

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792213

研究課題名(和文) AngiogeninのrRNA転写促進作用がリンパ管新生に果たす役割

研究課題名(英文) The role of angiogenin-induced rRNA transcription in lymphangiogenesis

研究代表者

伊原木 聡一郎 (IBARAGI, Soichiro)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：80549866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：血管新生因子ANGとリンパ管新生因子VEGF-Cをリンパ浮腫動物モデルに投与した。ANG群、VEGF-C群、ANG+VEGF-C群で浮腫軽減を認めた。浮腫部の組織切片を作製しリンパ管新生を評価した。ANG群、VEGF-C群、ANG+VEGF-C群でリンパ管密度が高く、リンパ管新生が促進されていた。

リンパ管内皮細胞をANGとVEGF-Cの存在下と非存在下で培養した。ANG群、VEGF-C群ではANGは核移行しており、細胞増殖が促進された。ANGの促進するリンパ管新生はリンパ浮腫に対する新規治療法になる可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：ANG plays a significant role in angiogenesis. Lymphoedema is a refractory disorder that is difficult to be treated with conventional therapy. We therefore investigated whether ANG promotes lymphangiogenesis and improves lymphoedema. Administration of ANG and VEGF-C to mice with tail lymphoedema resulted in a decrease in lymphoedema thickness. ANG and VEGF-C treatment increased the number of lymphatic vessels in the injury site. The effects of ANG and VEGF-C on lymphatic endothelial cells were investigated. ANG and VEGF-C promoted ANG nuclear translocation and cell proliferation in lymphatic endothelial cells. Angiogenin-induced lymphangiogenesis is a possible new therapeutic strategy for lymphoedema.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：リンパ管新生 血管新生

1. 研究開始当初の背景

心臓から拍出された血液は動脈を経て毛細血管に至る。毛細血管の動脈側で血管外に漏出した組織液の大部分は、毛細血管の静脈側に再吸収される。一部の組織液はリンパ管に入ってリンパ液となり、静脈に流入する。

リンパ浮腫とはリンパ液の流れの障害のために生じた浮腫のことである。発症原因が不明で先天的なリンパ管の形成不全・機能不全が原因となる原発性（一次性）と、癌に対する手術や放射線治療・化学療法でリンパ管が損傷され発症した続発性（二次性）に分類される。リンパ浮腫患者の多くは乳癌、子宮頸癌、前立腺癌の治療に伴う続発性であり、治療を行った患者の25~30%に発症する。リンパ浮腫は、リンパ漏、皮膚潰瘍、蜂窩織炎を合併し、患者のQOLを低下させる。また稀に悪性化してリンパ管肉腫に移行する。リンパ浮腫に対して、保存的治療と外科的治療が行われてきた。保存的治療は、患肢の圧迫や用手的リンパドレナージ（マッサージ）を含む複合的理学療法であり、浮腫の進行を抑制する。リンパ管静脈吻合術は、癌治療後も残存したリンパ管と近傍の静脈を吻合し人工的にバイパスを作製し、貯留したリンパ液を静脈に流入させる。

しかし、いずれの方法を用いても完治は困難である。新しいリンパ管を形成することによって、遮断されたリンパ液の流れを再開すれば、リンパ浮腫を制御できる可能性がある。

リンパ管新生はリンパ管内皮細胞が遊走し、増殖し、新しいリンパ管を形成する一連の過程である。リンパ管新生因子はリンパ管内皮細胞に作用し、リンパ管新生を促

進している。リンパ管新生因子 Vascular Endothelial Growth Factor-C (VEGF-C) はリンパ管内皮細胞表面の受容体である VEGFR-3 に結合すると、リボソーム蛋白の合成を促進する。

リボソーム蛋白は、リボソーム生合成と細胞増殖を促進するが、それにはリボソーム RNA (rRNA) の転写を促進する必要がある。つまり、リボソーム生合成における律速段階は rRNA の転写である。rRNA 転写の促進機構についてはわかっていない。リボソーム蛋白の合成を促進する VEGF-C と共役的に働き、rRNA の転写を促進する因子の存在が考えられている。

2. 研究の目的

Angiogenin (ANG) は HT-29 ヒト大腸癌細胞株の培養上清から単離された。ANG は、血管内皮細胞に作用し血管新生に重要な役割を果たす。ANG 受容体は血管内皮細胞表面に存在を確認されているが、構造は全く不明である。ANG は受容体に結合すると、シグナル伝達因子である ERK と Akt を活性化させると同時に、ANG 自体も直接に核に移行する。核に移行した ANG は核小体で集積する。核小体はリボソーム生合成が行われる部位である。核内の ANG はリボソーム DNA (rDNA) のプロモーター領域に結合し、rRNA の転写を促進する。ANG の促進する rRNA の転写は、血管新生において必須である。

つまり ANG 以外の血管新生因子である bFGF や VEGF による血管新生においても、ANG は血管内皮細胞の核内に移行し rRNA の転写を促進する。また ANG 発現を阻害すると、bFGF や VEGF による血管新生は阻害される。現在までにリンパ管内皮細胞

においても ANG が核に集積している，ことを予備的な実験で確認した。

これらの知見より生じる疑問は，(1) リンパ管内皮細胞において核に集積している ANG は，rRNA 転写を制御しリンパ管新生を促進しているか，(2) ANG を投与することによってリンパ浮腫を制御できるか，という2点である。申請期間中に，以下の計画でその解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) ANG がリンパ管内皮細胞に与える影響の解析

リンパ管内皮細胞を，ANG 添加，VEGF-C 添加，未添加，の条件下で培養し解析を行った。ANG の核移行は蛍光抗体染色法で観察した。増殖能と遊走能はそれぞれトリプブルー法と創傷治癒アッセイを用いて測定した。管腔形成は In Vitro Angiogenesis Assay を用いて評価した。

