

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

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

山村 崇之

(指導：小宮山 一雄 教授，松本 直行 助教)

概 要

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 μ g 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。

なお, 本論文は原著論文 Yamamura T et al., Sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor, regulates lymphangiogenic factors in oral cancer cell line HSC-3, *Anticancer Res* 2014; 34; 1701-1708 を基幹論文とし, これに matrix metalloproteinase の阻害因子である TIMP2 および TIMP3 の成績を新たな実験データとして加えることによって総括したものである。

緒 言

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。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、転移病巣成立の初期では、腫瘍細胞による間質の破壊とともに腫瘍周囲の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するが、逆に MMP はオートクラインに MMP 阻害因子の tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) 2 および TIMP3 の発現を誘導することによって自らの活性を抑制する。また、癌細胞における MMP の強い発現は所属リンパ節転移を促進し、逆に TIMP の発現は癌の再発や転移を抑制する^{1,2)}。一方、癌細胞は 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) を分泌して血管およびリンパ管新生を誘導し、固有間質を形成することが知られている³⁾。癌細胞による VEGF-C の発現は腫瘍の遠隔臓器転移や所属リンパ節転移にも関係があることが示されている^{4,5)}。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が癌細胞の遺伝子発現に影響を及ぼすことが明らかにされている。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抑制効果を示すため、新たな癌治療薬として注目を集めている⁶⁻⁸⁾。

このうち HDACI の 1 つである酪酸ナトリウム (SB) は口腔癌細胞の細胞周期の停止と細胞の分化やアポトーシスを促進することが知られている⁹⁻¹¹⁾。また、SB は赤白血病、胎児性癌、大腸癌、膵臓癌、神経芽細胞腫、グリオブラストーマや造血器系の悪性腫瘍においても、細胞の増殖抑制と、細胞の分化およびアポトーシスを促進することが報告されている¹²⁾。

そこで著者は、口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3 における SB のエピジェネティックな効果を明らかにするために、SB のリンパ管新生因子と TIMP ファミリーの転写・翻訳に与える影響について、*in vitro* 実験系を用いて検討した。

材料および方法

1. 細胞培養

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，37°C，5% CO₂ 条件下で培養した。培養液中に 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。

2. RNA 抽出

リン酸緩衝液 (PBS, pH 6.0) で洗浄した細胞から RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて mRNA を回収し，分光光度計により濃度を測定した後，cDNA マイクロアレイ解析と定量的 PCR 解析に供した。

3. cDNA マイクロアレイ解析

遺伝子発現の網羅的な解析を行うため，GeneChip[®] Human Genome Focus Array (Affymetrix) を用いた。RNA から cDNA 合成は GeneChip[®] Expression 3'-Amplification Reagents Two-cycle cDNA Synthesis kit (Affymetrix) を用いた。また，cDNA の精製は GeneChip[®] Human Genome Focus Array (Affymetrix) を用い，*in vitro* transcription で cRNA の合成し，GeneChip[®] IVT labeling kit でビオチン標識した。ビオチン化した 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。Gene Array Scanner (Agilent Technologies) を使用して染色後のアレイを2回スキャンし、遺伝子発現量を検討した。その結果、染色強度が2倍以上ないし1/2以下となったものを発現量の変化があった遺伝子とした。

4. 定量的 PCR

得られた mRNA を鋳型にして逆転写反応を PrimeScript RT Reagent kit (Takara Bio) を用いて行い cDNA を作成した。次いで特異プライマーと SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio) を含む反応溶液を調整し、Smart Cycler II システム (Cepheid) を使用して定量的 PCR を行った。各遺伝子の検出に用いたプライマー配列を第1表に示す。

5. 免疫染色

カバーガラス上の細胞に SB を添加して 0～24 時間培養した。TBS で洗浄後、1 次抗体の抗 VEGF-A 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) または抗 VEGF-C 抗体 (Zymed) と室温で 1 時間反応させた。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 (Sigma Aldrich)で行った。

6. Western blot

細胞溶解液 [50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1/100 protease inhibitor cocktail] で細胞を処理し，Western blot に供した。細胞溶解液のタンパク量を測定した後，80 μg を 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) で処理した後，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，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) 上に検出した。

7. 統計処理

得られた測定値について，それぞれの中央値および標準偏差を求め，Kruskal-Wallis H-test を用い，有意水準 0.05 の条件で統計学的分析を行った。

