

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590386
 研究課題名（和文） 癌組織の血管新生、転移における変異型 p53-FGF-1 経路の影響
 研究課題名（英文） Influence of mutation type of p53-FGF-1 pathway in angiogenesis for cancerous tissue and metastasis
 研究代表者
 野本 周嗣 (NOMOTO SHUJI)
 名古屋大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：40300967

研究成果の概要： 癌組織における血管新生の様子を p53-FGF-1 経路に影響を及ぼす VEGF の発現を調べて検討してみた。VEGF は数個の family 遺伝子群よりなり、これまで VEGF-A 遺伝子の報告がほとんどであったが、今回我々は、特に肝細胞癌における VEGF-B, VEGF-C 遺伝子に焦点をあてて、それらの発現の程度や、予後に対する影響、発現制御の機序について検討し、VEGF-B 遺伝子の発現が予後に影響すること、また、VEGF-C 遺伝子の発現がプロモーター領域のメチレーションにより制御されていることを見出し、これらが p53-FGF-1 経路の血管新生に影響するものと考察された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：腫瘍、血管新生

1. 研究開始当初の背景

癌において、血管新生を抑制することは新しい癌治療戦略として注目されつつあるが、血管新生のメカニズムが完全に解明された、とは言い難い。同じ癌種であってもそれぞれの組織で血管密度や血管の性状に差を認めることは、各種の血管新生促進分子や抑制分子の発現バランスがこれらを決めるものと考えられている。これまでに、明らかにされつつある、血管新生の機序は、第一段階の、血管内皮細胞の増殖への Initiation のシグナルが入ることであり、この段階では VEGF

(Vascular Endothelial Growth Factor) が中心的働きをなす。

次に、血管内皮細胞が増殖後、組織中に Migration していく第二段階では、FGF-2(Fibroblast Growth Factor 2) が中心となり働くと考えられている。

血管新生の第三段階は血管内皮細胞 Maturation で内皮細胞が管状構造をとることであり、この段階では FGF-1(Fibroblast Growth Factor 1) が中心となり働くと考えられている。

まず、血管新生の第一段階で中心的な働き

をみせる VEGF 遺伝子について調べてみると、これまでには、VEGF Family 遺伝子群のなかでも、VEGF-A 遺伝子の検討がほとんどであることが判明した。

VEGF 遺伝子ファミリーは数種類におよび、血管内皮細胞の造成に関わる VEGF-A, B 遺伝子、リンパ管の造成に関わる VEGF-C 遺伝子など多種に及ぶ。これらの遺伝子の発現や発現制御の機序についての詳細な検討はまだ行われていない。

また、FGF-1 遺伝子の発現制御についてもこれまでに、詳細な検討は行われていない。

2. 研究の目的

血管内皮細胞がどのように増勢し、組織内に入り込み、管状構造をとるか、を検討するため、血管造成因子の発現の様子を、実際の手術検体を用いて検討する。

特にこれまでに詳細な検討がなされていない VEGF-B 遺伝子においては、肝細胞癌における VEGF-B および 2 種の isoform である VEGF-B167 と VEGF-B186 の発現を調べ、臨床病理学的因子との関連を検討する。

また、リンパ節転移に関わるものが報告されている VEGF-C 遺伝子について、リンパ節転移は稀であるが、剖検例では約 20% にリンパ節転移を認めることが報告されている肝細胞癌における発現様式と発現の制御について検討する。

また、特に、血管新生の第三段階で中心的な働きをみせる FGF-1 遺伝子の発現を転写因子の p53 遺伝子が制御することに注目し、この機序について検討する。

3. 研究の方法

1995 年～2000 年の間に肝切除を施行した HCC 症例 48 例を対象とした。

年齢は 39～77 才で、男女比は 43 : 5 であった。

(1) VEGF-B 遺伝子について

総 VEGF-B の発現量は real-time quantitative RT-PCR により評価した。

発現量は、GAPDH にて各検体を標準化した。実験には ABI prism 7000 Sequence Detector (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA) を使用した。