(2) ANG がリンパ浮腫に与える影響の解析

リンパ浮腫動物モデルの作製とリンパ管の異常の検索を行う。8 週齢マウスの尾基部から 1cm 遠位の部分の表皮を 2mm 環状に剥ぎ取り，リンパ浮腫動物モデルを作製した。ANG と VEGF-C を単独もしくは混和し，腹腔内注射した。リンパ浮腫の程度は，尾の直径を計測し評価した。2 週間後，マウスを屠殺し，4%パラホルムアルデヒドで固定後，パラフィン包埋し，尾の組織切片を作製した。リンパ管新生は抗 LYVE-1 抗体を用いて免疫染色を行い，リンパ管密度を算出し評価した。

4. 研究成果

(1) ANG がリンパ管内皮細胞に与える影響の解析。

リンパ管内皮細胞における ANG の核への移行。ANG が rRNA 転写を促進するには，核に移行することが必須である。リンパ管内皮細胞の培養上清に ANG を添加すると，ANG が核に移行することを確認した。また VEGF-C 存在下においても，ANG は核移行していた。

リンパ管内皮細胞の増殖能。リンパ管内皮細胞を ANG と VEGF-C のそれぞれ存在下と非存在下で培養し増殖能を測定した。ANG と VEGF-C がリンパ管内皮細胞の増殖を促進することを確認した。

リンパ管内皮細胞の遊走能。リンパ管内皮細胞を ANG と VEGF-C のそれぞれ存在下と非存在下で培養し遊走能を測定した。ANG と VEGF-C はリンパ管内皮細胞の遊走を促進した。

リンパ管内皮細胞の管腔形成。リンパ管内皮細胞をゲル中で培養し ANG と VEGF-C のそれぞれ存在下と非存在下で培養し管腔形成を観察した。ANG と VEGF-C はリンパ管内皮細胞の管腔形成を促進した。

(2) ANG がリンパ浮腫に与える影響の解析。

リンパ浮腫動物モデルに ANG と VEGF-C を投与し，リンパ浮腫の程度を尾の直径を計測し評価した。ANG と VEGF-C 投与群においては，尾の直径は対照群と比較して小さく，リンパ浮腫が軽減されていると考えられた。リンパ管新生は尾の組織切片を作製し抗 LYVE-1 抗体を用いて免疫染色を行い，リンパ管密度を算出し評価した。ANG と VEGF-C 投与群においては，リンパ管密度が対照群と比較して高くリンパ管新生が促進されていた。

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3件)

1) Kishimoto K, Yoshida S, Ibaragi S, Yoshioka N, Hu GF, Sasaki A. 「Neamine Inhibits Oral Cancer Progression by Suppressing Angiogenin-mediated Angiogenesis and Cancer Cell Proliferation」

『*Anticancer Research*』2014 査読有

2) Li S, Hu MG, Sun Y, Yoshioka N, Ibaragi S, Sheng J, Sun G, Kishimoto K, Hu GF
「Angiogenin mediates androgen-stimulated growth of prostate cancer cells and correlates with castration resistance」

『*Molecular Cancer Research*』11(10), 1203-14, 2013 査読有

3) Kishimoto K, Yoshida S, Ibaragi S, Yoshioka N, Okui T, Hu GF, Sasaki A.

「Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin, besides VEGF, is related to progression of oral cancer」『*Oral Oncology*』48(11), 1120-7, 2012 査読有

〔学会発表〕(計5件)

1) 岸本晃治, 吉田祥子, 柴田 茜, 伊原木 聰一郎, 吉岡徳枝, 佐々木朗. Neamine の口腔癌に対する抗腫瘍効果の検討. 第31回 日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 東京 2013年1月24-25日 口演

2) 岸本晃治, 吉田祥子, 奥井達雄, 伊原木 聰一郎, 中妻可奈子, 志茂剛, 佐々木朗. Angiogenin の口腔癌治療に対する分子標的としての可能性 第50回日本癌治療学会学術集会 横浜 2012年10月25日-27日

ポスター

3) 伊原木 聰一郎, 柴田茜, 兒玉真一, 奥井達雄, 吉岡徳枝, 岸本晃治, 佐々木朗. リンパ管新生の分子機構の解明とリンパ浮腫の新規治療法の開発 第57回日本口腔外科学会総会・学術集会 横浜 2012年10月19日-21日 ポスター

4) Kishimoto K, Yoshida S, Ibaragi S, Yoshioka N, Okui T, Sasaki A. Neamine inhibits progression of oral cancer by suppressing angiogenin-stimulated angiogenesis and cancer cell proliferation. 21 Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery Dubrovnik, Croatia 2012年9月11日-15日

5) 岸本晃治, 吉田祥子, 奥井達雄, 伊原木 聰一郎, 吉岡徳枝, 志茂 剛, 兒玉 真一, 佐々木 朗. Angiogenin の核移行阻害剤 neamine の口腔癌に対する抗腫瘍効果の検討. 第66回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 広島 2012年5月17日, 18日 口演

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊原木 聡一郎 (IBARAGI SOICHIRO)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：80549866

研究協力者

柴田 茜 (SHIBATA AKANE)

岡山大学・岡山大学大学院・大学院生

研究者番号：なし

研究協力者

桑島 大介 (KUWAJIMA DAISUKE)

岡山大学・岡山大学大学院・大学院生

研究者番号：なし

研究協力者

森澤 綾香 (MORISAWA AYAKA)

岡山大学・岡山大学大学院・大学院生

研究者番号：なし

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし