臨床で経験することの多い肝疾患にHGFを臨床応用するための基礎実験として犬肝細胞癌株化細胞を用いHGFの影響を検討した。

材料および方法

ネコ遺伝子組み換えHGF (frHGF) :

添加するfrHGF [Miyake et al.]¹⁹⁾ は日本全薬工業(株)より分与いただいた。HGFは最終濃度0, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 ng/mlの高濃度と, 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 ng/mlの低濃度で実施した。

細胞株ならびに正常犬凍結肝細胞浮遊液の調整 :

川原井らが肝細胞癌症例犬より樹立し、液体窒素中に保存していた犬肝細胞癌株化細胞CHKS-rL⁹⁾と荻原らが樹立した犬肝細胞癌株化細胞95-1044, KO, 930-599Aの3株(未発表)を用いた。

凍結保存した株化細胞を急速解凍後、定法に基づきHanks液(SIGMA)を用い洗浄処理後に1回の継代培養を行いconfluent直前に0.2%トリプシンEDTA処理で剥離回収・洗浄を行った。10% fetal bovine serum (FBS) 加Iscove's Modified Dulbecco's Medium, IMDM (GIBCO) にPenicillin-Streptomycin Solution (SIGMA) 添加した培地少量に浮遊し、0.3% Trypan Blue (WAKO, Japan) 液を用いて生細胞数を測定後、細胞数を 0.5×10^5 /mlに調整し、96well microplateに20 μ l (1×10^4 /well) ずつ分注した。段階希釈したfrHGFを、各wellに10 μ l ずつ加えた。同じ条件のwellを6well ずつ用意した。CO₂ インキュベーター (5% CO₂, 37°C) で72時間培養した。同様の実験を2回実施した。

正常犬凍結肝細胞はHEP185005 (Biopredic International, France) (ビーグル, 雌, 1.6歳)を用い、指示書に基づき、①Thawing Medium without glucoseとしてLeibovitz L15 Glutamax 1 (GIBCO/IN VITROGEN), ②Seeding MediumとしてWilliams E

Glutamax 1 (GIBCO/IN VITROGEN) にFoetal calf serum 10% v/v (PAN-BIOTECH) 添加, ③Incubation MediumとしてWilliams E Glutamax 1 (GIBCO/IN VITROGEN) に50uM hydrocortisone hemisuccinate 添加を用いた。②③の両培地にはPenicillin 100 U/ml (GIBCO/IN VITROGEN), Streptomycin 100 μ g/ml (GIBCO/IN VITROGEN), Bovine insulin 4 μ g/ml (SIGMA), を添加した。凍結肝細胞を急速解凍後指示書に基づいて、Thawing Medium without glucoseで洗浄後、Seeding Mediumに再懸濁し生細胞数を 0.4×10^6 /mlに調整し、Collagen-type I-coated 96well-plate (IWAKI) に、1wellあたり0.1ml ずつ播種した。CO₂ インキュベーター (5% CO₂, 37°C) で16~24時間培養し、細胞が接着し、単層を形成している事を確認した後、Seeding Mediumと共に浮遊死細胞を除き、Incubation Medium 0.1 ml に培地交換をした。その他は株化細胞と同様に実施した。

細胞数の測定 :

培養開始72時間後、Cell Counting Kit-8 (WAKO, Japan) を各wellに10 μ l ずつ添加し、混和した。同じ条件のwellを3well ずつ用意した。CO₂ インキュベーター (5% CO₂, 37°C) で3時間培養後にマイクロプレートリーダー (BIO-RAD 550) で吸光度(測定波長: 450 nm, 参照波長: 655 nm) を測定した。

得られたデータの統計処理

HGF非添加群に対するHGF添加各濃度群の有意差を、ExcelのT検定により検討し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

