

平成 22 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791344
 研究課題名(和文) ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が口腔癌細胞株の腫瘍間質誘導に与える影響
 研究課題名(英文) Influence of histon deacetylase inhibitor in induction of tumor-associated stroma in oral cancer cell line.
 研究代表者
 松本 直行 (MATSUMOTO NAOYUKI)
 日本大学・歯学部・助教
 研究者番号：20791344

研究成果の概要(和文)：我々は、口腔癌細胞をヒストン脱アセチル化阻害剤の一つである酪酸ナトリウム(SB)で刺激し、口腔癌の間質誘導、特に血管ならびにリンパ管新生に関わる候補遺伝子の発現量を RNA とタンパク質レベルで検討した。血管・リンパ管誘導因子である angiopoietin-2、platelet derived growth factor beta、VEGF-C、VEGF-D の発現量低下が見られ、SB による口腔癌間質誘導の抑制が示唆された。興味深いことに、血管誘導因子の VEGF-A とこれの転写促進に与る COX-2 の発現レベル上昇が見られた。現在、さらにその詳細を検討中である。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of sodium butyrate (SB), one of histone deacetylase inhibitor on oral cancer cells. RNA and protein expression level of angiogenic and lymphangiogenic-factors are assessed. Expression level of angiopoietin-2, platelet derived growth factor beta, VEGF-C, VEGF-D are downregulated by SB stimulation. These findings indicating its potential use in anti-angiogenic and lymphangiogenic cancer therapy. Interestingly, angiogenic factor VEGF-A and transcription regulator COX-2 are upregulated. Now, we investigated detail of the mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：癌、リンパ管新生、血管新生、腫瘍間質誘導、DNA 転写調節、転移

1. 研究開始当初の背景

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は新たな抗腫瘍薬の候補として注目を浴びている。作用機序は腫瘍細胞のコアヒストンのアセチ

ル化促進に引き続くクロマチンコイル構造の解きほぐしの結果、細胞の生存、増殖、分化ならびにアポトーシスに関わる様々な遺伝子の活性化を引き起こし、抗腫瘍効果を発

揮すると考えられている。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が腫瘍細胞に与える直接的な影響は現在までに数例の報告があるものの、腫瘍間質に与える影響はほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が腫瘍間質誘導、特に血管・リンパ管新生の促進因子として働く VEGF family (VEGF-A, -C, -D)、angiopoietin 2、platelet derived growth factor の mRNA ならびにタンパク発現に与える影響を検討する。

3. 研究の方法

口腔扁平上皮癌細胞株 1×10^5 個を 35 mm dish に播種し、RPMI1640 培地中で 48 時間培養する。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の一つである酪酸ナトリウム (SB) を 0, 1, 3 mM の濃度で添加し、全 RNA を RNeasy Mini kit (QIAGEN 社) により抽出した。これを元に Affymetrix 社の GeneChip® Human Genome Focus Array を用いて、遺伝子発現量を網羅的に検索し、コントロール群 (SB: 0 mM) と比較検討することにより、遺伝子発現の変化を解析した。マイクロアレイの結果を元に、血管・リンパ管誘導因子である VEGF family (VEGF-A, -C, -D)、angiopoietin 2、platelet derived growth factor beta と、VEGF family の転写促進に与ると考えられている COX-2 を対象として、Syber green 法による定量的 PCR を行った。各サンプルから得られた全 RNA を PrimeScript RT Reagent Kit (Takara Bioscience 社) により逆転し、続いて SYBR Premix Ex Taq (Takara Bioscience 社) を用いて定量的 PCR を行った。また血管・リンパ管誘導の中心的役割を担う VEGF-A, -C のタンパク発現量を Western blotting により検証した。口腔癌細胞株を SB により刺激し、24 時間後に Cell lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH: 7.5), 150 mM NaCl, and 1% Triton X-100 supplemented with a 1/100 (v/v) protease inhibitor cocktail) により細胞を溶解させ、可溶分画を試料とした。通常に従い SDS-PAGE を行い、PVDF membrane にタンパクを転写させた。Membrane を PVDF membrane blocking reagent (東洋紡) で blocking し、続いて一次抗体を反応させた (VEGF-A: Santa Cruz 社, VEGF-C: Cell Signaling 社)。HRP 標識された 2 次抗体を反応させた後に、免疫複合体を ECL plus (GE Lifescience 社) により蛍光発光させ、BioMax film (Kodak 社) を感光させた。

さらに免疫細胞化学により、VEGF-A と VEGF-C タンパク産生量の変化を検討した。口腔癌細胞株を cover glass 上に播種し、SB で 24 時間刺激した後に、氷冷した 10% 中性

緩衝ホルマリンで 10 分間の固定を行った。スライドガラスを 0.01 mol/L citrate buffer (pH: 6.0) に浸漬し、98°C に加温し抗原賦活処理を行った後に、一次抗体 (VEGF-A: Santa Cruz 社, VEGF-C: Zymed 社) を反応させた。続いて Envision/HRP universal kit (Dako 社) を反応させ、免疫複合体を DAB により可視化した。