結 果

1. 遺伝子発現の網羅的解析

SB が HSC-3 細胞の遺伝子発現に及ぼす影響を検討するために、0, 1, 3 mM の SB を添加した培養液で細胞を 6 および 12 時間培養した。cDNA マイクロアレイ解析の結果、SB 添加によって発現量の減少した遺伝子は 1,925 種、発現量の増加した遺伝子は 4,381 種であった。これらのうちリンパ管新生因子に注目すると PDGFB, VEGF-A, VEGF-B および VEGF-C の遺伝子発現は減少したが、MMP 阻害因子の TIMP2 および TIMP3 は遺伝子発現の上昇が認められた (第 2 表)。

2. リンパ管新生因子および TIMP 遺伝子の発現

cDNA マイクロアレイで得られた遺伝子発現の変化を定量的 PCR で検証した。リンパ管新生因子のうち、ANGPT2 の発現は SB 添加の 3 時間後から濃度依存性に減少した (第 1 図)。さらに PDGFB は 0.5 時間後から減少したが、有意差は認められなかった。VEGF-A と VEGF-C は SB 添加後 1 時間後まで発現量に変化を認めなかった。VEGF-A は 3 時間後に軽度の発現量の増加を認めたが、有意差は認められなかった。一方、VEGF-C は SB 添加後 3 時間で有意に発現量が減少

した。VEGF-D は SB 添加後 0.5～3 時間後で有意に発現量が減少した。このようなリンパ管新生因子の発現とは反対に TIMP2 および TIMP3 は SB 添加 3 時間後に有意な発現量の増加を示し、また cyclooxygenase 2 (COX2) は 0.5～3 時間後に発現量が増加した。

3. Western blot

Western blot で VEGF-A および VEGF-C タンパクの発現量を検討した。VEGF-A は SB 未添加の HSC-3 では発現は検出されなかったが、3 mM の SB を添加し、24 時間培養を行うことで、VEGF-A の発現を認めた。一方、VEGF-C は SB 未添加で発現が確認できたが、SB 添加によって減少した (第 2 図)。これらの結果は定量的 PCR のデータを裏付けるものとなった。

4. 免疫染色

免疫染色によって VEGF-A および VEGF-C 発現を検索した (第 3 図)。VEGF-A は 3 mM の SB 添加をした群で、細胞質に細顆粒状に弱陽性となった。一方、VEGF-C は未添加群で強陽性であったが、3 mM の SB を添加した群では発現が減少した (第 3 図, 第 3 表)。

考 察

今回の cDNA マイクロアレイ解析によって、SB は口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3 におけるリンパ管新生因子である ANGPT2, PDGFB, VEGF-C, VEGF-D の発現を抑制するとともに、MMP 阻害因子の TIMP2 と TIMP3 の発現を促進することが明らかになった (第 2 表)。腫瘍細胞が血管内浸潤・遠隔臓器転移をする過程では、腫瘍細胞自身が MMP を分泌し、血管やリンパ管の基底膜を分解し、脈管侵襲を誘導することが知られており、現在までに様々な腫瘍において MMP の過剰発現と予後との関連が報告されている¹³⁻¹⁸⁾。その一方で、MMP は生体内に内在する TIMP ファミリーによって、その活性が阻害される。実際にリコンビナント TIMP2 をマウスへ注射することにより、悪性黒色腫細胞株である B16 細胞の肺転移を抑制することが報告されている¹⁹⁻²⁰⁾。また TIMP3 遺伝子を組込んだアデノウイルスベクターを子宮頸癌細胞株の HeLa 細胞や骨肉腫細胞株の HT1080 細胞へ導入することで、これらの細胞の浸潤能低下とアポトーシスが誘導される^{21, 22)}。