CHSK株では、HGF 200 ng/ml 添加までは濃度依存性に増殖し、400 ng/ml ではプラトーに達し、徐々に低下を認めるが1600 ng/ml まで増殖活性を示した (Fig. 1)。非添加に対する有意差は図中に* ($p < 0.05$) ** ($p < 0.01$) で示した。95-1044株もHGF添加により増殖が促進され、HGF添加量が25-50 ng/ml までは添加量に応じた増殖がみられたが、それ以上の添加量ではプラトーに達するか増殖促進の効果が弱くなり、200 ng/ml 以上では増殖効果が徐々に低下

する傾向があった (Fig. 2)。非添加群との有意差は 25-1600 ng/ml までは認められた。KO 株は HGF による明瞭な反応は認められず、特定の傾向は無いと思われた (Fig. 3)。

930-599A 株は、低濃度添加群では多少増殖抑制傾向が認められたが、添加群と非添加群で有意な差は認められなかった (Fig. 4)。

一方、正常肝細胞は Fig. 5 に示すように、HGF 添加濃度 1 ~ 50 ng/ml までは HGF 濃度依存性に増殖し、400 ng/ml までは、ピークの 50 ng/ml より低値を示すものの増殖促進効果を示した。また、非添加群との有意差は 1 ~ 100 ng/ml において 1% 未満の危険率で認められた。

考 察

HGF は癌細胞に対し増殖を促進する作用と抑制する作用の相互に矛盾した報告があることから^{8,16,27,28,29)}、犬肝疾患の治療に HGF を利用する基礎的研究として、犬肝細胞癌症例より樹立した株化細胞を用い HGF の反応について検討した。HGF の多様な生物活性は、HGF レセプターである c-Met に HGF が結合することにより、 β 鎖のチロシキナーゼが活性化されリン酸化が起こり、HGF のシグナルが細胞内に伝達されることによる¹⁸⁾。HGF が癌細胞の増殖に促進的に働くのは、c-Met を介して運動性の亢進や増殖促進などの生物活性が起こるためと考えられている¹¹⁾。事実、肺癌や乳癌など、ヒトの癌において c-Met の過剰発現や活性化が認められている^{5,11)}。一方で HGF はある種の癌細胞、特に肝癌細胞に対しては腫瘍抑制因子として作用することが報告され、Shiota G. らの研究では、8 種類の肝癌由来細胞株において 2.5-100 ng/ml の HGF 添加により増殖抑制効果を示し、細胞数の相対比が非添加群に比べ最大 60% も抑制された²⁸⁾。本研究で HGF 添加が犬の肝癌細胞に及ぼす影響について検討したところ、一定の添加濃度までは増殖が促進され、さらに濃度を増すと増殖促進効果がプラトーに達する株 (CHKS-rL)、最初の増殖促進は同様でさらに濃度を増すと増殖が抑制される傾向のある株 (95-1044)、HGF による影響が明らかではない株 (KO, 930-599A) の三様に分かれた。

正常犬肝細胞の HGF に対する反応は 100 ng/ml ま

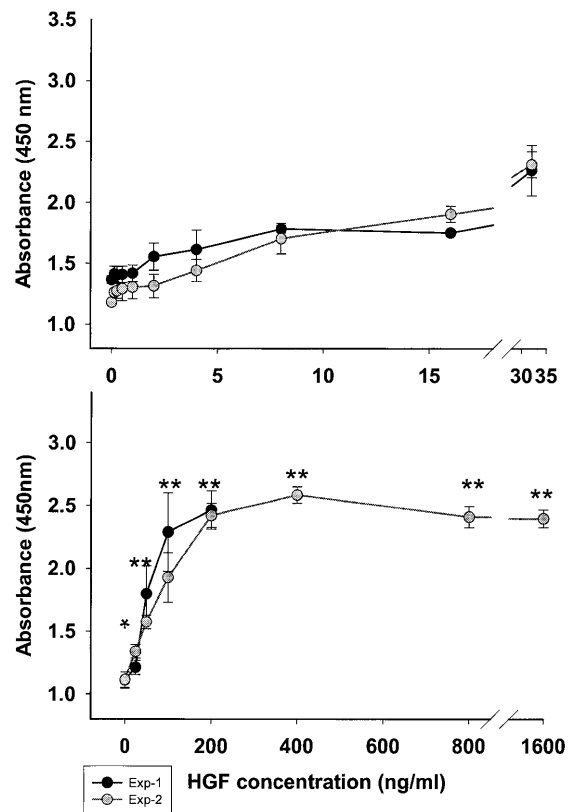


Fig. 1. Effects of HGF on proliferation of CHKS cells at low and high concentrations. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, by t -test

