

平成23年5月20日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592359

研究課題名(和文)

Angiogeninを介する血管内皮前駆細胞の分化誘導と腫瘍血管新生機構の解明
 研究課題名(英文) Angiogenin-induced differentiation of endothelial progenitor cell
 and the mechanism of tumor angiogenesis

研究代表者

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

研究成果の概要(和文)：

血管新生蛋白angiogeninは、細胞密度にかかわらず血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell:EPC)の核に移行し、リボソームの生合成を誘導し細胞増殖を促進した。また、angiogeninは口腔扁平上皮癌細胞クラスターへのEPCの遊走・浸潤作用を増強した。さらに、bFGFやVEGFなどの血管新生因子はEPC内で内因性angiogeninの核への集積を促進した。以上から、腫瘍血管新生へ血管内皮前駆細胞が関与する過程で、angiogeninが重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Angiogenic factor, angiogenin underwent nuclear translocation in endothelial progenitor cell (EPC) in a cell density-independent manner and induced ribosome biogenesis, and cell proliferation. Angiogenin also increased EPC migration and invasion into the oral squamous cell carcinoma cell clusters. Moreover, various angiogenic factors such as bFGF and VEGF stimulated nuclear accumulation of endogenous angiogenin in EPC. These results suggest that angiogenin plays an important role in the tumor angiogenesis by EPC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：angiogenin、血管内皮前駆細胞、血管新生、分化誘導、癌

1. 研究開始当初の背景

分子量14 kDaのリボヌクレアーゼ活性をもつ血管新生蛋白angiogeninは、血管内皮細胞および癌細胞内の核内でリボソームRNA (rRNA)を刺激することによって、腫瘍血管新生作用と同時に癌細胞自身への直接的な増殖作用を有する。従来、腫瘍血管新生は、血管内皮細胞が癌細胞からの種々の血管新生因子により増殖・遊走作用を受け、癌組織内に浸潤して起こると考えられていた。しかし、近年、癌細胞から分泌されるVEGF等の血管新生因子により骨髄から動員・活性化された血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell: EPC) が腫瘍血管内皮を修飾するとともに、それ自身が腫瘍血管内皮細胞へ分化誘導を受け腫瘍血管新生に関与することが報告され注目を集めている。申請者らはヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた実験で、各種血管新生因子によって誘導される内皮細胞の増殖に、内因性angiogeninが必要であることを明らかにした。すなわち、HUVECをVEGFやFGFの血管新生因子で刺激すると、内因性angiogeninは核へ移行(Nuclear translocation)し、核小体に集積する。そして、rRNAの転写、リボソームの生合成が誘導され、その結果として細胞増殖がangiogeninを介して促進されるのである。したがって、内皮細胞におけるangiogeninを介するrRNAの転写が、種々の血管新生因子によって誘導される血管新生過程には必要であり、crossroadとして働くと考えられる。しかしながら、内皮細胞の前段階であるEPCの増殖や腫瘍血管内皮細胞への分化誘導機構に及ぼすangiogeninの影響や生物学的活性は未だ不明であり、癌組織という特異的な微小環境下における腫瘍血管新生へのangiogeninを介するEPCの役割は未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、EPCの増殖、血管形成能および腫瘍血管内皮細胞への分化誘導に及ぼすangiogeninの影響を明らかにし、angiogeninを介する腫瘍血管新生機構の解明をさらに行うことを目的とする。

3. 研究の方法

EPCはApproCell社から販売されるEPCを使用し、CD34およびCD133陽性細胞であることを確認した。

(1)EPCにおけるangiogeninの核への移行

①EPCにおける外因性angiogeninの核への移行：無血清培地に10 ng/mlのangiogeninを加え37℃、1時間EPCを培養し、抗angiogeninマウスモノクローナル抗体 26-2FとAlexa 488でラベルした抗マウス二次抗体で染色し、angiogeninの核への移行・集積を蛍光顕微鏡で調べる。

②各種血管新生因子 (VEGF、aFGF、bFGF、EGF) 刺激によるEPCにおける内因性angiogeninの核への移行：10 ng/mlの各種血管新生因子で4時間EPCを刺激した後に、内因性angiogeninの核への移行・核小体への集積を上記と同様の方法で調べる。

(2)EPCの増殖・血管形成能・分化誘導に及ぼすangiogeninの影響の検討

①EPCの増殖能に及ぼすangiogeninの影響：EPCにangiogeninを加え、増殖率(細胞数のカウント)、リボソームの生合成率(nucleolar organizer regions (NOR)の銀染色をおこない、そのNORのドット数にて評価)の変化を検討する。

