

氏名	青木 香澄
学位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4522号
学位授与の日付	平成24年3月23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 を標的とした口腔扁平上皮癌の癌骨破壊制御に関する研究
学位論文審査委員	教授 長塚 仁 教授 佐々木 朗 教授 滝川 正春

学位論文内容の要旨

【緒言】

口腔癌の顎骨への浸潤、骨破壊は広範囲な顎骨切除が必要となり、咀嚼機能の低下など患者のQOLを低下させる。癌による骨浸潤、骨破壊には破骨細胞性骨吸収が重要な役割を果たしており、その制御は臨床上極めて重要な課題である。また、癌の増殖には血管新生が必要であり、近年、血管新生を標的とした治療が臨床応用されてきている。

Angiogenin(ANG)はヒト結腸癌細胞株の培養上清から単離された血管新生因子である。癌細胞が産生するANGは血管内皮細胞に作用し、腫瘍血管新生に重要な役割を果たしている。ANGによる血管新生は主に4つの機序により引き起こされている。すなわち、リボヌクレアーゼ活性、血管内皮細胞基底膜の分解、ERKとAktによるシグナル伝達、rRNAの転写促進である。これまでに種々の癌細胞でANGの発現の亢進が確認されているが、口腔癌における報告はほとんどない。また、血管新生因子は破骨細胞性骨吸収と関連して認められることが多く、骨形成のみならず破骨細胞形成と血管新生因子が相互に密接な関係にあることが示唆されている。しかし、癌誘発性骨破壊に対するANGの関わりについては明らかにされていない。そこで、本研究では癌の骨浸潤などの癌誘発性骨破壊に対するANGの分子標的治療としての有用性ならびにその制御機構を検討した。

【材料と方法】

1. ANGの血管新生能に関する検討

血管新生能の評価にはAngiogenesis kitを用いた。正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に種々の濃度のANGを添加して培養を行い、またHUVECにANGのsiRNA(ANG-siRNA)を遺伝子導入して、ANGをノックダウンして、それぞれのHUVECの管腔長を測定した。

2. ANGの腫瘍増殖能に関する検討

ANG分泌レベルの高いヒト口腔扁平上皮癌細胞株HSC-2を使用し、ANGが口腔癌細胞の細胞増殖に与える影響を検討するため、ANGをノックダウンしたHSC-2細胞の増殖能について細胞数を測定して検討した。

3. ANGの破骨細胞性骨吸収に対する影響

6週齢雄 C57BL/6J マウスの大腿骨骨髓細胞を回収し、種々の濃度の ANG を添加して培養し、TRAP 染色を行った。TRAP 陽性で3核以上の多核細胞を破骨細胞としてその細胞数を測定した。破骨細胞の吸収活性は pit formation assay にて評価した。ANG-siRNA が破骨細胞形成系に与える影響を調べるため、骨髓細胞に ANG-siRNA を遺伝子導入し、ANG の発現をノックダウンさせて、同様に TRAP 染色にて破骨細胞数を測定した。

4. ANG ノックアウトマウス (ANG-KO マウス) の破骨細胞形成能の検討

ANG-KO マウスの骨髓細胞、脾細胞を用いて、破骨細胞形成能を野生型 (WT) との比較から検討した。破骨細胞形成の評価は同様に TRAP 染色にて破骨細胞数を測定した。

5. ST2 細胞における ANG の影響を検討

マウス骨髓間質細胞である ST2 細胞に種々の濃度の ANG を添加した場合の RANKL, OPG, M-CSF, ANG の mRNA 発現を RT-PCR 法にて検討した。

6. マウス癌骨破壊動物モデルでの検討

癌の骨破壊の評価には、ANG の発現を抑制した癌細胞を髄腔内に注入して作製した骨破壊モデルを用いて検討した。作製したモデルに対して、X線学的、組織学的、免疫組織化学的に検討した。

【結果と考察】

1) ANGの血管新生能ならびに腫瘍増殖能の検討

HUVEC の ANG を siRNA にてノックダウンすると、その管腔形成能は著明に抑制された。また、HSC-2 の ANG の発現をノックダウンすると細胞増殖能は抑制された。これらの結果より、ANG は癌細胞を直接的に促進し、癌細胞から産生された ANG によって腫瘍血管新生が促進することにより腫瘍増殖を調整している可能性が示唆された。