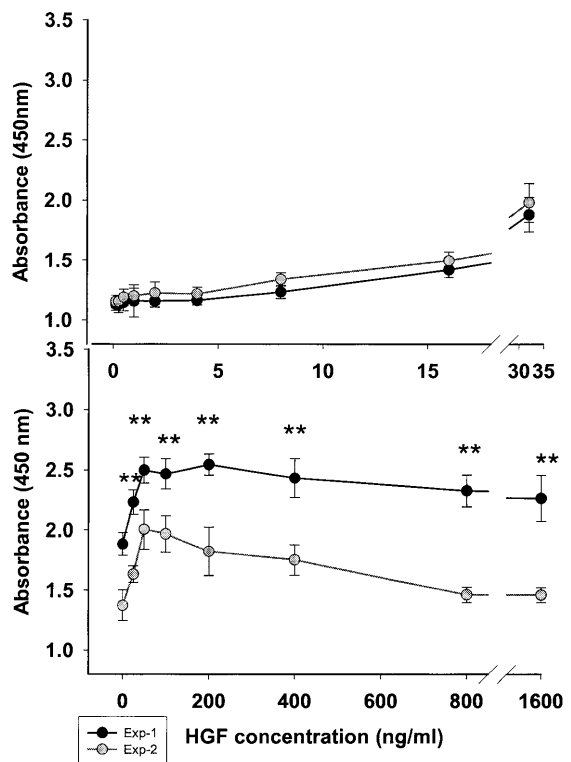


Fig. 2. Effects of HGF on proliferation of 95-1044 cells at low and high concentrations. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, by t -test

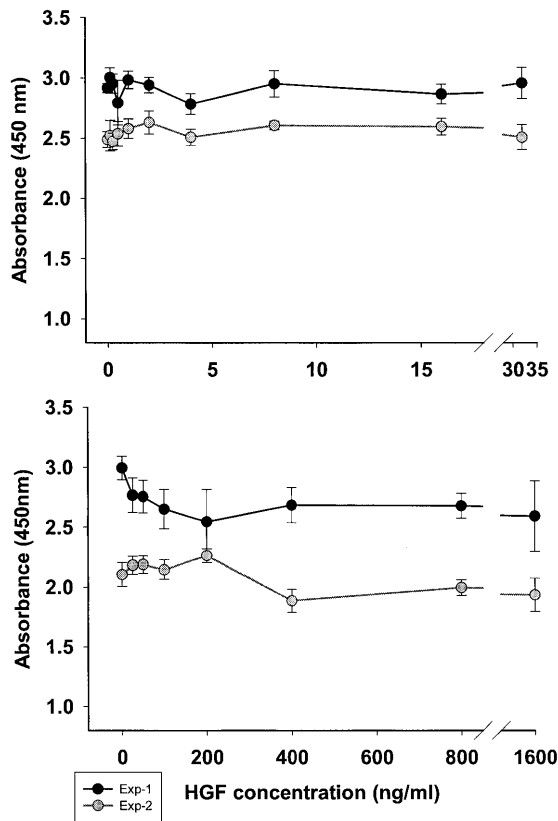


Fig. 3. Effects of HGF on proliferation of KO cells at low and high concentrations

