

氏名	増井 正典		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第5490号		
学位授与の日付	平成29年3月24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 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	Nobel Midkine Inhibitor iMDK Inhibits Tumor Growth and Angiogenesis in Oral Squamous Cell Carcinoma (新規 Midkine 阻害剤 iMDK の口腔扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果と抗血管新生効果の検討)		
論文審査委員	浅海 淳一 教授	中野 敬介 准教授	佐々木 朗 教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

口腔扁平上皮癌は診断技術の進歩，社会への病識の啓蒙等により，早期癌の生存率は良好であるが，進行癌における生存率は依然不良である。近年，切除不能進行・再発頭頸部癌に対して，分子標的治療薬が使用されており，生存期間を延長させているが，薬剤耐性例の出現も報告されているため，より多岐にわたる標的分子の探索が急がれている。Midkine (MK) は種々のヒト悪性腫瘍において高発現するヘパリン結合性の成長因子である。MKは悪性腫瘍において，細胞生存，分裂，形質転換，抗アポトーシス，腫瘍増殖などの作用を有することが報告されている。口腔扁平上皮癌においてもMKが発現することが報告されており，血清中のMK濃度が，予後不良と相関することが報告されている。また，siRNAによってMKを抑制すると細胞周期調節遺伝子の発現により細胞増殖が抑制されることも報告されているが，口腔扁平上皮癌におけるMKの役割に関してはほとんど報告されていないのが現状である。申請者らはMKプロモータを用いたcell base assayにより選定された低分子化合物iMDKが非小細胞肺癌の増殖を抑制する事が報告してきた。本研究では，iMDKを用いて口腔扁平上皮癌細胞株におけるMKの生物学的作用を検討するとともに，口腔扁平上皮癌に対する新規MK阻害薬iMDKの抗腫瘍効果と抗血管新生効果を検討したので報告する。

【方法】

1. 口腔扁平上皮癌におけるMKの発現

岡山大学病院口腔外科（病態系）で手術施行した口腔扁平上皮癌症例の臨床検体におけるMKの発現を免疫組織化学染色で解析した。

2. 動物実験

BALB/c系ヌードマウス（5週齢，雌）に口腔扁平上皮癌細胞株HSC-2細胞，SAS細胞を各 1×10^6 個背部皮下に移植し，マウス背部皮下移植モデルを作製した。移植2週間から，iMDKを9mg/kg，5回/週で腹腔内投与を開始した。対照群にはDMSOの腹腔内投与を行った。経時的に腫瘍体積の計測を行い対照群と比較し，屠殺後，摘出腫瘍組織における蛋白質発現を免疫組織化学染色で検討した。

3. iMDKが口腔扁平上皮癌細胞株の増殖能に与える影響

HSC-2 細胞, SAS 細胞に iMDK を添加し, MTS assay を行い増殖能に与える影響を検討した。

4. iMDK が口腔扁平上皮癌細胞株のシグナル分子に与える影響

HSC-2 細胞, SAS 細胞に iMDK20nM を添加し培養を行い, シグナル分子に与える影響をウエスタンブロット法で検討した。

5. iMDK が口腔扁平上皮癌細胞株のアポトーシスに与える影響

iMDK の HSC-2 細胞におけるアポトーシス誘導作用を TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) 法を用いて検討を行った。iMDK を添加し培養した HSC-2 細胞と口腔扁平上皮癌細胞株マウス背部皮下移植モデルから摘出した腫瘍の TUNEL 染色を行った。

6. iMDK がヒト臍帯静脈血管内皮細胞の管腔形成に与える影響

iMDK が VEGF により促進したヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC の管腔形成に与える影響を検討するため, 血管新生キット (クラボウ) を用いて検討した。

【結果】

臨床検体において, MK は正常歯肉上皮において発現は認められなかったが, 扁平上皮癌組織において強発現を認めた。HSC-2 細胞, SAS 細胞移植ヌードマウスでは, 対照群と比較して, iMDK 投与群は有意に腫瘍体積が抑制された。摘出腫瘍の免疫組織化学染色では, 対照群と比較して, iMDK 投与群は MK の発現と血管内皮細胞のマーカーである CD31 の発現が減少した。HSC-2 細胞, SAS 細胞ともに iMDK 濃度依存的に有意に細胞増殖能が抑制された。iMDK20nM を HSC-2 細胞および SAS 細胞に添加すると, MK, p-Akt, p-Erk の発現は時間依存的に抑制されたが, MK とともに成長因子ファミリーを形成する Pleiotrophin の発現には変化を認めなかった。TUNEL 染色では HSC-2 細胞のアポトーシスを *in vivo*, *in vitro* で誘導した。VEGF 添加により誘導される HUVEC の管腔形成能は iMDK 濃度依存的に抑制された。

