

氏名	柴田 茜		
学位	博士		
専門分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第4923号		
学位授与の日付	平成26年3月25日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)		
学位論文題目	血管新生因子 angiogenin の新規阻害剤 terrein の口腔癌制御に関する検討		
学位論文審査委員	飯田 征二 教授	辻極 秀次 准教授	
	佐々木 朗 教授		

学位論文内容の要旨

【緒言】

癌の浸潤・転移に血管新生が重要な役割を果たすことが知られ、現在血管新生を標的とした分子標的薬の開発ならびに臨床応用が進められている。

癌細胞の産生する血管新生因子 angiogenin (ANG) は、血管内皮細胞に作用し血管新生を促進する。最近、ANG は血管内皮細胞に作用するのみならず、癌細胞自身の増殖も直接的に促進させることが明らかになった。従って ANG を分子標的とした治療法の開発は、血管新生と癌細胞増殖を同時に抑制できる可能性があり、臨床応用への展開が期待できる。

アスペルギルス属真菌 (*Aspergillus terreus*) の代謝産物として単離された terrein は、これまでにメラニン産生抑制効果、表皮角化細胞の増殖抑制効果、血小板凝集抑制作用等の多様な作用を有することが報告されている。最近、terrein は前立腺癌細胞の ANG 発現を抑制することが明らかとなり、terrein が ANG の新規阻害剤として効果を示す可能性がある。しかし terrein の ANG 産生の抑制機序や抗腫瘍効果については不明な点も多く、口腔癌に対する作用についての報告はない。そこで本研究では、terrein の口腔癌に対する抗腫瘍効果ならびに作用機序について明らかとする目的で検討を行った。

【材料と方法】

1) terrein が口腔癌細胞に与える影響

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2, HSC-3, HSC-4, SAS, OSC-19, OSC-20 に terrein (20, 50 μ M) を添加し、増殖能を評価した。また、高浸潤・高転移能を有する OSC-19 については terrein (20, 50 μ M) の存在下で培養し、運動能は wound healing assay, 遊走能は migration assay, 浸潤能は invasion assay を行い評価した。

2) terrein が OSC-19 細胞の ANG に与える影響

terrein が ANG 産生に与える影響は、OSC-19 の培養上清を回収し、ELISA 法で評価した。リボソーム生合成に与える影響は、Nucleolar organizer region の銀染色を行い評価した。細胞内局在に与える影響については ANG のみを添加した群と terrein 20 μ M 添加後、ANG を添加した群で免疫蛍光抗体染色を行った。

3) terrein がヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) に与える影響

HUVEC に terrein (20, 50 μ M) を添加し細胞増殖能と管腔形成能を評価した。ANG の細胞内局在に与える影響については OSC-19 と同様に免疫蛍光抗体染色を行った。

4) terrein が腫瘍移植動物実験モデルに与える影響

5 週齢雄 BALB/c 系 nu/nu スードマウスの背部皮下に OSC-19 (8×10^5 個/匹) を移植し担癌動物モデルを作製した。terrein (30mg/kg, 2 回/週) を腹腔内注射し、腫瘍体積を経時的に計測した。

8 週後にマウスを屠殺し、腫瘍塊を取り出し組織切片を作製した。切片は、H-E 染色ならび CD31, Ki67, ANG の免疫組織学的染色を行い評価した。

【結果】

1) 各種口腔癌細胞への terrein の影響: HSC-2, HSC-3, HSC-4, SAS, OSC-19, OSC-20 に terrein (20, 50 μ M) を添加すると、経時的にすべての口腔癌細胞において terrein 添加群が有意に細胞増殖能を抑制した。また、OSC-19 細胞への terrein の運動能、遊走能、浸潤能への影響は、terrein 添加群が有意にすべて抑制されていた。

2) リボソーム生合成への terrein の影響: OSC-19 の terrein (20, 50 μ M) 添加群で対照群と比較して生合成が有意に抑制されていた。ANG の細胞内局在に与える影響では、通常 ANG は核内移行するが、terrein 添加群にて ANG の核への取り込みが阻害されていた。

3) 血管内皮細胞への terrein の影響: terrein (20, 50 μ M) を HUVEC に添加すると、口腔癌細胞と比較し増殖率は低かったが、terrein 添加群では対照群と比較すると有意に増殖能が抑制されていた。また管腔形成能は、terrein の濃度依存的に抑制されていた。ANG の細胞内局在に与える影響では、対照群と terrein 添加群にて ANG の核への取り込みは OSC-19 細胞ほど阻害されていなかった。

