

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791517

研究課題名 (和文)

低酸素微小環境下における Angiogenin の発現およびその機能に関する研究

研究課題名 (英文)

The expression and role of Angiogenin under microenvironment of hypoxia

研究代表者

吉岡 徳枝 (YOSHIOKA NORIE)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50362984

研究成果の概要：本研究では、angiogenin の発現レベルの高い口腔扁平上皮癌細胞株 HSC2 細胞において、siRNA 発現プラスミドベクターを遺伝子導入して angiogenin の発現をノックダウンした。Angiogenin の発現が抑制されると、低酸素微小環境下でも血管新生因子の 1 つである VEGF の発現は低下しており、angiogenin と VEGF はリンクしていることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	0	1,400,000
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	540,000	3,740,000

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：臨床腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

Angiogenin は 1985 年に HT-29 大腸癌細胞株の培養上清から分離された、分子量 14.2kDa のリボヌクレアーゼ活性をもつ angiogenic protein であり、前立腺癌、乳癌などの様々な癌組織でその発現が亢進している。申請者らは Angiogenin をノックダウンした前立腺癌細胞において、rRNA の転写が阻害されることにより癌細胞の増殖を *in vitro*, *in vivo* で抑制することを明らかにし、アミノグリコシド系抗生物質である Neomycin が Angiogenin の核への移行を阻害することにより血管新生のみならず、癌細胞の増殖をも抑制することを明らかにした。癌細胞が増殖するためには酸素と栄養が必

要であるが、固形癌の微小環境は低酸素状態となっているにもかかわらず癌細胞は生存し増殖しうる。これには、低酸素微小環境下での HIF-1 α (hypoxia-inducible factor 1 α) 転写遺伝子を介する癌細胞のサバイバル戦略が関与しており、化学療法や放射線療法に抵抗性をもたらすなど、予後不良の因子として認識されている。近年、様々な癌において低酸素微小環境下で Angiogenin が up-regulate しているとの報告があるが、その制御機構についての詳細はまだ明らかとなっていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、低酸素微小環境下における Angiogenin を介する癌細胞の増殖および腫

瘍血管新生機構を解明し、Angiogenin を新たな分子標的とする癌治療への応用を目指すことにある。そのために、以下にあげる項目について検討する。

(1) Hypoxia で angiogenin の発現が up-regulate する口腔癌細胞株を選択し、それらの細胞株に angiogenin siRNA 発現ウイルスベクターを遺伝子導入し、angiogenin RNAi transfectant (以下 Ang-RNAi) を作製する。

(2) Ang-RNAi の Hypoxia における増殖能、浸潤能の変化を調べる。

(3) Hypoxia において、Angi-RNAi の HIF-1 α および VEGF などの発現の変化を調べる。

3. 研究の方法

(1) 低酸素微小環境下における Angiogenin の役割を解明するために、口腔癌細胞株を用いて Ang-RNAi を作製する。

① angiogenin 遺伝子をノックダウンする口腔癌細胞株の選択。

normoxia (20 % O₂) において angiogenin を分泌する口腔癌細胞株 (HSC2, HSC3, HSC4, UM1, UM2, KB, SCCKN, SAS) を用いて、hypoxia で angiogenin の発現が up-regulate する口腔癌細胞株を選択する。hypoxia (5 % O₂) 24 時間後の各種細胞の培養液を回収し、培養上清へ分泌された angiogenin の量を Double antibody ELISA により測定する。

② angiogenin siRNA 発現ウイルスベクターの遺伝子導入し Ang-RNAi を作製する。①で選択した口腔癌細胞株 HSC2 細胞に Lentivirus vector (MISSION™ Lentiviral Transduction Particles, NM_001145 angiogenin : ribonuclease: RNase A family; 5 - SHVRS, Sigma) を遺伝子導入後、puromycin で選択し Ang-RNAi を作製する予定であったが、作製が困難であった。

そのため、代用手段として angiogenin siRNA 発現 plasmid DNA を遺伝子導入し、HSC2 細胞の Ang-RNAi transfectant を作製することにした。

デザインしたターゲット配列とセンス・アンチセンスオリゴを図 1 に示す。

Vector control (pcPURU6i STOP (SV40))
Sense oligo : 5'-CACCTTTTT-3'
Antisense oligo : 5'-GCATAAAAAA-3'

Angiogenin-RNAi
Position: 1986
Target sequence : GCATGACATCAACACATT
Sense oligo : 5'-CACCGGGAAGATATCAACATATTACGTGTGCTG*CGTAATGTGTTGATGCTTTGCTTTT-3'
Antisense oligo : 5'-GCATAAAAAAGCAAGACATCAACACATTACGGCAGCAGCAGCGTAATA*GTTGATATCTTCGC-3'