免疫組織学的な検討から、腫瘍における VEGF-C の発現は腫瘍周囲のリンパ管密度や口腔扁平上皮癌のリンパ節転移と相関するために、予後予測因子とし

での実用性が期待されている^{4,23)}。また、様々な種類の腫瘍において、VEGF-Cの発現上昇は予後の増悪とリンパ節転移に関与することが報告されていることから、VEGF-Cはリンパ管新生の主たる役割を担っていると考えられる²⁴⁻³²⁾。例えば、VEGF-Cを発現しない乳癌細胞株 MCF-7 へ VEGF-C 遺伝子を組込んだ発現ベクターを導入することで、腫瘍の発育促進、リンパ管増生およびリンパ節転移が促進することが報告されている²⁵⁾。また、VEGF-C や VEGF-D はリンパ管内皮細胞に発現する vascular endothelial cell growth factor receptor 3 (VEGFR3) と結合し、リンパ管新生を促進する³⁴⁾。In vitro の実験系で VEGF-D は、VEGF ファミリーの中で最も血管とリンパ管新生を促進する能力が高いとされている³⁵⁾。今回の結果から、SB 添加は VEGF-C と VEGF-D の発現を低下させることが明らかになった。つまり SB 添加は腫瘍細胞の VEGF-C と VEGF-D の発現を低下させることで、リンパ管新生を抑制することが示唆された。

VEGF-A もリンパ管新生を促進すると考えられている。例えば、VEGF-A 遺伝子を組込んだアデノウイルスベクターをマウスの耳に注射すると拡張したリンパ管が形成される³⁷⁾。胚様体へ VEGF-A を添加すると既存の血管からのリンパ管分岐が促進される³⁸⁾。一方、VEGF-A を含浸させたインプラントの角膜へ

の移植や、VEGF-A を発現するアデノウイルスベクターの筋肉内注射は、リンパ管新生を示さない^{34, 39, 40)}。このように腫瘍細胞のリンパ管形成において、VEGF-A の相反的な報告が多数あることから、VEGF-A のリンパ管新生に及ぼす真の機能については不明な点が多い。

VEGF ファミリーの発現をコントロールしている転写因子の1つとして hypoxia inducible factor (HIF) -1 が知られている^{41,42)}。HIF は HIF-1 α と HIF-1 β のヘテロダイマーから成り、VEGF 遺伝子上流にある HIF-regulated element に結合しその転写活性を制御している^{39,41,43)}。一方、SB は HIF prolyl-hydroxylase を活性化させ HIF-1 α を分解し、VEGF の発現を抑制することから⁴⁴⁾、SB 添加によって HSC-3 に認められた VEGF-C と VEGF-D の発現減少は HIF を介したシグナル伝達系による可能性が強く示唆される。また、Miki ら¹¹⁾ は HSC-3 の培養液に SB を添加すると、COX2 の発現が促進することを報告している。この現象は培養液中の prostaglandin (PG) E₂ 濃度の上昇に起因し、PGE₂ がオートクライン機構により COX2 の発現を誘導するためと考察している¹¹⁾。PGE₂ 濃度の上昇は、PG 受容体である prostaglandin E receptor (EP) 1 と EP4 も活性化させ、その下流にある epidermal growth factor receptor HER-2/neu のチロシン残基リン酸化を引き起こ

す。HER-2/neu からのシグナルは mitogen-activated protein kinase p38 と nuclear factor- κ B を介して VEGF ファミリーの発現を増加させる^{45,46)}。しかしながら、本研究では SB 添加によって VEGF-C と VEGF-D の顕著な発現低下が認められたことから、SB による VEGF ファミリーの発現減少と COX2 の発現促進は PG 受容体とは全く別の経路で制御されている可能性が考えられる。

結 論

SB が口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3 のリンパ管新生因子および MMP 阻害因子の TIMP2 と 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新生因子の 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。

謝 辞

稿を終えるに当たり、懇切なる御指導と御高閲を賜りました本学病理学講座
小宮山一雄教授，研究を直接御指導いただいた松本直行助教に謹んで感謝の意
を表します。また，本研究に対して御協力いただいた病理学講座員各位に深く
感謝申し上げます。

本研究の一部は第 66 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会（平成 24 年 5 月 17
日）において発表した。