2) ANG の破骨細胞性骨吸収に与える影響

マウス骨髓細胞を用いて ANG の破骨細胞形成能、骨吸収活性能を検討した結果、破骨細胞形成も骨吸収活性も促進していた。また、ANG を siRNA でノックダウンした系ならびに ANG-KO マウスを用いた ANG の発現抑制によって破骨細胞形成は抑制された。以上の結果より、ANG は破骨細胞形成ならびに骨吸収活性に対して促進的に働くことが示唆された。破骨細胞形成を支持する骨髓間質細胞 ST2 による破骨細胞分化誘導関連遺伝子の検索を行ったが、RANKL, OPG, M-CSF の発現は変化が少なく、ANG の発現は上昇していた。この結果は ANG は破骨細胞形成に促進的に働くものの、破骨細胞活性因子である RANKL と RANK を介した骨芽細胞とのカップリングに関しては影響が少ないと考えられた。このことから、ANG は骨芽細胞には影響が少なく、破骨細胞分化の過程に関与している可能性が推測される。

3) ANG の口腔扁平上皮癌の癌骨破壊動物モデルでの検討

HSC-2 細胞を大腿骨骨髓腔内に注入した骨破壊モデルの検討では、HSC-2 の ANG をノックダウンすることにより、X線学的、組織学的検討から腫瘍の増殖は抑制され、破骨細胞形成ならびに骨吸収も抑制され、腫瘍周囲の血管新生も抑制した。

以上の結果より、ANG は i)腫瘍増殖、ii)血管新生、iii)破骨細胞性骨吸収の抑制を期待した分子標的治療のターゲットになる可能性が示唆された。現在、抗 ANG 薬としての開発が進められており、癌治療のみならず、骨代謝性疾患への展開が期待される。

学位論文審査結果の要旨

口腔癌における顎骨浸潤、骨破壊は患者の QOL を著しく低下させることから、癌骨破壊の制御は臨床上極めて重要な課題である。また、癌の増殖には血管新生が必要であり、近年、血管新生を標的とした治療が臨床応用されてきている。angiogenin(ANG)はヒト結腸癌細胞株の培養上清から単離された血管新生因子である。癌細胞が産生する ANG は血管内皮細胞に作用し、腫瘍血管新生に促進的に働くことが明らかとなっており、これまでに種々の癌細胞で ANG の発現の亢進が確認されている。しかし、口腔癌における報告はほとんどなく、また、癌誘発性骨破壊に対する ANG の関わりについては明らかにされていない。そこで、本研究では癌誘発性骨破壊に対する ANG の役割ならびに ANG の分子標的治療としての可能性を検討し、以下の結果を得た。

1) ANG の血管新生能ならびに腫瘍増殖能の検討

口腔扁平上皮癌細胞 HSC-2 の ANG の発現をノックダウンすると細胞増殖能は抑制された。また HUVEC において ANG は濃度依存的に管腔形成能を促進し、ANG の発現を抑制すると管腔形成能は抑制された。

2) ANG の破骨細胞性骨吸収に与える影響

マウス骨髄細胞に ANG を添加して培養すると破骨細胞形成が亢進し、骨吸収活性も亢進した。また、骨髄細胞の ANG の発現を siRNA でノックダウンすると破骨細胞形成の抑制が認められた。ANG-KO マウスの骨髄細胞、脾細胞を使用した破骨細胞形成の検討では破骨細胞形成は共に抑制された。破骨細胞形成を支持する骨髄間質細胞 ST2 による破骨細胞分化誘導関連遺伝子の mRNA の発現の変化では、RANKL、OPG、M-CSF の発現は変化が少なく、ANG の発現は上昇していた。

3) ANG の口腔扁平上皮癌の癌骨破壊動物モデルでの検討

ANG の発現をノックダウンした HSC-2 で作製した癌骨破壊モデルの検討では、X 線学的、組織学的検討から腫瘍の増殖は抑制され、破骨細胞形成ならびに骨吸収も抑制され、腫瘍周囲の血管新生も抑制されていた。

以上の結果より、ANG は i)腫瘍増殖、ii)血管新生、iii)破骨細胞性骨吸収の抑制を期待した分子標的治療のターゲットになる可能性が示唆された。本研究は癌治療の面で有用な知見と考えられる。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。