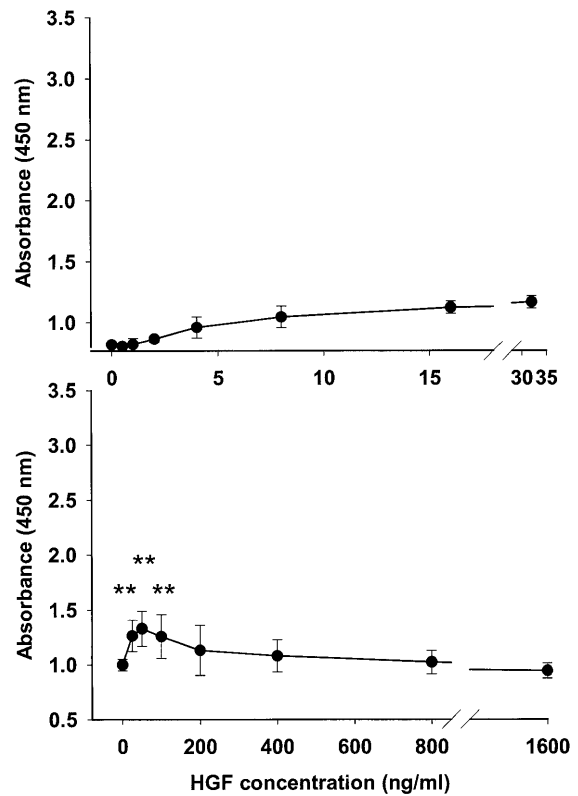


Fig. 5. Effects of HGF on proliferation of normal canine hepatocytes at low and high concentrations

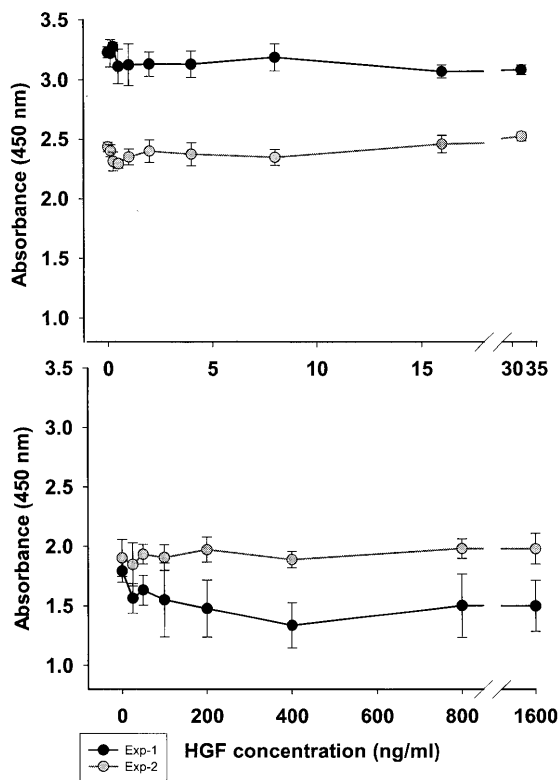


Fig. 4. Effects of HGF on proliferation of 930 cells at low and high concentrations

で有意な増殖を認めるが、それ以上の濃度では増殖促進作用は低下するため、HGFに反応する癌細胞の増殖を抑制し、正常肝細胞の増殖を促進する濃度選択は困難と考えられる。

HGFが癌細胞に対し増殖促進あるいは抑制という両方向の作用を発揮するメカニズムは単純でないと推測されるが、HGFレセプターであるc-Metの発現状況¹⁶⁾、HGFのアンタゴニストであるNK4^{3,15)}の発現状況の把握が今後の検討課題と推測される。本研究では犬の肝癌細胞株に猫のリコンビナントHGFを用いているが、猫のHGFはKobayashiragaら¹⁰⁾が、犬のHGFはMiyakeら¹⁹⁾がクローニングしており、両者はアミノ酸レベルで97.5%の相同性を示していることから、生物活性も類似していると推測され、犬のHGFを用いた場合と同様の結果が得られると考える。以上の結果から肝癌症例以外の個体ではHGFの利用による効果が期待できるが、肝癌症例では癌細胞のHGFに対する反応を確認して利用することが重要と判断された。

