

---

prolineに富む内因性抗菌ペプチドPR-39遺伝子を用いた  
シグナル伝達ブロックによる肝癌転移の遺伝子治療

---

(研究課題番号 10670444)

平成10年度～平成11年度文部省科学研究費補助金  
(基盤研究C)

研究成果報告書

平成12年2月

研究代表者 藤本佳範

旭川医科大学医学部助手

## 研究組織

研究代表者 : 藤本 佳範 旭川医大・医学部・助手

研究分担者 : 高後 裕 旭川医大・医学部・教授

## 研究経費

平成10年度 1,700千円

平成11年度 1,200千円

計 2,900千円

## 研究発表

### (1) 学会誌等

1. Ohtake T, Fujimoto Y, Ikuta K, Saito H, Ohhira M, Ono M, Kohgo Y. Proline-rich antimicrobial peptide, PR-39 gene transduction altered invasive activity and actin structure in human hepatocellular carcinoma cells. Brit J Cancer, 1999.
2. 藤本佳範, 大竹孝明, 鈴木康秋, 田中浩二, 生田克哉, 斉藤浩之, 大平基之, 小野稔, 高後 裕. Prolineに富む内因性抗菌ペプチドPR-39遺伝子を用いたシグナル伝達ブロックによる肝癌転移の遺伝子治療. 日本癌病態治療研究会誌 5: 176-177, 1999
3. 高後裕, 藤本佳範, 浦等. 増殖因子受容体からのシグナル伝達経路の阻害によるがん治療法の開発. がん治療のあゆみ 18: 13-18, 1999

### (2) 口頭発表

1. 田中浩二, 藤本佳範, 生田克哉, 鈴木康秋, 大竹孝明, 斉藤浩之, 大平基之, 高後 裕. proline-rich peptide PR-39の遺伝子導入によるras transformantの増殖抑制について 日本癌学会総会, 9/29/99
2. 田中浩二, 藤本佳範, 生田克哉, 鈴木康秋, 大竹孝明, 斉藤浩之, 大平基之, 高後 裕. proline-rich peptide PR-39の遺伝子導入によるras transformantの増殖抑制の検討 日本消化器病・肝臓学会大会, 10/29/99
3. 藤本佳範. prolineに富む内因性抗菌ペプチドPR-39遺伝子を用いたシグナル伝達ブロックによる肝癌転移の遺伝子治療 日本癌病態治療研究会, 5/21/99

4. 藤本佳範, 高後 裕. 内因性抗菌ペプチドPR-39の遺伝子導入のras transformantにおよぼす細胞増殖抑制機能について  
日本バイオセラピー学会, 12/9/99
5. Proline-rich antimicrobial peptide, PR-39, suppresses invasion and motility of human hepatoma: Dependence on syndecan-1 induction and actin structure alteration. Ohtake T, Fujimoto Y, Ikuta K, Tanaka K, Saitoh H, Ohhira M, Ono M, Kohgo Y.  
AACR 3/28/98
6. Suppression of invasive activity and alteration of actin structure caused by transfection with PR-39 gene into human hepatoma cells. Fujimoto Y, Ohtake T, Tanaka K, Suzuki Y, Ikuta K, Saitoh H, Ohhira M, Ono M, Kohgo Y.  
AASLD 11/6/98
7. 内因性抗菌ペプチドPR-39によるヒト肝細胞癌の浸潤能および固有運動能の抑制. 大竹孝明, 藤本佳範, 生田克哉, 田中浩二, 斉藤浩之, 大平基之, 小野 稔, 高後 裕.  
34回日本肝臓学会総会, 4/15/98
8. syndecan発現誘導因子PR-39の遺伝子導入による肝癌細胞の転移阻止について. 小野 稔, 藤本佳範, 大竹孝明, 生田克哉, 鈴木康秋, 田中浩二, 斉藤浩之, 川島哲也, 大平基之, 高後 裕.  
6回DMB研究会, 6/20/98
9. proline rich peptide PR-39遺伝子導入によるras transformantの腫瘍形成能低下について. 田中浩二, 藤本佳範, 生田克哉, 鈴木康秋, 大竹孝明, 斉藤浩之, 川島哲也, 大平基之, 高後 裕.  
66回北海道癌談話会, 9/12/98
10. proline rich peptide PR-39遺伝子導入によるras transformant皮下移植マウスの生存日数の延長について. 田中浩二, 藤本佳範, 高後 裕.  
11回日本BRM学会, 11/5/98