②EPCの血管形成能に及ぼす外因性angiogeninの影響：EPCの遊走・浸潤・チューブ形成に及ぼすangiogeninの影響を検討する。

(3)HSC-2口腔扁平上皮癌細胞クラスターに

対するEPCの遊走・浸潤作用における

angiogeninの影響の検討

コラーゲングルにHSC-2細胞を埋め込み直径1mmの癌細胞クラスターを作製し、EPCと共にマトリゲル上で48時間培養し調べる。

(4)血管新生因子bFGFによるEPCの増殖と遊走・浸潤・チューブ形成能に及ぼす内因性angiogeninの影響の検討

EPCにおける内因性angiogeninの影響を調べるために、angiogeninを抑制するsiRNAを用いてEPCの内因性angiogeninの発現を抑制し、bFGFで刺激後、細胞増殖率とリボソームの生合成率、浸潤・遊走・チューブ形成能の変化を検討する。

4. 研究成果

(1)EPCにおけるangiogeninの核への移行

①EPCにおける外因性angiogeninの核への移行と細胞密度との関係：HUVECでは、外因性angiogeninの核移行は細胞密度が増加すると減少するが、EPCにおける外因性angiogeninの核移行も細胞密度に影響するかを検討した。無血清培地に10 ng/mlのangiogeninを加え37℃、1時間、HUVECおよびEPCをそれぞれ細胞密度を変えて培養し、抗angiogenin抗体で染色し、angiogeninの核への移行・集積を蛍光顕微鏡で調べた。図1に示すように、外因性angiogeninの核移行は、HUVECでは細胞密度の影響を受けるが、EPCでは細胞密度の影響を受けずangiogeninの核移行が認められた。これは、EPCが癌細胞と同様にangiogeninによりrRNAを刺激し、無制限にEPCの増殖を促進させる可能性を示唆するものである。

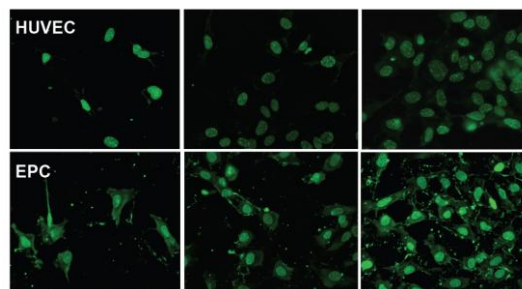


図1 HUVECとEPCにおける外因性angiogeninの核移行と細胞密度の関係

②各種血管新生因子 (VEGF、aFGF、bFGF、EGF) 刺激によるEPCにおける内因性angiogeninの核への移行を検討：10 ng/mlの各種血管新生因子で4時間EPCを刺激後、抗angiogenin抗体で染色し内因性angiogeninの局在を調べたところ、内因性angiogeninの核への移行・核小体への集積が認められた (図2)。

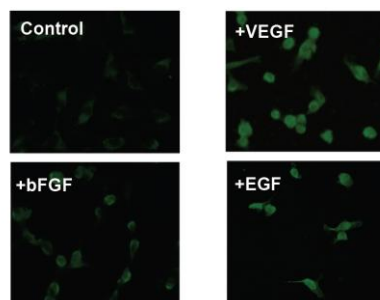


図2 VEGF、bFGF、EGF刺激によるEPCにおける内因性angiogeninの核移行

(2)EPCの増殖・血管形成能・分化誘導に及ぼすangiogeninの影響

①EPCの増殖能に及ぼすangiogeninの影響：

EPCに1 μg/ml angiogeninを加え48時間無血清下で培養すると、angiogenin非添加に比べ約33%の細胞数の増加が認められた。また、同時にEPCの銀染色を行いNORのドット数をカウントしたところ、angiogenin添加群が35±12/細胞核、angiogenin非添加群が20±11/細胞核と、angiogeninの添加によりリボソームの合成率も増加した (図3)。

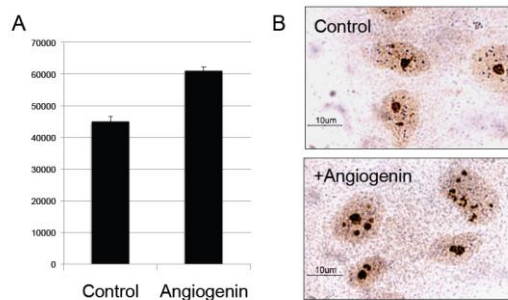


図3 EPCの増殖能に及ぼす外因性angiogeninの影響
EPCを5000 cells/cm²の濃度で無血清培地の35 mmシャーレにまき、angiogenin (1μg/ml)を加え48時間培養後、細胞数をカウントした(A)。また、銀染色を行いNORのドット数をカウントした(B)。