要約

本研究では、犬の肝細胞癌株化細胞または正常肝細胞を用い HGF の細胞増殖に及ぼす影響について検討した。肝癌細胞株4種を用いて検討した結果、3様の反応が認められた。一定の濃度まで増殖が促進され、それ以上の濃度では増殖がプラトーに達する株 (CHKS-rL), 一定の濃度まで増殖が促進され、さらに濃度を増すと増殖が抑制される傾向を示す株 (95-1044), HGF に反応が乏しく増殖促進、抑制の影響が明らかではない株 (KO, 930-599A) に分類された。一方、正常犬肝細胞と HGF に増殖反応を示す肝癌細胞で、増殖を促進する濃度が類似しているため、HGF の利用は困難であり、HGF で増殖を示さない肝癌細胞 (KO, 930-599A) で利用可能と考えられた。治療に際し HGF に対する反応を簡易に検出することが重要と考えられた。

謝辞

リコンビナント HGF を提供して頂いた日本全薬工業株式会社に深謝いたします。

参考文献

- 1) Bottaro P. Donald, Rubin S. Jeffrey, Faletto L. Donna, Chan M-L. Andrew, Kmiecik E. Thomas, Vande Woude F. George and Aaronson Stuart A., 1991, Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science*, 251, 802-804.
- 2) Cooper S. Colin, Park Morag, Blair G. Donald, Tainsky A. Michael, Huebner Kay, Croe M. Carlo, and Vande Woude F. George, 1984, Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature*, 311, 29-33.
- 3) Date, K., Matsumoto, K. Kuba, K., Shimura, H., Tanaka, M. and Nakamura, T. 1998 Inhibition of tumor growth and invasion by a four-kringle antagonist (HGF/NK4) for hepatocyte growth factor. *Oncogene*, 17, 3045-3054.
- 4) Higuti O., Mizuno K., Vande Woude F. George and Nakamura T., 1991, Expression of c-met proto-oncogene in COS cells induces the signal transducing high-affinity receptor for hepatocyte growth factor. *F.E.B.S.*, 301, 282-286.
- 5) 井達和彦 1998 癌 p87-95 *In*: HGF 分子医学—病態生理・診断・治療—(中村敏一 et. al.) メディカルレビュー社
- 6) Igawa T., Kanda S., Kanetake H., Saitoh Y., Ichihara A., Tomita Y. and Nakamura T., 1991, Hepatocyte growth factor is a potent mitogen for cultured rabbit renal tubular epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 174, 831-838.
- 7) Jiang, W.G., Hiscox, S., Matsumoto, K., and Nakamura, T. 1999 Hpatocyte growth factor/Scatter factor, it molecular, cellular and clinical implications in cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 29, 209-248.
- 8) Jiang, W.G., Martin, T.A., Parr, C., Davies, G., Matsumoto, K. and Nakamura, T. 2005 Hepatocyte growth factor, its receptor, and their potential value in cancer therapies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 53, 35-69.
- 9) Kawarai, S., Hashizaki, K., Kitao, S., Nagano, S., Madarame, H., Neo, S., Ishikawa, T., Furuichi, M., Hisasue, M., Tsuchiya, R., Tsujimoto, H. and Yamada, T. 2006 Establishment and characterization of primary canine hepatocellular carcinoma cell lines producing alpha-fetoprotein. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 113, 30-36.
- 10) Kobayashi, Y., Nakamura, N., Ishizaka, T., Matsuda, K., Ohno, K. and Tsujimoto, H. 2001 Molecular Cloning of feline hepatocyte growth factor (HGF) cDNA. *J. Vet. Med. Sci.* 63, 211-214.
- 11) 小清水右一, 中村敏一 1998 HGF のレセプター MET によるがん化ならびにがん悪性化機構 p44-53 *In*: がん遺伝子・がん抑制遺伝子 (渋谷正史 et. al.) 中外医学社
- 12) Kuba, K., Matsumoto, K., Ohnishi, K., Shiratsuchi, t., Tanaka, M. and Nakamura, T. 2000 Kringle 1-4 of hepatocyte growth factor inhibits proliferation and migration of human microvascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* ,279, 846-852.
- 13) Matsumoto K., Date K., Shimura H., Tanaka M. and Nakamura T., 2000, HGF/NK4, a four-kringle antagonist of hepatocyte growth factor, is an angiogenesis inhibitor that suppresses tumor growth and metastasis in mice. *Cancer Res.*, 60, 6737-6743.
- 14) Matsumoto K., Hashimoto K., Yoshikawa K. and Nakamura T., 1991, Marked stimulation of growth and motility of human keratinocytes by hepatocyte growth factor. *Experimental Cell Research*, 196, 114-120.
- 15) Matsumoto, K., Kataoka, H., Date, K. and Nakamura, T. 1998 Cooperative interaction between alpha- and beta-chains of hepatocyte growth factor on c-Met receptor confers ligand-induced receptor tyrosine phosphorylation and multiple biological responses. *J. Biol. Chem.*, 273, 22913-22920.

