

## 様式 C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成21年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号： 19791491

研究課題名（和文） 口腔癌における膜タンパク ADAMの血管新生制御

研究課題名（英文） The role of ADAMs for the angiogenesis of oral cancer

研究代表者

黒原 一人 (KUROHARA KAZUTO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：90401364

研究成果の概要：

ヒト口腔癌組織とヒト口腔癌由来株化細胞(HSC2, 3, 4)における膜タンパク ADAM(ADAM12, ADAM19)の mRNA 発現を調べたところ、ADAM サブタイプの発現量の差が僅かにみられたことが明らかにされた。膜タンパク ADAM(ADAM12, ADAM19)の血管新生制御については今後も検討の追加が必要である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

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：口腔外科学一般（含病態検査学）

### 1. 研究開始当初の背景

口腔癌は癌全体に占める発生率は低いものの早期発見・早期治療を行わなければ、他部位の癌と同様に機能障害・審美障害を伴い死に至る病である。癌の進行(cancer progression)において、マトリックス・メタロプロテアーゼ(matrix metalloproteases: MMP)といったタンパク切断

酵素が重要な役割をしていることが明らかになってきた。タンパク切断酵素活性部位のモチーフが同じ、ディスインテグリン・メタロプロテアーゼ(a disintegrin and metalloprotease: ADAM)に関して、癌の進行における役割は不明な点が多い。しかしながら研究開始当初は、癌の進行において

ADAM がシグナル伝達を制御し重要な役割をしていることを示唆する報告が発表されていた。私は現在まで生体での機能制御機構に興味を持ち ADAM を中心に研究を行い、成果を出してきた。その成果の中で、ADAM は血管形成制御に関与していることを掴み、癌の進行、とりわけ癌の血管誘導・新生に ADAM がシグナル伝達を介して関わっているのではないかと考え本研究の着想に至った。研究開始当初、扁平上皮癌における ADAM の発現の有無を確認した報告は少なく、口腔癌における ADAM の役割はほとんど明らかにされていなかった。私は口腔外科に籍を置き、口腔癌手術検体、口腔癌組織由来株化培養細胞を得る機会があったため、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

癌に限らず血管新生は様々な因子により制御されているが、vascular endothelial growth factor(VEGF)は血管内皮細胞に選択的に作用し血管新生を促進することが知られている。近年、VEGF とメタロプロテアーゼとの関わりを示唆する報告がされている。癌の血管新生を ADAM が遺伝子及び機能タンパクの発現レベルで制御するという概念と、口腔癌を対象としている点である。予想される結果として、ADAM のノックアウトマウスの研究などから、ADAM は VEGF の発現の all or none 的な制御ではなく、条件に依存した制御を担っていると予測される。本研究の意義としては、癌の血管新生において

ADAM が条件に依存した制御を担っている場合、その条件が微細であっても癌に特有のものであれば、その条件下で ADAM または VEGF に特異的に作用させる因子により癌の血管新生を制御する可能性があり、抗癌剤の創薬といった観点からも有意義であると考えられる。本研究の目的としては、口腔癌における ADAM (ADAM12, ADAM19)の発現の有無と発現部位と血管新生への関与の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

ヒト口腔癌の手術検体を試料として、試料より total RNA を抽出して mRNA レベルにおける ADAM 遺伝子 (ADAM12, ADAM19) の発現について確認した。ヒト口腔癌の症例の中で舌癌の T1~T2 症例の腫瘍部より約 5×5×5mm 大の組織片を採取して、-80℃にて凍結保存を行った。Total RNA 抽出キットを用いて total RNA を生成し、それをテンプレートとして real-time PCR 解析を行った。ADAM12 は soluble form (short) と trans membrane form (full) が発現していることが知られており、それぞれのフォームを特定するプライマーにて real-time PCR を行った。また ADAM19 については全長のフォームを特定するプライマーにて real-time PCR を行った。