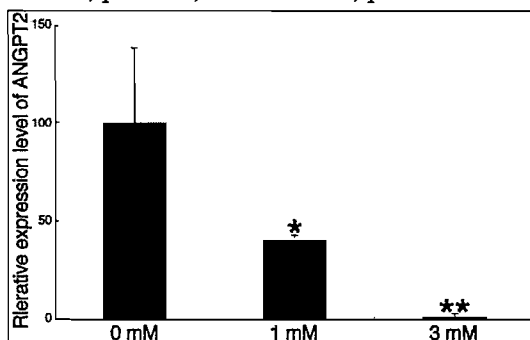
4. 研究成果

口腔癌細胞の培養液に SB を 0, 1, 3 mM の濃度で添加し、6, 12 時間培養後に全 RNA を抽出し、cDNA マイクロアレイを行った。コントロール群 (SB: 0 mM) と比較し、SB 添加群では 2 倍以上の発現量増加が見られた遺伝子は最大で 4669 種、0.5 倍以下の発現量低下が見られた遺伝子は最大で 1925 種であった。

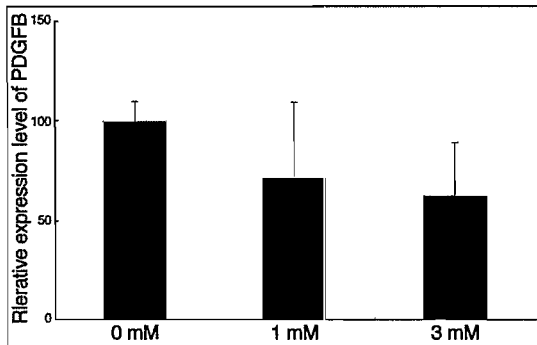
	SB			
	1 mM		3 mM	
	>2 fold	<0.5 fold	>2 fold	<0.5 fold
6 hrs	4381	1513	4584	1925
12 hrs	3727	1097	4669	2024

定量的 PCR により血管・リンパ管誘導因子の RNA 発現量の変化を検討した。

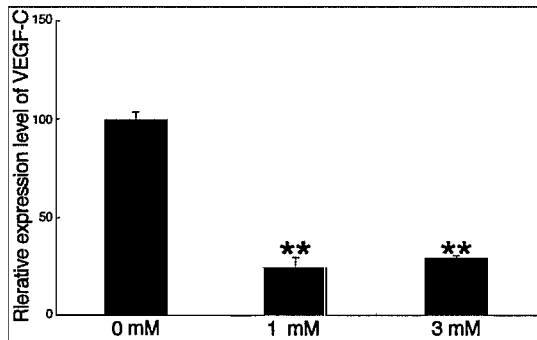
血管増殖因子である angiopoietin 2 mRNA 量は SB 刺激後 0.5, 1 時間後では有意な変化が見られなかったものの、3 時間後から濃度依存的に有意な減少が見られた (1 mM; 40.6%, $p < 0.05$, 3 mM; 1.5%, $p < 0.01$)。



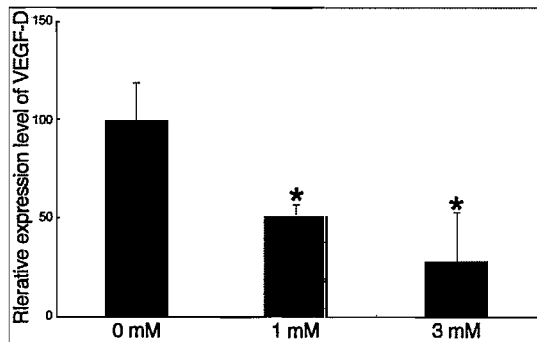
同じく血管増殖因子である platelet derived growth factor beta mRNA 量は、SB 刺激 0.5 時間後から濃度依存的に減少し (1 mM; 75.3%, 3 mM; 55.5%)、3 時間後まで mRNA 酸性の抑制が続いた (1 mM; 62.4%, 3 mM; 54.7%) が、統計学的有意差は見られなかった。



