

論文の内容の要旨

氏名：山 村 崇 之

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3 のリンパ管新生因子の発現を調節する

腫瘍の所属リンパ節転移や遠隔臓器転移は癌関連死の大きな要因である。転移病巣成立には、癌細胞は腫瘍胞巣周囲に存在する脈管へ浸潤するために、腫瘍細胞による間質の破壊とリンパ管の密度が重要である。腫瘍細胞は、matrix metalloproteinase (MMP) を分泌して、細胞周囲の間質を破壊し、vascular endothelial growth factor ファミリー (VEGF-A, -B, -C および-D), angiopoietin-2 (ANGPT2) や、platelet-derived growth factor (PDGF) を分泌し、血管およびリンパ管新生を誘導して固有間質を形成することが知られている。これらの遺伝子発現は様々な機構により調節されているが、近年、ヒストン脱アセチル化との関係が重要視されている。特に、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACI) は、細胞の増殖やアポトーシスに関わる因子の発現や活性化に対してエピジェネティックな影響を及ぼすため、新たな癌治療薬として注目を集めている。そこで、HDACI の一つである酪酸ナトリウム (SB) が口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3 のリンパ管新生因子と MMP 阻害因子である tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP) の転写・翻訳に与える影響について検討した。

HSC-3 は RIKEN バイオリソースセンターから購入し、10%ウシ血清添加 RPMI-1640 培養液 (Gibco) で培養した。培養液中に種々の濃度の SB (0, 1, 3 mM, 和光純薬) を添加し、0~24 時間後に細胞を回収した。リン酸緩衝液 (PBS, pH 6.0) で洗浄後、細胞から RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて mRNA を回収し、cDNA マイクロアレイ解析と定量的 PCR 解析に供した。

cDNA マイクロアレイ解析は、cDNA 合成に GeneChip® Expression 3'-Amplification Reagents Two-cycle cDNA Synthesis kit (Affymetrix) を使用した。得られた cDNA の精製は GeneChip® Human Genome Focus Array (Affymetrix) を用いて行い、in vitro transcription で cRNA の合成し、GeneChip® IVT labeling kit でビオチン標識した。ビオチン化された cRNA を GeneChip® Human Focus Array (Affymetrix) にハイブリダイズさせ、ストレプトアビジン標識フィコエリスリン (Molecular Probes) で染色した。染色したアレイは Gene Array Scanner (Agilent Technologies) を使用して 2 回スキャンし、遺伝子発現量の変化を検討した。

定量的 PCR は cDNA の合成を PrimeScript RT Reagent kit (Takara Bio) で行った。得られた cDNA は特異プライマーと SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio) が含まれた反応溶液とともに、Smart Cycler II システム (Cepheid) を用いて遺伝子発現量を半定量的に解析した。

免疫染色はカバーガラス上で培養した細胞を使用した。TBS で洗浄後、1 次抗体として抗 VEGF-A 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) または抗 VEGF-C 抗体 (Zymed) と反応させた。TBS で再度洗浄後、2 次抗体として Envision/horseradish peroxidase universal kit (Dako) の西洋ワサビペルオキシダーゼ標識デキストラン結合抗ウサギ IgG 抗体と反応させ、免疫複合体の可視化を 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride で行った。

Western blot にはタンパク量で 80 µg の細胞溶解液を使用した。10%のポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。PVDF 膜を blocking reagent (東洋紡) で処理後、1 次抗体の抗 VEGF-A 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) または抗 VEGF-C 抗体 (Cell Signaling Technology) と反応させた。次いで、2 次抗体の西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) と反応させ、洗浄後、免疫複合体を ECL plus detection system (GE Healthcare Biosciences) を使用して、Kodak Biomax フィルム (GE Healthcare Biosciences) 上で検出した。

SB が口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3 のリンパ管増殖因子および MMP 阻害因子の TIMP2 および TIMP3 の転写・翻訳に及ぼす影響を検討し、以下の結果・結論を得た。

1. cDNA マイクロアレイ解析によってリンパ管新生因子および TIMP2 と TIMP3 について遺伝子発現の変化が確認できた。
2. 定量的 PCR 法によってリンパ管増殖因子の PDGF, ANGPT2, VEGF-C, VEGF-D の発現減少が認められたが, TIMP2 および TIMP3 については発現が増加した。
3. Western blot および免疫染色法では, VEGF-C の発現低下が認められた。

以上の結果から, 腫瘍細胞における SB の投与は腫瘍細胞の浸潤と血管およびリンパ管の新生を抑制すると考えられ, SB による癌治療の有効性が示唆された。