

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
佐々木 朗 印	研究の統括, 総合的指導
印	
印	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野 病態制御科学専攻 口腔顎顔面外科学	身分 大学院生	氏名 廣瀬 泰良
論 文 題 名 Terreinの悪性黒色腫に対する抗腫瘍効果に関する研究		
論文内容の要旨 (2000字程度)		
<p>【緒言】</p> <p>悪性黒色腫はメラノサイトを由来とする悪性腫瘍で皮膚に好発し, 早期にリンパ行性転移, 血行性転移をきたす予後不良の腫瘍である. 悪性黒色腫は放射線感受性が低いため, 治療の中心は手術療法と薬物療法であるが, 手術療法においては原発巣の広範囲切除術が強く推奨されており, 広範囲切除術後には機能障害および整容的問題が起こる. 近年, 免疫チェックポイント阻害薬および BRAF 阻害薬などの分子標的薬の登場により, 悪性黒色腫の治療は大きく変化しつつあるが, 未だ十分な根治性が得られないのが現状である.</p> <p>Angiogenin (ANG) はヒト大腸癌細胞株 HT-29 の培養上清から発見された血管新生因子である. 近年, 癌細胞の産生する ANG はオートクライン的に癌細胞にも作用し, 癌細胞の増殖を促進することが明らかとなった. また悪性黒色腫細胞においても, ANG は血管新生に加え, 腫瘍細胞増殖にも直接関与しており, さらに内因性 ANG の発現が線維芽細胞成長因子の発現を増加させることが報告されている. したがって, ANG の選択的阻害により血管新生と腫瘍細胞増殖を同時に制御できる可能性が示唆されている.</p> <p>アスペルギルス属真菌の代謝産物である terrein は前立腺癌細胞の ANG 産生を抑制することが報告されているが, 天然型 terrein は大量の菌塊から微量しか抽出できないため, 薬理作用の解明は進んでいなかった. 萬代らの研究グループは terrein を完全化学合成する経路を確立した. 本研究では, 萬代らの研究グループから供与を受けた合成 terrein を用いて ANG 産生抑制による悪性黒色腫細胞に対する抗腫瘍効果とその機序について検討を行った.</p> <p>【材料および方法】</p> <p>1. Terrein が悪性黒色腫細胞およびメラノサイト, 歯肉上皮前駆細胞に与える影響 ヒト悪性黒色腫細胞株 (A375), マウス悪性黒色腫細胞株 (B16) を terrein 20 μM 存在下で培養し, 増殖能を検討した. またヒトメラノサイト (NHEM-Ad), ヒト歯肉上皮前駆細胞 (HGEPp) を terrein 20 μM 存在下で培養し, MTT アッセイにて細胞毒性を検討した. さらに A375 については運動能, 遊走能, 浸潤能を検討した.</p> <p>2. Terrein が A375 の ANG 発現およびリボソーム生合成に与える影響 Terrein の A375 における ANG 発現に与える影響については Western Blotting 法 (WB 法), および ELISA 法にて評価した. ANG 受容体である Plexin-B2 (PLXNB2) 発現は WB 法にて評価した. またリボソーム生合成に与える影響については Argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) 染色を施行し, 評価した.</p>		

論文内容の要旨（2000字程度）

3. Terrein が悪性黒色腫皮下移植動物モデルに与える影響

5 週齢雄 BALB/c-nu/nu ノードマウスの背部皮下に A375 を 1×10^6 個ずつ移植し、悪性黒色腫皮下移植動物モデルを作製した。移植から 2 週より週 2 回、terrein を 30mg/kg、腹腔内投与し、腫瘍体積を経時的に計測した。移植後 5 週でマウスを屠殺し、腫瘍周囲血管を解析した。また摘出した腫瘍から組織切片を作製し、抗 ANG 抗体による免疫染色および TUNEL アッセイによるアポトーシスの検出を行った。

4. Terrein が A375 のアポトーシス誘導に与える影響

A375 を terrein 20 μ M 存在下で培養、タンパクを回収し、Bcl-2 発現、Nf- κ B 発現、Caspase3 発現、Cleaved-caspase3 発現を WB 法にて評価した。

【結果】

1. 悪性黒色腫細胞およびメラノサイト、歯肉上皮前駆細胞への影響

Terrein 存在下で培養した A375, B16 では経時的に細胞増殖が減少しており、対照群に比べ増殖能が有意に抑制されていた。NHEM-Ad および HGEpp の MTT アッセイでは生存率に有意差はなく、terrein による毒性は認めなかった。また A375 に terrein を添加することで、運動能、遊走能、浸潤能のすべてが有意に抑制されていた。

2. ANG 発現およびリボソーム生合成への影響

ANG 発現については WB 法、ELISA 法ともに terrein 添加群で有意に抑制されていた。WB 法における PLXNB2 発現については有意差を認めなかった。またリボソーム生合成への影響については、terrein 添加群で染色された AgNOR 陽性数が減少しており、リボソーム生合成を有意に抑制していた。

3. 悪性黒色腫皮下移植動物モデルへの影響

Terrein 投与後から徐々に腫瘍体積を抑制しており、17 日目まで有意差が認められた。摘出腫瘍周囲の血管数、血管長、血管面積はすべて terrein 投与群で有意に抑制されていた。抗 ANG 抗体による免疫染色では ANG の染色性が terrein 投与群で抑制されていた。また TUNEL アッセイにて検出されたアポトーシスを示す細胞数は terrein 投与群で有意に増加していた。

4. アポトーシス誘導への影響

Bcl-2 発現および Nf- κ B については terrein 添加群で有意に抑制されていた。また Caspase3 発現では有意差を認めなかったが、Cleaved-Caspase3 発現では terrein 添加群で有意に増加が認められた。

【考察】

ANG は癌細胞に対してもオートクライン的に作用し rRNA 転写と細胞増殖を亢進させる。蛋白質の合成はリボソーム生合成によって厳密に制御されており、リボソーム生合成の律速段階となっているのが rRNA 転写である。ANG の細胞増殖促進作用は、この rRNA 転写を促進することによる。Terrein による悪性黒色腫細胞の細胞活性の抑制は、ANG 発現抑制とそれに伴うリボソーム生合成の低下に起因すると考えられた。

Terrein は悪性黒色腫のアポトーシスに影響を与えていると考えられた。Caspase3 は抗アポトーシス性に働く Bcl-2 を切断し、アポトーシスを促進する。Terrein は抗アポトーシス性タンパク質である Bcl-2 発現を抑制し、Caspase3 を活性化させ、アポトーシスを誘導していた。ANG は抗アポトーシス性因子の発現を上昇させるが、terrein は ANG を抑制することで、ANG の抗アポトーシス作用を阻害し、アポトーシスを誘導していると考えられた。

【結語】

本研究では、terrein は ANG を阻害することで、血管新生阻害と腫瘍細胞のアポトーシス誘導により、悪性黒色腫に対する新規治療法となる可能性を見出した。