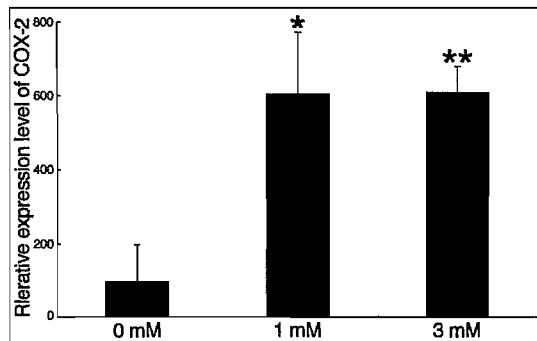
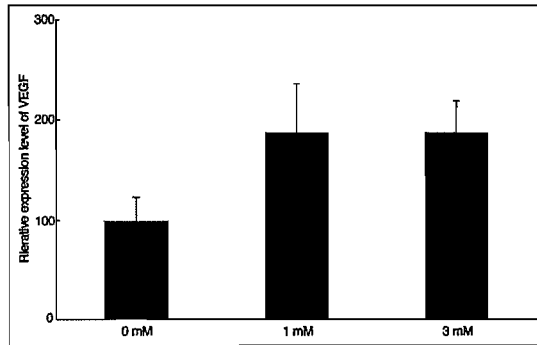
リンパ管増殖因子である VEGF-C の mRNA 発現量は、SB 刺激後 0.5, 1 時間後では有意な変化が見られなかったものの、3 時間後から濃度依存的に有意な減少が見られた(1 mM; 24.7%, 3 mM; 29.9%, $p < 0.01$, respectively)。



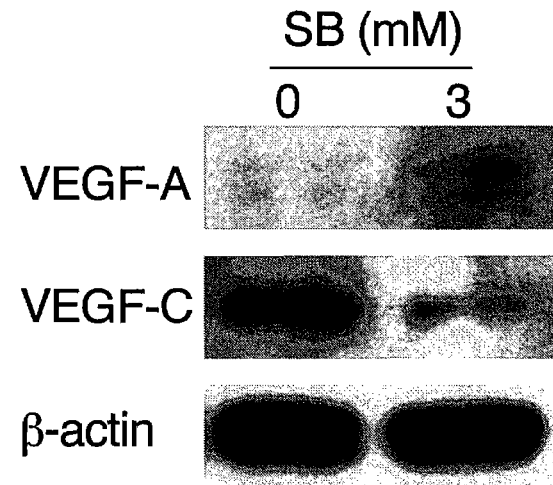
リンパ管誘導と知られ、近年では血管誘導にも与ると考えられている VEGF-D の mRNA 発現量は、SB 刺激後 0.5 時間で濃度依存的に急激な低下が見られ、3 時間後まで mRNA 転写抑制が続いた(1 mM; 50.9%, no significant difference, 3 mM; 28.5%, $p < 0.05$)。



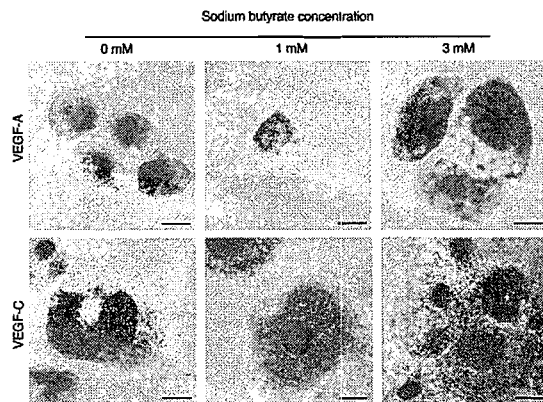
一方で、血管誘導因子の VEGF-A とこれの転写促進に与る COX-2 の mRNA 発現レベルは、SB 添加 3 時間後に上昇が見られた(VEGF-A: 1 mM; 188.1%, 3 mM; 188.3%, not significant; COX-2: 1 mM; 605.0%, $p < 0.05$, 3 mM; 608.5%, $p < 0.01$)。



血管誘導因子の VEGF-A とリンパ管誘導因子の VEGF-C のタンパク質レベルでの発現量の変化を Western blotting で検討した。SB 刺激後 24 時間では VEGF-A タンパク質産生量の増加と、VEGF-C タンパク質産生量の低下が認められ、定量的 PCR と一致した結果であった。



さらに培養細胞内における上記タンパク質検出を免疫細胞化学で試みたところ、SB 刺激後 24 時間では VEGF-A タンパク質産生量の増加と、VEGF-C タンパク質産生量の低下が認められ、定量的 Western blotting と同様の結果が得られた。



以上の結果から、*in vitro*において口腔癌の間質における血管・リンパ管因子の大部分はSB刺激により減少することが示唆された。興味深いことに、本研究ではCOX-2発現上昇に伴い、VEGF-Aの発現誘導が生じたが、VEGF-C、VEGF-Dは発現の抑制が認められた。

従来、VEGF familyはCOX-2が転写促進に与ると考えられていたが、SB刺激によるVEGF-C、VEGF-Dの発現量抑制にはCOX-2非依存的な経路が関与すると考えられた。COX-2は癌治療において標的分子の一つと考えられているため、今後、詳細な検討が望まれる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

現在、海外の学術専門誌に投稿中。

[学会発表] (計0件)

2010年度 国際口腔病理学会で発表予定。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 直行 (MATSUMOTO NAOYUKI)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：20791344

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

小宮山 一雄 (KOMIYAMA KAZUO)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：00120452

我孫子 宣光 (ABIKO YOSHIMITSU)

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：70050086