図 1. The design of construct of Angiogenin-RNAi

アニーリングしたオリゴヌクレオチドを BspMI で切断されたヒト U6 系のプロモーターを持つ pcPURU6 vector (図 2) ヘライゲーションした。反応を行ったプラスミドをコンピ

レントセル (E. coli DH5 α) にトランスフォーメーション後、寒天プレートに播き目的のインサートが入っているコロニーを選抜した。インサートの確認は、PCR と最終的にはその配列をシーケンスで確認した。大腸菌を LB 培地で大量培養後、EndoFree Plasmid Purification キット (QIAGEN) を用いて 2 種類の plasmid DNA を精製した。

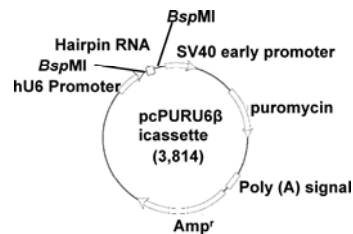


図 2. pcPURU6 $\mu\beta$ plasmid vector

HSC2 細胞に対し、angiogenin siRNA 発現 plasmid DNA ならびに Vector control plasmid DNA を effectance (QIAGEN) にて遺伝子導入後、puromycin で 2 週間選択して angiogenin RNAi transfectant (Ang-RNAi) および vector control transfectant (Vector-CNTL) を作製した。

③ HSC2 細胞の Ang-RNAi transfectant と Vector-CNTL における angiogenin の発現レベル、細胞増殖能、浸潤能、リボゾームの生合成に関する比較検討。

RT-PCR : 10%FBS 添加 D-MEM/F12 培地で培養した transfectant から totalRNA を採取し、RT-PCR を用いて細胞内の angiogenin の発現の変化を Vector-CNTL と比較した。RNA 抽出および精製には RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を使用した。逆転写反応には、1 μ g の total RNA を Super Script II Reverse Transcriptase (invitrogen) を用い、Oligo(dT) にて cDNA を合成した。Real time PCR には 2 μ l の cDNA, 10 μ l の SYBR Premix Ex Taq (2X) (TAKARA), 0.4 μ l の各プライマーで全反応量を 20 μ l にして chromo 4 リアルタイム PCR 解析システム (BIO-RAD) を用いて PCR を行った。初期変性 95°C 10 秒, アニーリング 95°C 5 秒, 進展 60°C 20 秒を 1 サイクルとし, 55 サイクルの PCR を行った。Angiogenin primer の配列は, F: 5' -CCTGTGTTGGAAGAGATGGT-3' , R: 5' -CCTGTGGTTTGGCATCATAG-3' (日本遺伝子研究所) とした。

細胞増殖能 : 6-well plate に 1.5 x 10⁵ cells/well で transfectant を播種し, 経時的に細胞数をカウントし変化を調べた。
浸潤能 : 0.3% softagar (10%FBS 添加

D-MEM/F12) 内で anchorage-independent growth assay を行い、細胞のコロニー形成能をコロニー数と大きさで評価した。

リボゾームの生合成の評価：transfectant を 10%FBS 添加 D-MEM/F12 培地で培養し、その nucleolar organizer region (NOR) の銀染色を行い、NOR のドット数をカウントして評価した。

(2)HSC2 細胞の Ang-RNAi transfectant の Hypoxia における in vitro での angiogenin, VEGF, HIF-1 α の発現の変化を Vector-CNTL と比較検討する。

①Hypoxia (5 % O₂) の環境下で HSC2 細胞の親株 (Parent), Ang-RNAi transfectant および Vector-CNTL を培養後、培養上清を回収し、培養上清中に分泌された angiogenin の量を Double antibody ELISA により測定し、分泌量を比較検討した。

② Hypoxia (5 % O₂) の環境下で HSC2 細胞の親株 (Parent), Ang-RNAi transfectant および Vector-CNTL から培養上清中に分泌された VEGF の量を ELISA kit (R&D 社) を用いて測定し、Vector-CNTL の分泌量と比較した。

③Hypoxia (5 % O₂) の環境下で、Ang-RNAi transfectant および Vector-CNTL から蛋白を抽出し Westernblot 法を用いて細胞内の HIF-1 α の発現量を検討した。1 次抗体として、抗 HIF-1 α モノクローナル抗体 (1:1000, NOVOS Biologicals) を用いた。2 次抗体としてホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗マウス抗体 (1:1000, Amercham Pharmacia Biotech) を用い、ECL システム (1:1000, Amercham Pharmacia Biotech) を用いて X 線フィルムに化学発光を行った。