②EPCの血管形成能に及ぼすangiogeninの影響：8 μmメンブレンを用いてmigration assayを行ったところ、10 ng/mlのangiogeninの添加によりEPCの遊走能は有意に増強した。また、図4に示すように、500 ng/mlのangiogeninを加え24時間無血清下で培養すると、angiogenin非添加に比べ、チューブ形成率が増強された。

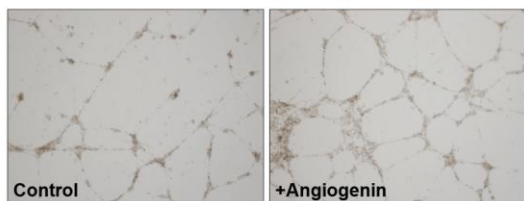


図4 EPCのチューブ形成に及ぼす外因性angiogeninの影響
EPCを無血清培地にまき、angiogenin (500 ng/ml)を加え24時間培養した。

③EPCの血管内皮細胞マーカー発現に及ぼすangiogeninの影響：EPCに1 μg/mlのangiogeninを加え48時間無血清下で培養後、FACS分析によりFlt-1 (VEGFR-1)、Tie-1の発現の変化を調べたが、Flt-1 (VEGFR-1) およびTie-1陽性細胞の有意な増加は認められなかった。

(3)HSC-2口腔扁平上皮癌細胞クラスターに対するEPCの遊走・浸潤作用におけるangiogeninの影響

コラーゲンゲルにHSC-2細胞を埋め込み直径1mmの癌細胞クラスターを作成し、EPCと共にマトリゲル上で48時間培養したところ、HSC-2細胞クラスター周囲へEPCの遊走が観察され、500 ng/mlのangiogeninを添加することによ

りその遊走作用は増強した。

(4)血管新生因子bFGFによるEPCの増殖と遊走・浸潤・チューブ形成能に及ぼす内因性angiogeninの影響

angiogeninを抑制するsiRNAを用いてEPCの内因性angiogeninの発現を抑制し、5 ng/ml bFGFで48時間刺激したところ、angiogeninの発現を抑制すると細胞増殖率は有意に低下した

(図5)。また、リボソームの生合成率、遊走・浸潤・チューブ形成能も有意に低下した。

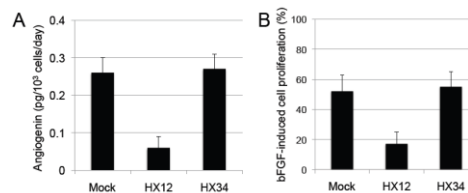


図5 内因性angiogeninのdownregulationがEPCの増殖に及ぼす影響
EPCをangiogenin siRNAでdownregulateした細胞(HX12)とnegative control細胞(HX34)のangiogeninの分泌量をELISAで測定した(A)。EPCを5ng/mlのbFGFで48時間刺激した時の、細胞増殖率を%で示した(B)。

本研究結果から、angiogeninはEPCを介する血管新生の促進に関与すると考えられる。また、EPCは血管内皮細胞と異なり、細胞密度に非依存的にangiogeninをEPCの核内に取り込むことから、angiogeninを介して無秩序に腫瘍血管を造成し続けることに寄与すると考えられる。さらに、bFGFやVEGFなどの血管新生因子がEPCを刺激して増殖させるには、内因性angiogeninが必要であると考えられる。ただし、今回、angiogeninをEPCに加え48時間培養しても、血管内皮細胞マーカー発現(Flt-1 (VEGFR-1) およびTie-1)の増加が認められなかった点は、培養を長期に行うなどして再検討する必要がある。今後は、angiogeninを標的とした口腔癌への治療展開が期待される。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計4件)

①岸本 晃治 7名、Angiogeninの発現亢進は口腔癌の増殖と進展に関与する、第29回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会、2011年1月27日、熊本

②Koji Kishimoto, 5名、UP-REGULATION OF ANGIOGENIN IS INVOLVED IN ORAL TUMORIGENESIS AND CANCER PROGRESSION、9th

Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery、2010年11月27日、Kuala Lumpur
③Koji Kishimoto、4名、Expression and role of angiogenin under hypoxia in oral cancer、8th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery、2008年11月6日、Bangkok

④岸本 晃治、3名、口腔癌において angiogenin は低酸素環境下で高発現し腫瘍血管新生および細胞増殖に関与する、第67回日本癌学会総会、2008年10月29日、名古屋

[その他]

ホームページ等

http://www.dent.okayama-u.ac.jp/2kouge/index_sc_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

佐々木 朗 (SASAKI AKIRA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00170663