参考文献

1. Yorioka CW, Coletta RD, Alves F, Nishimoto IN, Kowalski LP, Graner E (2002) Matrix metalloproteinase-2 and -9 activities correlate with the disease-free survival of oral squamous cell carcinoma patients. *Int J Oncol* 20, 189-194.
2. Tsai CH, Hsieh YS, Yang SF, Chou MY, Chang YC (2003) Matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 expression in human oral squamous cell carcinoma and the effect of protein kinase C inhibitors: preliminary observations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 95, 710-716.
3. Cao Y, Liu Q (2007) Therapeutic targets of multiple angiogenic factors for the treatment of cancer and metastasis. *Adv Cancer Res* 97, 203-224.
4. Hirota K, Wakisaka N, Sawada-Kitamura S, Kondo S, Endo K, Tsuji A, Muroso S, Yoshizaki T (2012) Lymphangiogenesis in regional lymph nodes predicts nodal recurrence in pathological N0 squamous cell carcinoma of the tongue. *Histopathology* 61, 1065-1071.
5. Cao Y, Zhong W (2007) Tumor-derived lymphangiogenic factors and lymphatic

- metastasis. *Biomed Pharmacother* 61, 534-539.
6. Gallinari P, Di Marco S, Jones P, Pallaoro M, Steinkühler C (2007) HDACs, histone deacetylation and gene transcription: From molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Res* 17, 195-211.
 7. Rosato RR, Grant S (2003) Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 2: 30-37.
 8. Zhang XD, Gillespie SK, Borrow JM, Hersey P (2003) The histone deacetylase inhibitor suberic bishydroxamate: a potential sensitizer of melanoma to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* 66, 1537-1545.
 9. Jeng JH, Kuo MY, Lee PH, Wang YJ, Lee MY, Lee JJ, Lin BR, Tai TF, Chang MC (2006) Toxic and metabolic effect of sodium butyrate on SAS tongue cancer cells: role of cell cycle deregulation and redox changes. *Toxicology* 223, 235-247.
 10. Kuroda J, Urade M, Kishimoto H, Noguchi K, Hashitani S, Sakurai K, Nishimura N, Hashimoto-Tamaoki T (2005) Promotion of cell differentiation, and suppression of cell growth and cyclooxygenase-2 expression by differentiation-inducing agents

in human oral squamous carcinoma SCC25 cells. *Int J Oncol* 26, 361-367.

11. Miki Y, Mukae S, Murakami M, Ishikawa Y, Ishii T, Ohki H, Matsumoto M, Komiyama K (2007) Butyrate inhibits oral cancer cell proliferation and regulates expression of secretory phospholipase A2-X and COX2. *Anticancer Res* 27, 1493-1502.
12. Newmark HL, Lupton JR, Young CW (1994) Butyrate as a differentiating agent: pharmacokinetics, analogues and current status. *Cancer Lett* 78, 1-5.
13. Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ (2004) The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 1705, 69-89.
14. Wagenaar-Miller RA, Gorden L, Matrisian LM (2004) Matrix metalloproteinases in colorectal cancer: is it worth talking about? *Cancer Metastasis Rev* 23, 119–135.
15. Garcea G, Neal CP, Pattenden CJ, Steward WP, Berry DP (2005) Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: A systematic review. *Eur J Cancer* 41, 2213-2236.
16. Turpeenniemi-Hujanen T (2005) Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. *Biochimie* 87, 287-297.

17. Zucker S, Vacirca J (2004) Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 23, 101-117.
18. Tien YW, Lee PH, Hu RH, Hsu SM, Chang KJ (2003) The role of gelatinase in hepatic metastasis of colorectal cancer. *Clinical Cancer Research* 9, 4891–4896.
19. Schultz RM, Silberman S, Persky B, Bajkowski AS, Carmichael DF (1988) Inhibition by human recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases of human amnion invasion and lung colonization by murine B16-F10 melanoma cells. *Cancer Res* 48, 5539-5545.
20. Alvarez OA, Carmichael DF, DeClerck YA (1990) Inhibition of collagenolytic activity and metastasis of tumor cells by a recombinant human tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Natl Cancer Inst* 82, 589-595.
21. Ahonen M, Baker AH, Kähäri VM (1998) Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer Res* 58, 2310-2315.
22. Brand K, Baker AH, Perez-Cantó A, Possling A, Sacharjat M, Geheeb M, Arnold W (2000) Treatment of colorectal liver metastases by adenoviral transfer of tissue

inhibitor of metalloproteinases-2 into the liver tissue. *Cancer Res*, 60, 5723-5730.