4. 研究成果

(1) 口腔癌細胞株における normoxia および hypoxia での angiogenin の発現レベル。

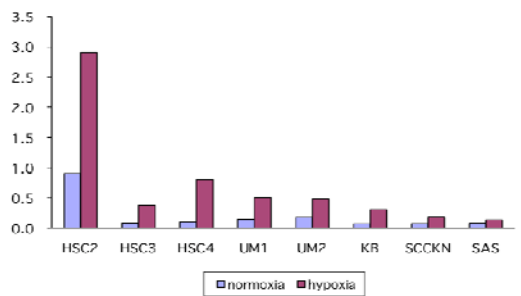


図3. The level of secreted Angiogenin in various Oral Squamous Cell Carcinoma cell lines in normoxia and hypoxia

Double antibody ELISA により normoxia および hypoxia の条件下で採取した各種口腔癌細胞株の培養上清中に分泌された angiogenin の量を測定したところ、HSC2 細胞において著明に angiogenin の発現が上昇しており (図3), angiogenin をノックダウンする細胞として HSC2 細胞を選択した。

(2)HSC2 細胞の Ang-RNAi transfectant における angiogenin の発現レベルおよび細胞増殖能の検討。

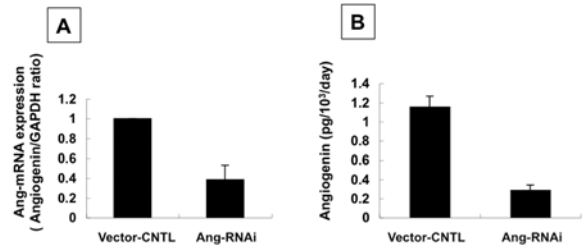


図4. Angiogenin RNAi transfectant of HSC-2 cells have decreased mRNA (A) and secreted protein (B) level of angiogenin.

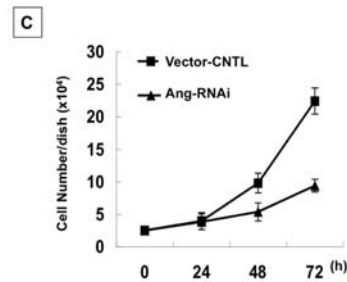


図4. The growth rate of Ang-RNAi transfectant of HSC2 cells.

HSC2 細胞の Ang-RNAi transfectant は 10%FBS 添加 D-MEM/F12 培地で angiogenin の mRNA および蛋白の発現レベルが減少しており (図 4A, B), 無血清培地下での Ang-RNAi transfectant の増殖速度は有意に減少していた (図 4C)。

(3) HSC2 細胞の Ang-RNAi transfectant における浸潤能およびリボゾーム生合成の検討。

HSC2 細胞の Ang-RNAi transfectant は softagar で培養すると形成したコロニー数もサイズにおいても Vector-CNTL と比較し、有意にその数は減少しており、足場非依存性の増殖は抑制されていた (図 5)。

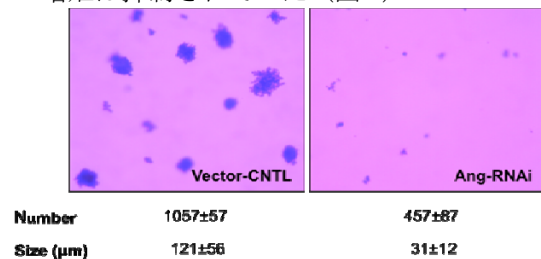


図5. Down-regulating angiogenin expression in HSC-2 cells reduced tumorigenesis in soft agar

Nucleolar organizer region (NOR)はrDNA loopを転写する場であり、リボゾームの生合成の状態を反映しており、NORのサイズと数は細胞のrRNAの転写能力を示す。D-MEM/F12培地で培養したAngi-RNAi transfectant および Vector-CNTL において NOR を銀染色したところ、Ang-RNAi transfectantはVector-CNTLと比較してドット数が減少しており、リボゾームの生合成が抑制されていることが明らかとなった(図6)。

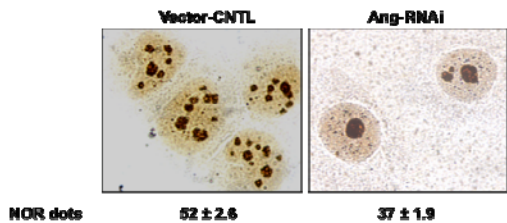


図6. Down-regulating angiogenin expression in HSC-2 cells reduced ribosome biogenesis