- 16) Matsumoto, K., Nakamura, T. 2006 Hepatocyte growth factor and the Met system as a mediator of tumor-stromal interaction. *Int. J. Cancer* 119, 477-483.
- 17) Matsumoto K., Tajima H. and Nakamura T., 1991, Hepatocyte growth factor is a potent stimulator of human meranocyte DNA synthesis and growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 176, 45-51.
- 18) 松本邦夫 1998 HGF p19-25 *In* : HGF分子医学—病態生理・診断・治療— (中村敏一 et. al.) メディカルレビュー社
- 19) Miyake M, Yaguchi T, Saze K, Wang J, Ogawa T, Endo Y, Suzuta Y, Okazaki M, Haga Y, Waki T, Takahashi SY, Yamamoto Y, Iwabuchi S. Isolation and expression of five-amino-acid-deleted variant of feline hepatocyte growth factor (HGF) cDNA. *J Vet Med Sci.* 2004 Jan; 66(1): 9-14.
- 20) Nakamura T., 1991, Structure and function of hepatocyte growth facto., *Progress in Growth Factor Research*, 3, 67-85.
- 21) Nakamura T., Nawa K. and Ichihara A., 1984, Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatoectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122, 1450-1459.
- 22) Nakamura T., Nishizawa T., Hagiya M., Seki T., Shimonishi M., Sugimura A., Tashiro K. and Shimizu S., 1989, Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature*, 342, 440-443.
- 23) 中村敏一 1993 HGFの多様な生物作用 *In* : 細胞増殖の制御 (山本雅 et. al.) p13-27 南江堂
- 24) 中村敏一 1997 肝細胞増殖因子 (HGF) による器官再生 p73-91. *In* : 生命体システムの修復, 再生の夢を語る (香川靖男 et.al.) 講談社
- 25) Okajima A., Miyazawa K. and Kitamura N., 1990, Primary structure of rat hepatocyte growth factor and induction of its mRNA during liver regeneration following hepatic injury. *Eur. J. Biochem.*, 193, 375-381.
- 26) Rosen, E. 1993 Scatter factor induces blood-vessel formation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9, 1937-1941.
- 27) Sntoni-Rugiu Eric, Preisegger Karl, Kiss Andras, Audolfsson Thorir, Shiota Goshi, Schmidt V. Emmett and Thorgeirsson S. Snorri, 1996, Inhibition of neoplastic development in the liver by hepatocyte growth factor in a transgenic mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 9577-9582.
- 28) Shiota G., Rhodas B. David, Wang C. Timothy, Nakamura T. and Schmidt V. Emmett, 1992, Hepatocyte growth factor inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 373-377.
- 29) Tajima H., Matsumoto K. and Nakamura T., 1991, Hepatocyte growth factor has potent anti-proliferative activity in various tumor cell lines. *Federation of European Biochemical Societies*, 291: 229-23.
- 30) Tashiro K., Hagiya M., Nishizawa T., Seki T., Shimoni8shi M., Shimizu S. and Nakamura T., 1990, Deduced primary structure of rat hepatocyte growth factor and expression of the mRNA in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 3200-3204.