23. Sugiura T, Inoue Y, Matsuki R, Ishii K, Takahashi M, Abe M and Shirasuna K (2009) VEGFC and VEGFD expression is correlated with lymphatic vessel density and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: Implications for use as a prognostic marker. *Int J Oncol* 34, 673-680.
24. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Yang Q, Tsukiyama A, Imabun S, Nakahara M, Nakao K, Nakamura M, Mori I, Kakudo K (2003) Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor-C in breast carcinoma with long-term follow-up. *Mod Pathol* 16, 309-314.
25. Fujimoto J, Toyoki H, Sato E, Sakaguchi H, Tamaya T (2004) Clinical implication of expression of vascular endothelial growth factor-C in metastatic lymph nodes of uterine cervical cancers. *Br J Cancer* 91, 466-469.
26. Onogawa S, Kitadai Y, Tanaka S, Kuwai T, Kimura S, Chayama K (2004) Expression of VEGFC and VEGFD at the invasive edge correlates with lymph node metastasis and prognosis of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Sci* 95, 32-39.

27. Kimura Y, Watanabe M, Ohga T, Saeki H, Kakeji Y, Baba H, Maehara Y (2003) Vascular endothelial growth factor C expression correlates with lymphatic involvement and poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 10, 1747-1751.
28. Duff SE1, Li C, Jeziorska M, Kumar S, Saunders MP, Sherlock D, O'Dwyer ST, Jayson GC (2003) Vascular endothelial growth factors C and D and lymphangiogenesis in gastrointestinal tract malignancy. *Br J Cancer* 89, 426-430.
29. O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles SA (2001) Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Cancer* 92, 556-568.
30. Nakashima T, Kondoh S, Kitoh H, Ozawa H, Okita S, Harada T, Shiraishi K, Ryozaawa S Okita K (2003) Vascular endothelial growth factor-C expression in human gallbladder cancer and its relationship to lymph node metastasis. *Int J Mol Med* 11, 33-39.
31. Tamura M, Ohta Y (2003) Serum vascular endothelial growth factor-C level in patients with primary non-small cell lung carcinoma: a possible diagnostic tool for

- lymph node metastasis. *Cancer* 98, 1217-1222.
32. Duff SE2, Li C, Renehan A, O'Dwyer ST, Kumar S (2003) Immunodetection and molecular forms of plasma vascular endothelial growth factor-C. *Int J Oncol* 22, 339-343.
 33. Mattila MM, Ruohola JK, Karpanen T, Jackson DG, Alitalo K and Härkönen PL (2002) VEGFC induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-7 tumors. *Int J Cancer* 98, 946-951.
 34. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Mäkinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA (1998) Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (FLK1) and VEGF receptor 3 (FLT4). *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 548-553.
 35. Rissanen TT, Markkanen JE, Gruchala M, Heikura T, Puranen A, Kettunen MI, Kholov. I, Kauppinen RA, Achen MG, Stacker SA, Alitalo K, Yl.-Herttuala S (2003) VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ Res* 92, 1098-1106.
 36. Folkman J (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?

Natl Cancer Inst 82, 4-6.

37. Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, Lawitts JA, Benjamin L, Tan X, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF (2002) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med* 196, 1497-1506.
38. Liersch R, Nay F, Lu L, Detmar M (2006) Induction of lymphatic endothelial cell differentiation in embryoid bodies. *Blood* 107, 1214-1216.
39. Cao R, Eriksson A, Kubo H, Alitalo K, Cao Y, Thyberg J (2004) Comparative evaluation of FGF2-, VEGFA-, and VEGFC-induced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permeability. *Circ Res* 94, 664-670.
40. Kubo H, Cao R, Brakenhielm E, Makinen T, Cao Y and Alitalo K (2002) Blockade of vascular endothelial growth factor receptor-3 signaling inhibits fibroblast growth factor-2-induced lymphangiogenesis in mouse cornea. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 8868-8873.
41. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW (2002) Regulation and destabilization of HIF1 α by ARD1-mediated

acetylation. Cell 111, 709-720.