### (3) 出版物

なし

## はじめに

PR-39はブタの小腸粘膜および白血球から精製されたprolineに富む内因性の抗菌ペプチドである。我々は、このPR-39がproteoglycan型接着分子であるsyndecanの発現を誘導するとともに、肝癌細胞の固有運動能を低下させ、細胞形態とactin構造に変化を起こすことを明らかにした。また、近年、PR-39が白血球のp47<sup>phox</sup>のSH3 domainに結合しNADPH oxidaseの活性を抑さえるという報告やPR-39がSH3 domainを有するシグナル伝達分子であるp130<sup>Cas</sup>に結合するという報告が出された。そこで我々は、PR-39のシグナル伝達における機能を明らかにするために、最もよくシグナル伝達系が解明されているrasの系を用い、PR-39がrasのシグナル伝達系をブロックし、細胞増殖を抑制するという新しい癌の治療法に有用な遺伝子である可能性を明らかにした。以下に科学研究費補助金を用いて行った研究の結果を述べる。

## 研究成果

### (1) PR-39遺伝子導入による浸潤能と細胞形態の変化について

PR-39が転移抑制因子として働くSyndecan-1の発現を誘導し、さらに浸潤能を抑制することを遺伝子導入により検討した。PR-39遺伝子をSyndecan-1の発現が低下して高い浸潤能を持つ細胞に導入すると、トランスフェクタントはSyndecan-1の発現誘導とともに1型コラーゲンに対して著しい浸潤能の低下および固有運動能の低下を示した。細胞形態は紡錘形からコンパクトな多角形へと変化し、Actinの再構築も認めた。細胞形態の変化および固有運動能の低下はSyndecan-1トランスフェクタントには認められなかったのでPR-39はSyndecan-1の発現誘導に加えて、さらなる機能を有していると考えられた。

### (2) ras transformantへのPR-39の遺伝子導入について

PR-39の機能として白血球のp47<sup>phox</sup>のSH3 domainに結合しNADPH oxidaseの活性を抑さえるという報告やSH3 domainを有しシグナル伝達系に重要な蛋白であるp130Casに結合し、影響を及ぼすという報告から、PR-39遺伝子導入による肝癌細胞のactin構造の変化は、細胞骨格に関与するSH3 domainを有するある蛋白が標的となり、PR-39の競合によりsignal伝達が阻害されるためと想定した。そこで最もよくシグナル伝達系が解明されているactivated K-rasによるNIH3T3 transformantへPR-39遺伝子を導入し、ras transformantの生物学的変化について検討した。その結果PR-39 transfectantでは細胞の形態が変化し、細胞増殖能が低下していた。さらに、この細胞をヌードマウスに皮下移植すると2週後にはコントロールのras transformantに比較して有意に腫瘍が小さく、移植早期ではtumorigenesisが低下していた。また、PR-39 transfectantのMAPKおよびJNK/SAPK活性が低下していた。

## 結論

肝細胞癌において転移抑制因子としての機能を持つSyndecan-1の発現誘導因子であるPR-39はsyndecan-1の発現誘導に加えてactinの再構築を引き起こす。この機序についてはまだ明らかではないが、PR-39のSH3 domainへの結合能が関与していると想定される。ras transformantにPR-39遺伝子を導入すると細胞増殖能の低下とヌードマウス移植早期での腫瘍形成能の低下が認められた。これらの細胞のMAPK活性が低下していたことより、今後、PR-39は癌の転移を含めた進展阻止を目的としたシグナル伝達ブロックによる遺伝子治療に有用な遺伝子になると思われる。

具体的な方法および結果はすでに公表された論文・著書にて以下に報告する。