

学 位 研 究 紹 介

ヒト口腔扁平上皮がん細胞株における血管内皮増殖因子 -C および -A の発現レベルは、ヌードマウスの口腔へがん細胞を移植した時のリンパ節転移および血管新生とそれぞれ関連する

Expression level of vascular endothelial growth Factor -C and -A in cultured human oral squamous cell carcinoma correlates with, respectively, lymphatic metastasis and angiogenesis when transplanted into nude mouse oral cavity

新潟大学大学院医歯学総合研究科

組織再建口腔外科学分野

中里 隆之

Division of Reconstructive Surgery for Oral and Maxillofacial Region, Niigata University Graduate School of Medical and

Dental Sciences

Takayuki Nakazato

【結 語】

がんの増殖・浸潤・転移には微小血管やリンパ管の増生が不可欠とされている。近年、血管やリンパ管に対する種々の増殖因子が同定され、中でも Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs: VEGF-A, -B, -C, -D) はその中心的役割を担っていることが解明されつつある。VEGF-A は強力な血管新生因子の一つであり、その発現が予後因子として有用であるとの報告がみられる。また近年、リンパ管新生因子である VEGF-C の発現とリンパ節転移との相関を認めるとする報告もみられる。しかしながら、口腔扁平上皮がんにおける VEGFs の発現についてはいまだ不明な点が多い。そこでわれわれは口腔扁平上皮がん細胞株および正常口腔扁平上皮細胞における VEGFs mRNA の発現をリアルタイム定量 RT-PCR 法を用いて定量し、さらにそのがん細胞をヌードマウスの舌へ移植してリンパ節転移、遠隔転移（肺転移）および腫瘍内微小血管密度（MVD）との関連性について検討した。

【材料と方法】

実験には口腔扁平上皮がん細胞株 HSC-2, HSC-3, HSC-4, OSC-19 および正常口腔扁平上皮細胞を用いた。各細胞とも 70～100% の細胞密度に到達した時点で total RNA を抽出し、ランダムプライマーと逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。VEGFs mRNA の発現は、リアルタイム定量 RT-PCR 法により定量した。さらに、これら 4 種類の口腔扁平上皮がん細胞をヌードマウスの舌へ移植し、移植後 21 日目に舌、頸部リンパ節、肺を摘出した。リンパ節転移、遠隔転移（肺転移）および MVD について検索を行い、VEGFs mRNA の発現との関連について統計学的に検討した。

【結 果】

(1) 口腔扁平上皮がん細胞株および正常口腔扁平上皮細胞における VEGFs mRNA の発現

検討したすべての口腔扁平上皮がん細胞株ならびに正常口腔扁平上皮細胞において VEGFs mRNA の発現が確認できた（図 1）。HSC-2 および OSC-19 における VEGF-A, VEGF-C の発現量は VEGF-B, VEGF-D の発現量に比べて有意に高く ($p = 0.000$)、また HSC-2 および OSC-19 における VEGF-A, VEGF-C の発現量は HSC-3 および HSC-4 と比べて高かった（表 1, 2）。各細胞とも VEGFs の発現量は、VEGF-C > VEGF-A > VEGF-B > VEGF-D の順であった。

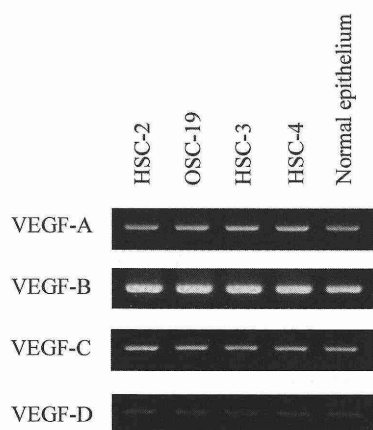


図 1 口腔扁平上皮がん細胞株における VEGF-family (VEGF-A, -B, -C, -D) mRNA の発現. Lane.1: HSC-2, Lane.2: HSC-3, Lane.3: HSC-4, Lane.4: OSC-19, Lane.5: Normal epithelium.

表1 The Expression of VEGFs at mRNA levels in OSCC cell lines

OSCC cell lines		VEGF-A	VEGF-B	VEGF-C	VEGF-D
HSC- 2 (N = 7)	Mean	15276.074	3027.153	18216.515	2.251
	SD	3061.183	892.403	4010.157	2.528
HSC- 3 (N = 7)	Mean	6809.566	3240.827	8972.123	16.112
	SD	3744.434	1050.986	3802.098	9.287
HSC- 4 (N = 6)	Mean	8125.705	3835.441	11093.447	21.857
	SD	2753.539	2210.947	12701.276	10.921
OSC-19 (N = 6)	Mean	11956.277	5837.171	20461.623	11.959
	SD	5718.487	3235.023	2823.833	9.719
normal (N = 6)	Mean	5340.380	273.056	5827.416	4.388
	SD	2752.635	153.912	7046.738	5.233

表2 Two-way Analysis of Variance

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F value	P value
VEGF	3272102450.9	3	1090700817.0	75.854	0.000
VEGF × OSCC cell lines	664974231.3	12	55414519.3	3.854	0.000
Random error (VEGF)	1164694860.9	81	14378948.9		

(2) VEGFs mRNA の発現と MVD, リンパ節転移, 遠隔転移との関連

HSC- 2 および OSC-19 における MVD は, HSC- 3 と HSC- 4 に比べて有意に高かった ($p = 0.000$) (図 2, 表 3)。さらにリンパ節転移の発現率についても, HSC- 2 と OSC-19 は HSC- 3 と HSC- 4 より高く, 有意差がみられた ($p = 0.007$)。肺転移は今回検索したすべてのマウスに見られなかった。

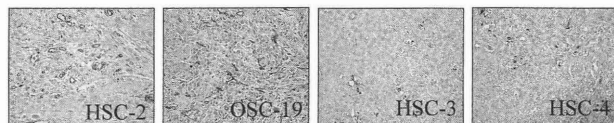


図2 CD34 免疫組織化学的染色 ($\times 200$)。腫瘍内微小血管密度 (MVD) は, 光学顕微鏡 $\times 200$ の視野における CD34 抗体に反応した血管数を 3 視野について数え, その平均を求めることによって算定した。

【考 察】

本研究では, in vitro において VEGF-A および VEGF-C の発現が高値を示した細胞株において in vivo における MVD ならびにリンパ節転移が高い結果であった。VEGF-A は血管新生因子であること, VEGF-C はリンパ管新生因子でありリンパ節転移はリンパ管への腫瘍浸潤により引き起こされることを考えると, VEGF-A の発現が MVD の増加に影響し VEGF-C の発現がリンパ節転移に影響したものと考えられた。また in vitro と in vivo の結果に関連がみられたことから, 腫瘍組織における VEGF-A および VEGF-C の発現は腫瘍細胞の性格を反映するものと推察された。腫瘍組織における VEGF-A および VEGF-C の発現の検索は, リンパ節転移や予後を予測する有用な情報になりうると思われた。

表3 Clinicopathological factors in vivo

	MVD	L.N metastasis (%)	Pulmonary metastasis (%)
HSC-2	22.95 \pm 0.88	64.3	0
OSC-19	22.27 \pm 1.42	66.7	0
HSC-3	10.95 \pm 1.06	14.3	0
HSC-4	14.08 \pm 1.83	31.3	0