42. Kim MS, Kwon HJ, Lee YM, Baek JH, Jang JE, Lee SW, Moon EJ, Kim HS, Lee SK, Chung HY, Kim CW, Kim KW (2001) Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. Nat Med 7, 437-443.
43. Mie Lee Y, Kim SH, Kim HS, Jin Son M, Nakajima H, Jeong Kwon H, Kim KW (2003) Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by FK228, a specific histone deacetylase inhibitor, via suppression of HIF1 α activity. Biochem Biophys Res Commun 300, 241-246.
44. Kong X, Lin Z, Liang D, Fath D, Sang N, Caro J (2006) Histone deacetylase inhibitors induce VHL and ubiquitin-independent proteasomal degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . Mol Cell Biol 26, 2019-2028.
45. Luttun A, Brusselmans K, Fukao H, Tjwa M, Ueshima S, Herbert JM, Matsuo O, Collen D, Carmeliet P, Moons L (2002) Loss of placental growth factor protects mice against vascular permeability in pathological conditions. Biochem Biophys Res Commun 295, 428-434.

46. Su JL, Shih JY, Yen ML, Jeng YM, Chang CC, Hsieh CY, Wei LH, Yang PC, Kuo ML (2004) Cyclooxygenase-2 induces EP1- and HER-2/Neu-dependent vascular endothelial growth factor-C upregulation: a novel mechanism of lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 64, 554-564.

第1表 定量的PCRに用いたプライマーおよびその塩基配列

プライマーの塩基配列	
ANGPT2	5'-TTAACGGACCAAAGCAAGACCCTA-3' 5'-GACAGCAGCGTCTGTAAACTGTCA-3'
PDGFB	5'-GTGGCTGGAGTGGCCAAATAG-3' 5'-ATGGAGGTCATGTGGACAGCA-3'
VEGF-A	5'-GAGCCTTGCCTTGCTGCTCTAC-3' 5'-CACCAGGGTCTCGATTGGATG-3'
VEGF-C	5'-CAGCACGAGCTACCTCAGCAAG-3' 5'-TTTAGACATGCATCGGCAGGAA-3'
VEGF-D	5'-GCTGCTTTGCCAAGTTGCTG-3' 5'-TGGATTCACTGTGGTGCTGTGTAA-3'
TIMP2	5'-GTTGGAGGAAAGAAGGAA-3' 5'-CCAGGGCACAATAAAGTC-3'
TIMP3	5'-TTCTCAGCGAGGATGGCACTT10- ¹⁰ -3' 5'-AAACACGGTTCAGGATGCTGG-3'
GAPDH	5'-GAGTCAACGATTTGGTCGT-3' 5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-
COX2	5'-CGGTGAGATATGCGACAGATGG-3' 5'-TGGCGGACATGGCTACTCAA-3'

Angiopoietin-2 (ANGPT2), platelet-derived endothelial growth factor (PDGF) vascular endothelial growth factor (VEGF-A, -B, -C and -D), tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP2 and 3), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and cyclooxygenase2 (COX2).