2 つの isoform である VEGF-B167 と VEGF-B186 の発現は Competitive RT-PCR で評価した。

各検体でコントロールのため β -actin の発現を確認した。

VEGF-B の発現と臨床病理学的因子との関連性は、Fisher's exact test もしくは χ^2 test にて評価した。

生存曲線は Kaplan-Meier 法、予後差の評価は log-rank test にて行った。

$P < 0.05$ をもって、統計的に有意であると判定した。

(2) VEGF-C 遺伝子について

DNA と Total RNA を癌部、非癌部より抽出した。

mRNA につき、定量 RT-PCR にて測定した。

VEGF-C 遺伝子の promoter 領域の CpG islands での methylation について Methylation Specific PCR (MSP) にて調べた。

これらの結果と臨床病理学的な関連を統計学的に検討した。

(3) FGF-1 遺伝子の p53 遺伝子による発現制御

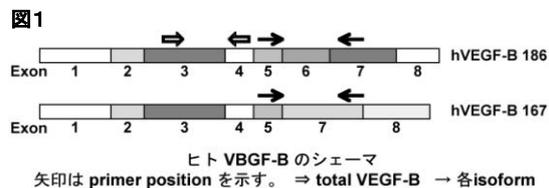
FGF-1 遺伝子が存在する周辺のゲノムから putative p53 binding element を含む fragment 500bp～800bp を 13 個、PCR によりクローニングし、p53 関連遺伝子での発現活性をみた。

p53 遺伝子が wild type である時と変異型であるときの発現活性の変化を調べた。

4. 研究成果

(1) VEGF-B 遺伝子の検討

まず、VEGF-B 遺伝子全体の mRNA の発現それぞれの isoform の発現を見るため、図 1 のように primer をデザインして RT-PCR と competitive RT-PCR を行った。(図 1)



総 VEGF-B の癌部での発現が 非癌部より増加している群は、16 例 (33.3%)。

この群では有意に進行病期、多発腫瘍、脈管侵襲、Fc(-)が多かった。

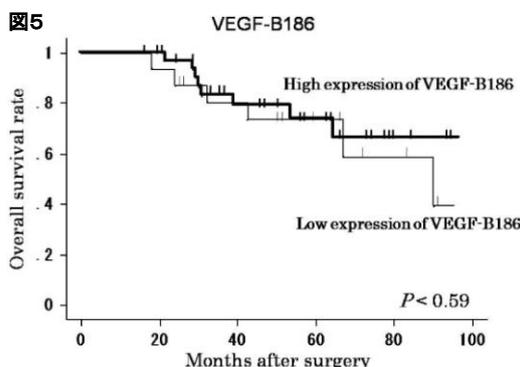
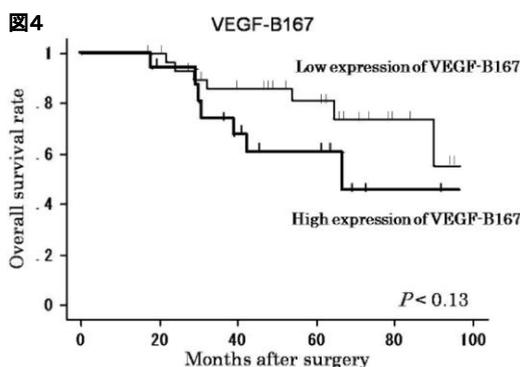
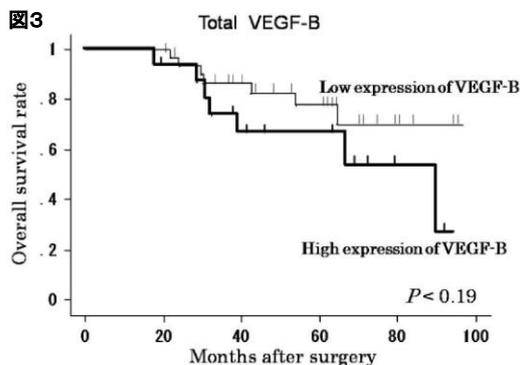
VEGF-B167 の癌部での発現が非癌部より増加している群は、17 例 (35.4%)。この群では有意に進行病期、多発腫瘍、脈管侵襲、Fc(-)、Fc-inf(-)が多かった。