(4) Hypoxia における HSC2 細胞の Ang-RNAi transfectant の in vitro での angiogenin, VEGF および HIF-1 α の発現の変化。

HSC2細胞の親株(Parent), Ang-RNAi transfectantおよびVector-CNTLを各々シャーレに播種し、10%FBS添加D-MEM/F12培地で24時間培養した。培地を交換した後に、各細胞をnormoxia(20% O₂)とhypoxia(5% O₂)の環境下におき、さらに24時間培養したところ、Vector-CNTLから分泌されるangiogeninの量は著明に増加したが、VEGFの量はほぼ変化しなかった。一方、Ang-RNAi transfectantから分泌されるangiogeninの量はhypoxiaの環境下で増加したが、VEGFの量は減少した(図7, 8)。

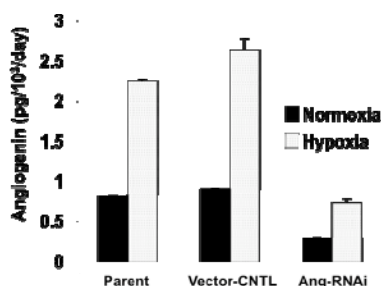


図7. Secreted level of angiogenin in Ang-RNAi transfectant under normoxia and hypoxia

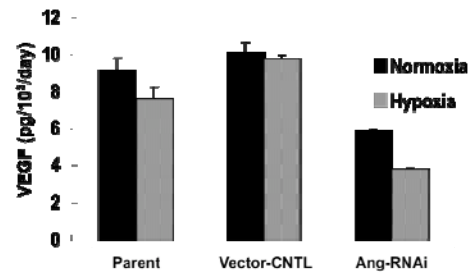


図8. Secreted level of VEGF in Ang-RNAi transfectant under normoxia and hypoxia

Hypoxiaの環境下ではHSC2細胞の親株とVector-CNTLにおいてHIF-1 α 蛋白の発現の亢進が認められたが、Ang-RNAi transfectantではnormoxiaおよびhypoxiaの両者の環境下においてもHIF-1 α 蛋白のバンドがwestern blotで検出できなかった。

(5) 考察と今後の展望

近年、種々の血管新生因子が癌の増殖、浸潤、転移に深く関与し、予後を左右する重要な因子であることが報告されている。中でもangiogeninは、1985年に世界で最初に分離された腫瘍血管新生因子の1つであり、癌の新生血管形成ならびに増殖を促進する。Angiogeninの血管内皮細胞に対する増殖・遊走作用は、VEGFやbFGFなどの他の血管新生因子と比べると弱いにもかかわらず、in vivoにおいてangiogeninは種々の血管新生作用の実験で有意な血管新生活性を示すことが確認されている。しかしながら、その血管新生メカニズムおよび他の血管新生因子や転移との関係は未だ明らかではなく、口腔癌においても低酸素環境下でのangiogeninの発現と機能解析に関する報告はなされていないのが現状である。一方、癌細胞によって産生されるVEGFは、癌の増殖過程において内皮細胞の増殖と遊走を促進し腫瘍血管新生の中心的な役割を果たしている。固形癌組織内の低酸素微小環境下では、転写制御因子であるHIF-1 α が合成され、VEGFの発現が亢進する。

本研究では, angiogenin の発現が抑制された状態では, hypoxia の環境下に細胞をさらしても VEGF の産生量も低下していることから, angiogenin と VEGF はリンクしていることが示唆される. しかしながら, Ang-RNAi transfectant では, normoxia, hypoxia の両者の環境下でも HIF-1 α 蛋白のバンドが western blot で検出できなかったことから, HIF-1 α が癌組織内の低酸素環境下における angiogenin と VEGF の発現制御に参与している可能性を示せなかった. 今後はマウス背部皮下腫瘍移植モデルを作製し, in vivo における Ang-RNAi transfectant の腫瘍増殖速度や angiogenin, VEGF, HIF-1 α の発現ならびに血管新生能の変化を検討することにより, angiogenin の発現抑制による hypoxia 環境下での血管新生・腫瘍増殖のメカニズムへの影響について検討したい. 本研究から angiogenin は腫瘍血管新生および癌細胞の増殖に重要であり, 口腔癌の治療標的分子として有用である可能性を示すものと考えられた.

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)

[学会発表] (計1件)

1. Koji Kishimoto, Norie Yoshioka, Shoko Yoshida and Akira Sasaki. Expression and role of angiogenin under hypoxia in oral cancer. 8th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery. November, 3-7, 2008. Thailand, Bangkok.

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉岡 徳枝 (YOSHIOKA NORIE)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 50362984

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

岸本 晃治 (KISHIMOTO KOJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 40243480