第2表 cDNAマイクロアレイ解析によるリンパ管新生因子およびMMP阻害因子の発現量の変化

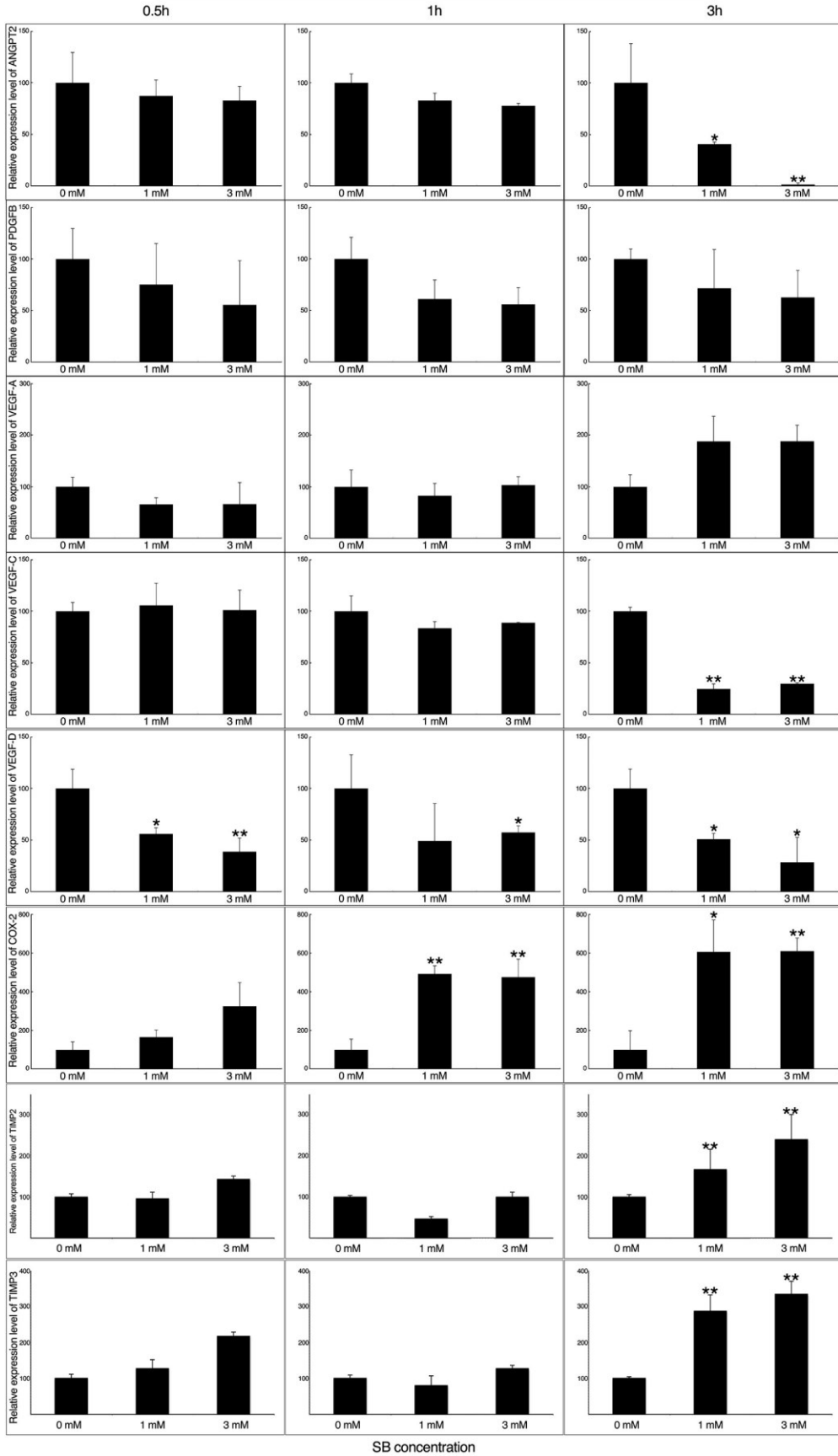
遺伝子	SB			
	1 mM, 6 h	3 mM, 6 h	1 mM, 12 h	3 mM, 12h
ANGPT2	np	0.5	0.4	0.1
PDGFB	np	np	np	0.5
VEGF-A	np	np	np	np
VEGF-B	np	np	np	np
VEGF-C	0.3	0.2	0.1	0.09
VEGF-D	0.3	0.2	0.2	0.1
TIMP2	3.1	3.5	3.7	5.1
TIMP3	8	11.4	4.4	5.5
COX2	3.5	5.1	4.4	5.6

np: No particular change in transcriptional level (less than two-fold change).

