

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
神田宏治	主査 教授 植 木 實 副査 教授 谷 川 允 彦 副査 教授 大 槻 勝 紀 副査 教授 森 浩 志 副査 教授 勝 岡 洋 治
主論文題名 Transcriptional expression of the genes implicated in angiogenesis and tumor invasion in cervical carcinomas (子宮頸癌における血管新生および浸潤関連因子の遺伝子発現)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>固形腫瘍の発育・進展には腫瘍血管新生が不可欠で、癌細胞から産生される様々な血管新生因子により腫瘍内微小血管は増加し、原発巣の発育や癌細胞の浸潤・転移に寄与する。また、癌細胞の浸潤形質規定因子として種々の蛋白分解酵素が必須である。血管新生因子としては、vascular endothelial growth factor (VEGF) family (VEGF-A、B、C、D)、basic fibroblast growth factor (bFGF)、thymidine phosphorylase (dThdPase)が重要で、VEGF-Aには完全型のtotal VEGF-Aに加えてexon 6、7が欠損するVEGF121、VEGF165、VEGF189などのsplice variantsが存在する。一方、癌の浸潤過程で細胞外基質成分(extracellular matrix : ECM)を分解する蛋白分解酵素としては、matrix metalloproteinase (MMP)やplasminogen activator (PA)が中心的な役割を果たしている。これまで血管新生因子や蛋白分解酵素の腫瘍局所における発現が婦人科癌の悪性度と密接に関連することが指摘されてきたが、これら多様な因子のmRNAレベルでの遺伝子共発現パターンと癌細胞浸潤能との関連性、あるいは癌組織と正常組織との相違に関してはほとんど報告されていない。そこで我々は、子宮頸癌培養細胞と正常頸部組織における種々の血管新生因子および蛋白分解酵素の遺伝子あるいは蛋白発現レベルを定量的に解析して両者を比較するとともに、癌細胞の浸潤動態との関連性を検討した。</p> <p>《方 法》</p> <p>子宮頸部扁平上皮癌由来細胞7株 (SKG-I、SKG-II、SKG-IIIa、SKG-IIIb、OMC-1、YUMOTO、QG-U) および子宮頸部腺癌由来細胞4株 (HOKUG、NUZ、OMC-4、CAC-1) と同意を得て手術摘出標本より採取した14例の正常頸部組織を用いた。</p> <p>各培養細胞および組織検体から常法によりtotal RNAを抽出し、random primer法により合成したcDNAを鋳型にして、VEGF-A (VEGFtotal、VEGF121、VEGF165、VEGF189)、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、bFGF、dThdPase、MMP-2およびurokinase-type PA (uPA)の遺伝子発現レベルをReal-Time PCR法 (Roche、LightCycler)により測定した。内部標準としてはβ-actin遺伝子を用いた。一方、頸癌細胞のin vitro 浸潤能はhaptoinvasion assayで定量し、VEGF-CとMMP-2の蛋白発現は各々に対する市販の抗体を用いた酵素免疫測定法で定量した。統計学的解析</p>	

にはMann-Whitney U-testと Spearman's rank correlationを用いた。

《成績》

定量的PCRの結果、癌細胞において共発現していた遺伝子は、血管新生因子間ではVEGFtotalと各splice variantsおよびVEGF-B、あるいはVEGF165とdThdPase、血管新生因子と蛋白分解酵素の間ではVEGF-AとuPA、あるいはVEGF-CとMMP-2、蛋白分解酵素間ではMMP-2とuPAであった ($p < 0.05$)。扁平上皮癌と腺癌での差異はみられなかった。正常頸部組織ではVEGF121とdThdPase遺伝子のみが共発現していた ($p < 0.05$)。癌細胞において共発現していた遺伝子について、浸潤動態との関連性をさらに検討したところ、VEGF-CおよびMMP-2遺伝子・蛋白発現はin vitro浸潤能と相関した ($p < 0.05$)。癌細胞では正常組織に比較して、VEGF-A splice variants (VEGF121、165、189) 遺伝子発現が著しく高く ($p < 0.01$)、またMMP-2遺伝子発現も有意に高値を示したが ($p < 0.05$)、他の因子に関しては有意差は認められなかった。

《結論》

頸癌の発生過程には主としてVEGF-A isoformが、浸潤動態にはVEGF-CとMMP-2が密接に関連することが示唆された。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	神田宏治
論文審査担当者		主 査 教授 植 木 實 副 査 教授 谷 川 允 彦 副 査 教授 大 槻 勝 紀 副 査 教授 森 浩 志 副 査 教授 勝 岡 洋 治	
主論文題名 Transcriptional expression of the genes implicated in angiogenesis and tumor invasion in cervical carcinomas (子宮頸癌における血管新生および浸潤関連因子の遺伝子発現)			
論文審査結果の要旨			
<p>固形癌の発育・進展には腫瘍血管新生が重要な役割を果たしているが、癌細胞における血管新生因子の発現と浸潤動態との関連性については未だ不明な点が多い。</p> <p>申請者らは子宮頸癌培養細胞 11 株と正常頸部組織 14 検体における種々の血管新生因子 VEGF-A (VEGFtotal、VEGF121、VEGF165、VEGF189)、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、bFGF および dThdPase ならびに浸潤形質規定因子 MMP-2、urokinase-type PA (uPA)の遺伝子発現を Real-Time PCR 法 (Roche、LightCycler)により定量的に解析し、各因子間の共発現関係を明らかにした。すなわち、癌細胞において共発現していた遺伝子は、血管新生因子間では VEGFtotal と各 splice variants および VEGF-B、あるいは VEGF165 と dThdPase、血管新生因子と蛋白分解酵素の間では VEGF-A と uPA、あるいは VEGF-C と MMP-2、蛋白分解酵素間では MMP-2 と uPA であった ($p < 0.05$)。正常頸部組織では VEGF121 と dThdPase 遺伝子のみが有意な共発現していた。癌細胞では正常組織と比較して、VEGF-A splice variants (VEGF121、165、189) 遺伝子発現が有意に高く、また MMP-2 遺伝子発現も有意に高値を示したが、他の因子に関しては有意差は認められなかった。頸癌細胞の <i>in vitro</i> 浸潤能を haptoinvasion assay で測定し、癌細胞で共発現していた VEGF-C、MMP-2 の蛋白発現レベルを ELISA で測定した結果、VEGF-C および MMP-2 遺伝子・蛋白発現は <i>in vitro</i> 浸潤能と有意に相関した。</p> <p>本研究により、頸癌細胞における血管新生因子と浸潤形質規定因子の遺伝子共発現関係が明らかにされ、それらが浸潤動態とも密接に関連していることが示された。また、頸癌細胞と正常頸部組織におけるこれら遺伝子発現パターンの相違が判明した。その結果、頸癌の発生には VEGF-A isoform が、浸潤動態には VEGF-C と MMP-2 が密接に関連することが明らかとなり、これらの知見は、子宮頸癌における血管新生機構の解明や分子標的治療の進展に貢献するものと考えられる。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第 9 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものである。</p> <p>(主論文公表誌) Gynecologic Oncology 98: 453-461, 2005</p>			