VEGF-B186 の癌部での発現が非癌部より増加している群は、33 例 (68.75%)。この群では有意に腫瘍径の大きい例、多発腫瘍が多かった。

実際の RT-PCR の結果については、図 2 の通りであった。(図 2)



VEGF-B 発現と予後の相関：全 48 例の 5 年生存率は 77.1%であった。総 VEGF-B の発現が癌部の方で増加していた群は予後が不良となる傾向があった。VEGF-B167 は同様の傾向を示した。(図 3, 4, 5)



① 考察

総 VEGF-B 発現量は 16 例 (33.3%) でのみ癌部の方が発現が増加していたが、これはいずれの症例も背景に慢性肝炎もしくは肝硬変が存在し、血管増生があったためと考えられる。

癌部で総 VEGF-B 発現量が増加した群では、有意に進行病期・多発腫瘍・脈管侵襲・Fc(-)が多く、VEGF-B の発現が HCC の増殖、進展に関与することが示唆された。

各 isoform の検討では、癌部で発現が増加した症例の比率、臨床病理学的因子との関連性、予後との関連性のいずれも VEGF-B167 は総 VEGF-B に類似した結果を示した。反対に、VEGF-B186 の結果は総 VEGF-B との共通点に乏

しく、臨床的には VEGF-B167 の方が優勢であると考えられた。

② 結語

VEGF-B の発現は、HCC において腫瘍の増大や進展に関与していることが示唆された。

VEGF-B167 は、臨床的に優位な isoform と考えられた。

(2) VEGF-C 遺伝子の検討

VEGF-C の発現レベルに関しては、48 症例中、24 例で非癌部より癌部での低下を示した。癌部での methylation は 48 例中 26 例で認められ、また、その 26 例中 15 例は発現が低下した症例であった。

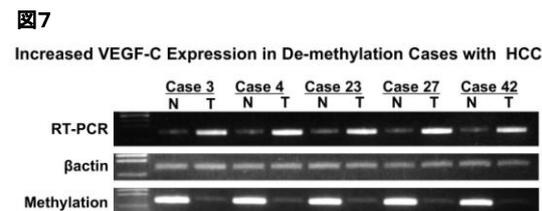
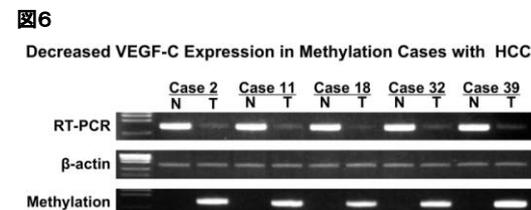
methylation を示した症例と発現が低下した症例は有意な関連を認めた ($p=0.045$)。

また、非癌部でメチレーションを示した症例を 10 例認め、そのうち 6 例では癌部で methylation を認めない de-methylation の症例であった。

De-methylation の症例は 6 例中 5 例で VEGF-C の発現が定量 PCR で 2 倍以上に上昇した症例であり、de-methylation と発現上昇は有意に相関した ($p=0.032$)。

臨床病理学的因子と発現、methylation とは有意な相関は認められなかった。

実際の RT-PCR と methylation specific PCR の様子は以下の通りである。(図 6, 7)



① 考察

VEGF-C の発現は癌部で低下する症例が多く、これは、HCC において、リンパ節転移が稀である一因である、と考えられた。また、発現低下の機序として癌部での methylation が関わっていることが示唆された。

また、少数ながら VEGF-C の発現が癌部で非癌部の 2 倍以上に上昇する症例を認め、発現上昇の機序として de-methylation が関連していることが示唆された。

② 結語

HCC における VEGF-C の発現は epigenetic な機序にて制御されている。

(2) 研究分担者

粕谷 英樹 (KASUYA HIDEKI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：00402636

中尾 昭公 (NAKAO AKIMASA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70167542