第3表 SB添加がHSC-3細胞のVEGF-AおよびVEGF-Cのタンパク発現に及ぼす影響

	SB		
	0 mM	1 mM	3 mM
VEGF-A	0	1+	1+
VEGF-C	3+	2+	1+

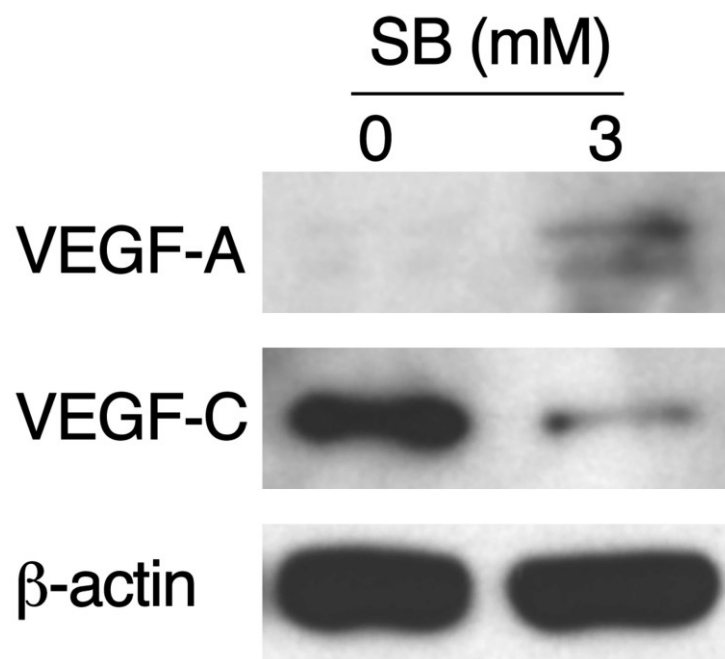
Duration of sodium butyrate incubation



第1図 SB添加がリンパ管新生因子とTIMP遺伝子発現に与える影響

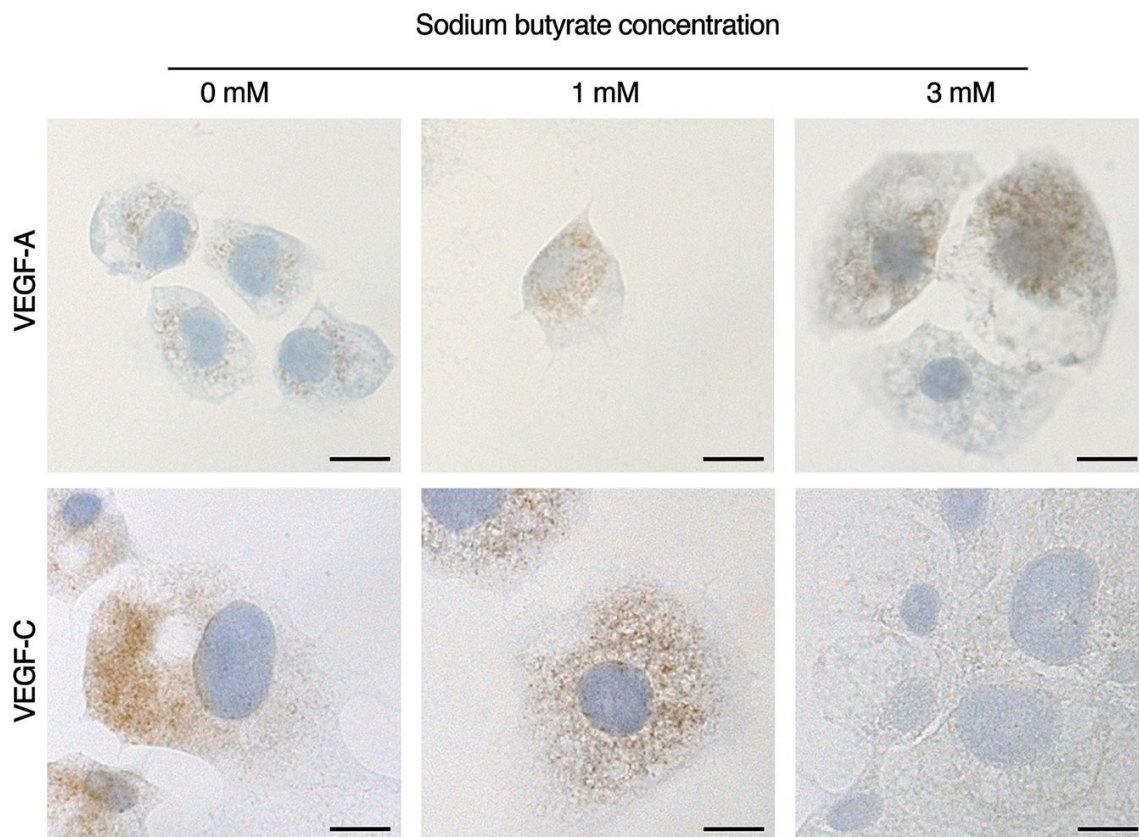
培養液にSBを添加した0.5～1時間後、定量的PCRによりリンパ管新生因子とTIMP遺伝子発現の変化を検討した。

*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$



第2図 VEGF-A, VEGF-Cおよび β -actinのタンパク発現量の検討

Western blotにより、リンパ管新生因子のタンパク発現量を検討した。SB添加後3時間でVEGF-Aの発現上昇と、VEGF-Cの発現低下が確認された。



第3図 VEGF-AおよびVEGF-Cのタンパク発現量の検討

免疫染色により，リンパ管新生因子のタンパク発現量を検討した。SB添加後3時間でVEGF-Aの発現上昇と，VEGF-Cの発現低下が確認された。