4) terrein が担癌動物モデルに与える影響: terrein 投与群が有意に腫瘍体積ならびに腫瘍重量が抑制されていた。摘出材料の免疫組織学的染色において CD31 陽性の血管面積では terrein 投与群が対照群と比較し有意に血管新生が抑制されていた。また Ki67 では terrein 投与群で対照群と比較し有意に陽性細胞数が抑制されていた。ANG の局在においては、terrein 投与群が対照群と比較し核内の染色性が低下していた。なお、体重減少等の副作用は認めなかった。

【考察】

癌細胞の産生する ANG は、受容体に結合するとシグナル伝達因子である ERK と Akt が活性化すると同時に核内に移行し、核内の ANG は rRNA の転写を促進させ細胞増殖を促進する。本研究で in vitro において terrein は、口腔癌細胞において ANG の産生および核移行を阻害することでリボソーム生合成を抑制し、増殖能、運動能、遊走能、浸潤能を低下させたと考えられた。また血管内皮細胞においても terrein は細胞増殖および管腔形成を阻害していた。in vivo においても terrein 投与群では抗腫瘍効果を認め、組織切片での検討で ANG の核内移行、細胞増殖も抑制されており、さらに血管新生も抑制されていた。これらのことから terrein は ANG の核移行を阻害することで、癌細胞自身の増殖を抑制し、血管新生を抑制することで抗腫瘍効果を持つと考えられた。

【まとめ】

terrein は、in vivo, in vitro において明らかに抗腫瘍効果を認め、また癌微小環境の代表的な標的である血管新生を抑制した。このことから今後 terrein が口腔癌の分子標的治療の候補となりうる可能性が示唆された。

学位論文審査結果の要旨

本研究は、腫瘍血管新生を標的とした分子標的薬の開発が行われている世界的潮流の中で、血管新生因子 angiogenin (ANG) に注目し、その新規阻害剤である terrein の抗腫瘍効果について検討を行ったものである。

ANG は近年、血管内皮細胞の増殖に作用するだけでなく、癌細胞の増殖も促進させることが報告され、非常に注目されている血管新生因子である。ANG を分子標的とすることで、血管新生阻害効果と抗腫瘍効果の両方を目的とした癌治療薬への展開が期待されている。

一方、terrein はアスペルギルス属真菌の代謝産物で、前立腺癌細胞において ANG 産生を抑制することが最近報告されている。しかし、その作用機序や、terrein の抗腫瘍効果については不明な点が多く、また口腔癌に対する作用についての報告は全くない。

そのため本研究では、terrein が口腔癌細胞に対して抗腫瘍活性を示すか否かについて検討を行い、さらにはその作用機序について、特に癌細胞に与える直接的影響と、血管新生を介した影響について検討を行ったものである。

研究結果は以下の内容であった。

- 1) terrein がヒト口腔扁平上皮癌細胞株の ANG 産生、増殖能、遊走能、浸潤能、リボソーム生合成、ANG の核移行を抑制することを示した。
- 2) terrein がヒト臍帯血管内皮細胞の増殖能と管腔形成能を抑制することを示した。
- 3) terrein がヌードマウス背部皮下移植腫瘍モデルにおいて、腫瘍体積ならびに腫瘍重量を有意に抑制し、抗腫瘍活性をもつことを示した。また病理組織学的に、癌細胞における ANG の核移行と増殖活性を抑制し、血管新生能も抑制することを示した。

本研究は、terrein が口腔癌細胞の ANG 産生および核移行を阻害することで、リボソーム生合成を抑制し、増殖能、運動能、遊走能、浸潤能を低下させることで、腫瘍増殖を抑制することを示した。さらに terrein が血管内皮細胞の増殖能と管腔形成能を低下させ、血管新生能を低下させることも示した。以上のことから、ANG の新規阻害剤 terrein は口腔癌において腫瘍増殖と血管新生を抑制することで、抗腫瘍活性を発揮すると考えられた。

本論文は terrein が口腔癌において抗腫瘍活性を持つことを示唆する重要な知見を示した。よって論文審査担当者は一致して、本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認めた。