【考察】

口腔扁平上皮癌臨床検体において癌進展に伴い MK の発現が増大しており, MK は口腔扁平上皮癌においても腫瘍の進展や増殖に影響を及ぼすことが示唆された。MK 阻害剤 iMDK は, 口腔扁平上皮癌細胞に対して細胞増殖を抑制し, 腫瘍細胞のアポトーシス誘導作用を有しており, 口腔扁平上皮癌治療において標的分子となる可能性が示唆された。MK は悪性腫瘍において PI3K-AKT 経路と MAPK-ERK 経路の両方を活性化することが報告されているが, iMDK により, 腫瘍細胞内の MK プロモーターの転写活性抑制されることで, MK の発現・分泌は低下し, AKT 経路と ERK 経路の両者のシグナル伝達経路を抑制した。一方で, HSC-2 細胞と SAS 細胞の両者で iMDK 添加後, 一時的な AKT 発現の上昇を認めたが, ERK 経路の down-regulation の代償として AKT 経路の up-regulation が生じている可能性が示唆された。iMDK は血管内皮細胞の管腔形成能にも影響を与える事が示唆された。これは HUVEC において産生される MK の発現が iMDK により抑制されることで, HUVEC の細胞増殖が抑制された結果と考えられた。

【結論】

MK は口腔扁平上皮癌に発現し, 腫瘍の増大と腫瘍血管新生を促進させることが示唆された。MK は口腔扁平上皮癌の新たな分子標的となる可能性があり, iMDK を用いた今後の治療への可能性が期待できる。

論文審査結果の要旨

Midkine (MK) は種々の悪性腫瘍で高発現するヘパリン結合性の成長因子である。MK は悪性腫瘍において、細胞生存、抗アポトーシス、腫瘍増殖などの作用を有することが報告されている。口腔扁平上皮癌でもMKが発現し、血清中のMK濃度が予後と相関することが報告されているが、口腔扁平上皮癌でのMKの役割に関してはほとんど報告されていない。本研究は、MKプロモーターを用いたcell base assayにより選定されたMK活性の阻害剤である低分子化合物iMDKを用いて、口腔扁平上皮癌細胞株におけるMKの生物学的作用を検討し、口腔扁平上皮癌に対するiMDKの抗腫瘍効果と抗血管新生効果の検討を行なったものである。

本研究では、岡山大学病院口腔外科(病態系)で手術施行した口腔扁平上皮癌症例の手術材料のMK発現を免疫組織化学的に解析した。口腔扁平上皮癌細胞株HSC-2細胞、SAS細胞を用いてマウス背部皮下移植モデルを作製し、移植2週間後から、iMDKを9mg/kg、5回/週で腹腔内投与を開始し、腫瘍体積を経時的に計測した。屠殺後、摘出腫瘍組織での蛋白質発現を免疫組織化学染色で検討した。in vitroでのiMDKがHSC-2細胞、SAS細胞の増殖能に与える影響についてMTS assayで検討した。iMDKがHSC-2細胞、SAS細胞のシグナル分子に与える影響をウエスタンブロット法で検討した。iMDKがHSC-2細胞とマウス背部皮下移植モデル摘出腫瘍のアポトーシスに与える影響はマウスをTUNEL染色で検討した。iMDKがヒト臍帯静脈血管内皮細胞HUVECの管腔形成に与える影響について血管新生キットを用いて検討した。

臨床検体の組織学的に、MKは正常歯肉上皮では発現が認められず、扁平上皮癌組織で強発現を認めた。HSC-2細胞、SAS細胞移植マウスでは、iMDK投与群は有意に腫瘍体積が抑制された。摘出腫瘍の免疫組織化学染色では、iMDK投与群はMKの発現と血管内皮細胞のマーカーであるCD31の発現が減少した。HSC-2細胞、SAS細胞ともにiMDK濃度依存的に有意に増殖能が抑制された。iMDK20nMをHSC-2細胞、SAS細胞に添加すると、MK、p-Akt、p-Erkの発現は時間依存的に抑制されたが、MKとともに成長因子ファミリーを形成するPleiotrophinの発現には変化を認めなかった。TUNEL染色ではHSC-2細胞のアポトーシスをin vivo, in vitroで誘導した。VEGF添加で誘導されるHUVECの管腔形成能はiMDK濃度依存的に抑制された。

以上より、iMDKは、口腔扁平上皮癌細胞に対して細胞増殖を抑制し、腫瘍細胞のアポトーシス誘導作用を有することから、口腔扁平上皮癌治療の標的分子となる可能性が示唆された。iMDKにより、腫瘍細胞内のMKプロモーターの転写活性抑制されることで、MKの発現・分泌は低下し、AKT経路とERK経路の両者のシグナル伝達経路を抑制した。iMDKは血管内皮細胞で産生されるMKの発現を抑制し、細胞増殖を抑制することで管腔形成能に影響を及ぼす可能性が示唆された。

本論文は、MKが口腔扁平上皮癌で発現し、腫瘍の増大と腫瘍血管新生を促進させ、iMDKはその阻害薬となることを示す重要な知見である。よって、審査委員会は本論文に博士(歯学)の学位論文としての価値を認める。