

ふりがな かねまる しょうへい
氏 名 金丸 祥平
学 位 博 士 (歯学)
学 位 記 番 号 新大院博 (歯) 第 139 号
学位授与の日付 平成20年3月24日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 ヒト口腔扁平上皮がん細胞株における VEGF-A、VEGF-C および VEGF 受容体の発現量に関する研究

論文審査委員 主査 教授 齊藤 力
副査 教授 朔 敬
教授 高木 律男

博士論文の要旨

【緒言】

血管内皮細胞増殖因子 VEGF は様々な腫瘍で発現が認められ、口腔がんにおいてもその浸潤、転移との関連性が指摘されている。VEGF ファミリーにはその選択的受容体として VEGF 受容体 (VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3) が現在まで報告されている。我々はヒト口腔扁平上皮がん細胞株 (HSC-2、HSC-3、HSC-4、OSC-19) において VEGF-A の発現と腫瘍内微小血管密度、VEGF-C の発現とリンパ節転移が関連し、さらに VEGF-A の発現量が多い腫瘍細胞株では VEGF-C の発現量も多いことを認めている。VEGF 受容体の発現量と VEGF-A、-C 発現量との関連性を示唆する報告も認められるが、口腔がんにおける検討はほとんどなく詳細は不明である。本研究では、口腔がんにおける VEGF-A、-C 発現量と VEGF 受容体の発現量との関係を明らかにすることを目的として以下の実験を行った。

【材料と方法】

ヒト口腔扁平上皮がん細胞株 (HSC-2、-3、-4、OSC-19) を同一条件で培養し、70~100% の細胞密度に到達した時点で、基本培地のみ control 群 (C 群)、ヒト recombinant VEGF-A を 20ng/ml の濃度で培地に添加した VA 群、ヒト recombinant VEGF-C を 20ng/ml の濃度で培地に添加した VC 群の 3 群に分け、12 時間培養後、Total RNA を抽出しリアルタイム RT-PCR 法で VEGF-A、-C mRNA の発現量を定量した。また VEGF 受容体 mRNA 発現の有無を RT-PCR 法により確認した。発現を認めた VEGF 受容体についてはリアルタイム RT-PCR 法で定量を行うとともに、免疫組織化学染色でタンパク発現を確認した。

【結果】

(1) VEGF-A、-C mRNA 発現量の変化

各細胞株間での VEGF-A、-C mRNA 発現量は HSC-2 と OSC-19 で高発現を認めた。VEGF-A、-C mRNA 発現量の平均値の比較では、HSC-2 において C 群と比較して VA 群、VC 群共に発現量が若干の増加を認めた。しかし、すべての細胞株において 3 群間で VEGF-A、-C mRNA 発現量に有意差は認めなかった。

(2) VEGF 受容体の発現

すべての口腔扁平上皮がん細胞株において VEGFR-1 mRNA の発現を認めたが、VEGFR-2 および VEGFR-3 mRNA の発現は認めなかった。各群における VEGFR-1 mRNA

発現量の平均値の比較では、HSC-2 で C 群と比較して VA 群、VC 群共に発現量が若干の増加を認めたが 3 群間で VEGF-A、-C mRNA 発現量に有意差は認めなかった。また全ての細胞株において免疫組織化学的染色でも VEGFR-1 タンパクの発現を認めた。

【考察】

本研究では C 群、VA 群、VC 群の間に VEGF-A、VEGF-C mRNA 発現量の有意な変化は認めず、C 群と比較して VA 群で VEGF-A mRNA 発現量が減少している細胞株や、VC 群で VEGF-C mRNA 発現量が減少している細胞株も認めた。乳がん、肺がんなどにおいては VEGF-A、VEGF-C が VEGF 受容体と結合することによりそれぞれの発現を増強させるとの報告が見られることから、VEGF 受容体の発現量が関与している可能性が考えられる。しかし、本研究では口腔扁平上皮がん細胞に発現する VEGFR-1 はごくわずかであり、VEGFR-2、VEGFR-3 にいたっては発現を認めなかったため、ヒト recombinant VEGF-A または VEGF-C を添加することによる VEGF-A と VEGF-C の相互作用を認めなかったのではないかと考えられた。このことから口腔扁平上皮がんの増大および転移様式は、VEGF-A、-C ががん周囲に存在する血管・リンパ管内皮細胞に発現する VEGF 受容体と反応することにより血管新生やリンパ管新生がおこる、いわゆるパラクラインによる作用が主体となっている可能性も考えられた。

審査結果の要旨

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、血管新生およびリンパ管新生にはさまざまな因子が関与するとされている。中でも VEGF ファミリーは血管およびリンパ管の新生を制御する因子として中心的な役割をするとされ、その選択的受容体として VEGF 受容体 (VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3) が現在まで報告されている。過去の研究でヒト口腔扁平上皮がん細胞株 (HSC-2、HSC-3、HSC-4、OSC-19) において VEGF-A の発現と腫瘍内微小血管密度、VEGF-C の発現とリンパ節転移が関連し、さらに VEGF-A の発現量が多いがん細胞株 (HSC-2、OSC-19) では VEGF-C の発現量も多い傾向にあることから、VEGF-A および VEGF-C は VEGF 受容体と結合しオートクラインにより、その発現量が増加するのではないかと推測した。このことを踏まえ口腔がんにおける VEGF-A、-C 発現量と VEGF 受容体の発現量との関係を明らかにすることを目的として行った。

細胞培地にヒト recombinant VEGF-A または VEGF-C を添加することで VEGF-A と VEGF-C 発現量の変化、VEGF 受容体の発現の有無および発現量を調べたが、全ての細胞株において、VEGF-A、VEGF-C を加えることによるそれぞれの発現量の変化は認められなかった。また、VEGF 受容体についても VEGFR-1 のみ発現を認めたが VEGFR-2、-3 は認められなかった。これらの結果から口腔がんにおける VEGF-A、-C 発現はオートクラインではなくパラクラインが主体となっている可能性も考えられた。

実験に用いた培養細胞株の性格、細胞培養条件、外部刺激を加える時期とその濃度および作用時間、用いた PCR 用プライマーの妥当性、in vivo における VEGF とその受容体の発現量、担当組織など解決すべき問題点はあるが、本研究で示された内容は、口腔扁平上皮がんにおける増殖や転移の予測因子として、さらには分子標的治療へ展開する一助となるものであることから、価値のあるものと認めた。