

## 論文要旨等報告書

氏	万代とし子
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3572号
学位授与の日付	平成20年3月25日
学位授与の要件	医歯学総合研究科病態制御科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	口腔癌における血管新生蛋白angiogeninの発現とその機能に関する研究

論文審査委員 教授 永井 教之 教授 佐々木 朗 准教授 久保田 聡

### 学位論文内容の要旨

#### 【緒言】

1985年に大腸癌細胞株HT-29より分離された分子量14 kDaのリボヌクレアーゼ活性を持つ血管新生蛋白angiogenin (以下Angと略す)は、大腸癌、乳癌、前立腺癌、頭頸部癌など種々の癌組織でその発現が亢進しており、腫瘍血管新生に重要な役割を果たすと考えられている。Angのレセプターは未だ同定されていないが、Angは血管内皮細胞にエンドサイトーシスにより取り込まれ、核へ移行し核小体を集積する。そして、AngはリボソームRNA (rRNA) 遺伝子のプロモータ領域に結合することによりrRNAの転写を刺激し、リボソームの産生、蛋白質への翻訳、細胞増殖を誘導する。このAngの核への移行は、正常の線維芽細胞や上皮細胞には起こらないが、最近、血管内皮細胞のみならず癌細胞に対しても特異的に起こることが明らかとなった。したがって、Angは腫瘍血管新生作用と同時に癌細胞自身への直接的な増殖作用を示すと考えられ、有望な癌の分子標的に成り得る可能性を持つ。

本研究では、口腔癌におけるAngの発現を血管新生因子として代表的なvascular endothelial growth factor (VEGF)ならびにbasic fibroblast growth factor (bFGF)と比較検討し、特に固形癌の微小環境として影響力の強い低酸素環境下での低酸素誘導性因子 (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ; HIF-1 $\alpha$ )とAngの発現に注目し検討を行った。また、RNA干渉 (RNA interference; RNAi)を用いて口腔癌細胞におけるAngの発現をノックダウンし、さらにAngの核移行の阻害剤であるneomycinを用いて、Angが口腔癌治療の分子標的となる可能性を追究し、口腔癌におけるAngの機能の解析を行った。

#### 【材料および方法】

1) 口腔扁平上皮癌症例におけるAng, VEGFおよびbFGFの蛋白発現と腫瘍血管密度 (MVD) ならびにHIF-1 $\alpha$ 蛋白発現との関連の検討

対象は当科で加療を受けた口腔扁平上皮癌患者からの生検材料または前治療を行っていない切除標本50例である。これらの標本の各血管新生因子およびHIF-1 $\alpha$ の蛋白発現を免疫組織化学的に検討した。なお、腫瘍微小血管を同定するためには抗ヒトCD31抗体を用いた。

2) 各種口腔扁平上皮癌細胞株におけるAng, VEGFおよびbFGFの発現に及ぼす低酸素の影響の検討

11種類のヒト口腔扁平上皮癌細胞株HSC-2, HSC-3, HSC-4, KB, SAS, SCCKN, T3M-1, Sa3, KOSC-3, UM1, UM2において、通常培養 (20%O<sub>2</sub>) および低酸素培養 (2%O<sub>2</sub>) を行い、各血管新生因子の細胞外への分泌量をELISAにて測定した。また、HSC-2細胞における通常および低酸素培養下で、HIF-1 $\alpha$ の蛋白発現をウエスタンブロット法にて、AngおよびVEGF mRNAの発現をリアルタイムPCR法にて解析した。

### 3) Ang の発現抑制が HSC-2 細胞の増殖および腫瘍血管新生に及ぼす影響の検討

Ang および VEGF の分泌量が高い HSC-2 細胞に, Ang に対する small interfering RNA (siRNA)発現プラスミド DNA を遺伝子導入し, Ang の発現をノックダウンした。そして, Ang siRNA 導入細胞株の増殖能の変化を *in vitro* および *in vivo* で検討した。また, この導入細胞をヌードマウスの背部皮下に植え付け, 形成された腫瘍組織の Ang, VEGF, PCNA および HIF-1 $\alpha$  の発現の変化を免疫組織学的に検討した。なお, MVD の検討のために, マウス腫瘍血管を抗マウス CD34 抗体を用いて免疫組織化学的に染色した。

### 4) Neomycin が HSC-2 細胞の *in vivo* での増殖に及ぼす影響の検討

HSC-2 細胞をヌードマウスの背部皮下に植え付け, 前項目 3)と同様の検討を行った。

## 【結果および考察】

1) 口腔扁平上皮癌症例 50 例における Ang, VEGF および bFGF の陽性率は, それぞれ 64% (50 例中 32 例), 56% (50 例中 28 例) および 14% (50 例中 7 例) であった。これらの血管新生因子と MVD の間には明らかな有意差は認められなかったが, Ang, VEGF および bFGF の陽性症例群では, それぞれの陰性症例群に比べ MVD が増加し, 中でも VEGF で顕著であった。一方, HIF-1 $\alpha$  の陽性率は, 72% (50 例中 36 例) であった。また, HIF-1 $\alpha$  と各血管新生因子の発現の関連に明らかな有意差は認められなかったが HIF-1 $\alpha$  の陽性症例群で, Ang および VEGF が強発現する傾向にあった。しかし HIF-1 $\alpha$  と bFGF の発現に関連は認められなかった。