ヒト口腔癌組織での ADAM (ADAM12, ADAM19) の発現部位が血管新生を行っている部分と一致しているか否かを確認するために免疫染色を行った。手術検体をホルマリン包埋して薄切して標本を作製した。標本を脱パラフィン等の処理をして、抗 ADAM12 抗体、抗 ADAM19 抗体、抗 VEGF 抗体にて免疫染色を行った。

本教室において樹立された、ヒト口腔癌

樹立細胞株 (HSC2, HSC3, HSC4) を用いて、ヒト口腔癌樹立細胞におけるmRNAレベルにおけるADAM遺伝子 (ADAM12, ADAM19) の発現について確認した。HSC2, HSC3, HSC4をそれぞれ細胞数を数えて細胞培養用シャーレに牛胎児血清を含んだDMEM培養液にてCO2インキュベーターにて培養し、semiconfluentの状態を細胞を集めて、total RNAを精製した。精製したtotal RNAをテンプレートとしてRT-PCRを行った。

#### 4. 研究成果

ヒト口腔癌の手術検体からtotal RNAを抽出してreal time PCRにてmRNAの発現を検討した。(図1参照)

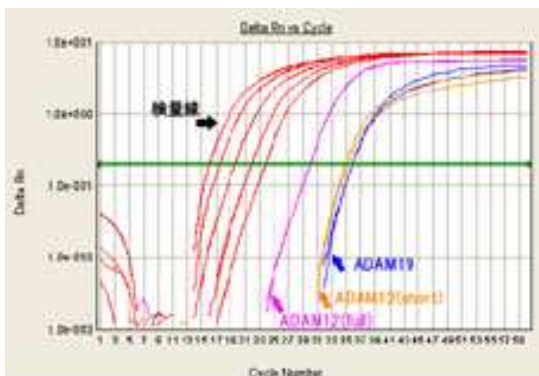


図1 ヒト口腔癌手術検体におけるADAM12とADAM19のmRNAの発現

ADAM12とADAM19はヒト口腔癌組織で発現していることがわかった。また、若干ではあるが、ADAM12のほうが、ADAM19より発現量が多いことがわかった。ヒト口腔癌において、ADAM12, ADAM19の発現を定量的に検討したのは新しいことである。

つぎにヒト口腔癌手術検体の免疫染色を行った。様々な抗体で染色してみたが、発現を特定する程度に特異的に染色がされなかった。

ヒト口腔癌組織より株化した培養細胞の

HSC2, HSC3, HSC4におけるADAM12, ADAM19の発現を検討した。HSC2, HSC3, HSC4からtotal RNAを抽出してRT-PCRにてmRNAの発現を検討した。(図2参照)

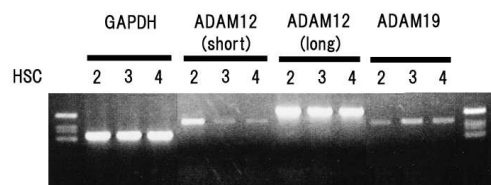


図2 ヒト口腔癌由来株化培養細胞におけるADAM12とADAM19のmRNAの発現

HSC2, HSC3, HSC4においてもADAM12とADAM19が発現していることがわかった。また、若干ではあるが、ADAM12のほうが、ADAM19より発現量が多いことがわかった。HSC2, HSC3, HSC4は増殖速度などの性質が若干異なるが、培養細胞の違いによるADAM12, ADAM19の発現の有無の違いはなかった。ヒト口腔癌株化培養細胞にて、ADAM12, ADAM19の発現を検討したことは新しいことである。

今回の研究期間では、諸々の困難のため当初の目的を達成するに至らなかったが、口腔癌の血管新生におけるADAMの役割を解析する今後の研究を行う上で基礎的な結果がえられたことは意義のあることである。

#### 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)

[学会発表] (計 0件)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
( )

研究者番号：

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：

|