2) 通常培養下での Ang の分泌量は細胞株によって大きな差が認められ, 低酸素培養下で著明に亢進した。一方, VEGF の分泌量も通常培養下で細胞株によって大きな差が認められたが, 低酸素培養下では明らかな亢進は認められなかった。このため, HSC-2 細胞を例にとり低酸素培養下での VEGF mRNA の発現量も調べたが亢進は軽度であった。また, bFGF の分泌量は低酸素培養下で HSC-2 細胞でのみ亢進が認められたが, Ang と VEGF の分泌量に比べると全細胞で 1/10 以下と非常に少ないものであった。そして, HSC-2 細胞における HIF-1 $\alpha$  蛋白および Ang mRNA の発現は低酸素開始 6 時間後にそれぞれ有意な亢進が認められた。一方, VEGF mRNA の発現は低酸素開始 12 時間後に軽度の亢進が認められた。

以上の臨床症例および培養細胞株の結果から, 口腔癌においては, 血管新生因子 Ang, VEGF および bFGF の中で Ang が最も低酸素環境の影響を強く受け, 主に HIF-1 $\alpha$  を介して強発現していると考えられた。

3) Ang siRNA 導入細胞株では, その増殖スピードは親株に比べ *in vitro* の無血清培養下では 48 時間で 2 割程度であるが減少し, さらに, ニードマウスに植え付けると劇的な増殖抑制が認められた。そして, Ang の発現は低下し, 逆に HIF-1 $\alpha$  と VEGF の発現は総じて亢進していた。一方, PCNA 陽性率と MVD は低下していた。したがって, Ang は口腔癌細胞の増殖に直接的に関与するだけではなく, 口腔癌の低酸素領域で VEGF に匹敵して腫瘍血管新生に関与すると考えられた。

4) ニードマウスに移植された HSC-2 細胞の腫瘍組織に対し, neomycin による明らかな腫瘍増殖抑制効果が認められた。しかしながら, neomycin 投与群の腫瘍組織においては, 対照群と比較して核における Ang の発現, PCNA 陽性率および MVD の有意な低下を認めるには至らず, 口腔癌における neomycin の抗腫瘍作用およびその機序を解明することはできなかった。Neomycin の neamine 部分では毒性が低く, Ang の核への移行を阻害することが報告されているが, 今後, 腫瘍血管新生阻害剤として neamine による口腔癌の治療効果に関してさらに研究が必要と思われた。

## 【結 論】

Ang は口腔癌の増殖, 進展ならびに腫瘍血管新生に重要であり, 口腔癌の治療標的分子として有用であると考えられた。

## 論文審査結果の要旨

Angiogeninは大腸癌細胞株HT-29より分離された分子量14kDaのリボヌクレアーゼ活性を持つ血管新生蛋白である。Angiogeninは、大腸癌、前立腺癌、頭頸部癌など種々の癌組織でその発現が亢進しており、腫瘍血管新生に重要な役割を果たすと考えられている。Angiogeninは血管内皮細胞にエンドサイトーシスにより取り込まれ、核へ移行し、リボソームRNAの転写を刺激し、リボソームの産生、蛋白質への翻訳、細胞増殖を誘導する。このangiogeninの核への移行は、最近、血管内皮細胞のみならず癌細胞に対しても特異的に起こることが明らかとなった。したがって、angiogeninは腫瘍血管新生作用と同時に癌細胞自身への直接的な増殖作用を示すと考えられ、その制御は有望な癌の分子標的療法の1つと成り得る可能性を持っている。

本研究では、口腔扁平上皮癌におけるangiogeninの発現を血管新生因子のvascular endothelial growth factor (VEGF)ならびにbasic fibroblast growth factor (bFGF)と比較検討し、特に固形癌の微小環境として影響力の強い低酸素環境下での低酸素誘導性因子 (hypoxia inducible factor-1  $\alpha$ ; HIF-1  $\alpha$ )とangiogeninの発現に注目し検討を行った。また、RNA干渉 (RNA interference; RNAi)を用いて口腔扁平上皮癌細胞におけるangiogeninの発現をノックダウンしてangiogeninの機能の解析を行い、以下の結論を得た。

- 1) 口腔扁平上皮癌においては、血管新生因子angiogenin, VEGFおよびbFGFの中でangiogeninが最も低酸素環境の影響を強く受けて活性化しており、腫瘍増殖に必要な血管新生に重要な役割を果たすと考えられた。
- 2) Angiogeninの発現抑制動物実験より、腫瘍増殖が著しく抑えられたことから、口腔扁平上皮癌の増殖・進展に重要であることが示唆された。

これらの知見は口腔扁平上皮癌におけるangiogeninの発現とその機能を明らかにし、angiogeninが口腔扁平上皮癌の分子標的療法の標的分子として有用であることを示すものとして価値のある研究業績である。したがって、本申請論文は博士（歯学）の学位授与に値するものと判断した。