

氏名	近藤 誠二
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 2 4 8 5 号
学位授与の日付	平成 1 5 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	Connective tissue growth factor increased by hypoxia may initiate angiogenesis in collaboration with matrix metalloproteinases (低酸素誘導された結合組織成長因子はマトリックスメタロプロテアーゼと協調して血管新生を誘発する)
論文審査委員	教授 松村 智弘 教授 山本 照子 教授 滝川 正春

学位論文内容の要旨

【目的】

結合組織成長因子(CTGF)は、血管内皮細胞の培養上清中に見い出された39個のシステイン残基を含む349個のアミノ酸からなる分子量38KDaの分泌性タンパク質である。その発現は正常組織においては肥大軟骨細胞で特に高く、また、組み換え体タンパク質が培養軟骨細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞の増殖と分化を促進すること、*in vivo*において血管新生作用を有することから、生理的には内軟骨性骨化に重要な役割を果たす因子と考えられている。しかし、一方で、創傷治癒過程、線維化、さらに血管に富む腫瘍など病的状態では種々の細胞で発現が見られ、その病理的意義、特に腫瘍血管誘導との関連が注目されている。血管新生は固形癌が増殖する際の栄養分と酸素の供給路として重要であり様々な因子により誘導される。その一つとして低酸素があるが、癌細胞は同じ組織の正常細胞と異なり慢性的に低酸素状態に置かれている為、癌組織においては、進行に伴い様々な血管新生因子が誘導され、活発な血管新生が惹起されている。本研究ではこの低酸素がCTGF及びマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の発現、誘導に影響を与えるかどうか、さらにCTGFとMMPとの間に相互作用が見られるかどうか検討した。

【材料と方法】

I. 細胞培養：ヒト乳腺癌細胞MDA231は10% FBSを含むDMEMで、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVECはEBM-2 で、37°C、5%CO₂気相下にて培養した。低酸素状態(5%O₂)の維持には90%N₂ガスで置換出来る専用培養器を用いた。

II. ルシフェラーゼアッセイ：CTGFのプロモーターおよび3'側非翻訳領域(3'-UTR)を組み込んだキメラプラスミドをMDA231にリポフェクション法で遺伝子導入し、通常酸素及び低酸素下で一定時間培養した後、活性を測定した。

III. ノーザンブロッティング：MDA231を通常酸素および低酸素下で一定時間培養した場合、およびHUVECにリコンビナントCTGFを添加した場合の全RNAを抽出し、精製した。得られたRNAを等量使用し、変性アガロースゲル上で電気泳動後、ナイロンメンブレンに転写、固定した。次いでRI標識した各プローブ(CTGFおよびMMP群)でハイブリダイゼーションを行った。

IV. ELISA：通常酸素および低酸素下で一定時間培養したMDA231の培養上清および細胞画分を試料とし、ヒトCTGFモノクローナル一次抗体をコートしたELISAプレートにこれら試料を等量加えた。界面活性剤含有洗浄液で洗浄後、ビオチン化CTGFモノクローナル二次抗体を加えた。最後に、ストレプトアビジン-β-ガラクトシダーゼと特異的基

質を添加し蛍光発色させ測定した。

V. 蛍光免疫染色：カバーガラス上で低酸素下24時間培養したMDA231をホルムアルデヒド固定した後、ウサギ抗CTGF血清と反応させた。FITC蛍光標識二次抗体を用いて蛍光顕微鏡で観察した。

VI. ゼラチンザイモグラフィ：通常酸素および低酸素下で一定時間培養したMDA231の培養上清を凍結乾燥法で濃縮し、ゼラチンを含むSDS-PAGEゲルで電気泳動した。洗浄液でSDSを取り除いた後、活性化溶液中でゼラチナーゼを活性化し、ゲル上のゼラチン基質の消化痕をクマシーブルー染色で可視化した。

【結果】

I. MDA231細胞を低酸素下で培養すると*ctgf* mRNAの発現が1.5時間後から6時間後にかけて、増強した。その程度は通常酸素下で培養したものと比較して1.5時間後で約2倍であった。

II. 低酸素下で培養したMDA231細胞のCTGFプロモーター活性は通常酸素下のプロモーター活性に比べてむしろ低く、低酸素による*ctgf* mRNAの発現レベルの上昇が転写活性化によるものでは無いことがわかった。一方、低酸素下では*ctgf* 3'-UTRの遺伝子発現抑制効果の解除が認められ、それがIの結果を生んだと考えられる。

III. MDA231細胞を低酸素下で最長72時間まで培養した際、培養上清中に産生される細胞あたりのCTGF産生量は通常酸素下の産生量と比較して24時間後に最大となった。一方、培養上清中のCTGFを細胞画分CTGFで割った値、すなわちCTGFの分泌効率は、低酸素下で徐々に上昇し、48時間後からさらに顕著になった。また低酸素下で培養したMDA231細胞を抗CTGF抗体で免疫染色すると染色強度が増強している事が確認された。

IV. MDA231細胞において、MT1-MMPのmRNAの発現もCTGFと同じように1.5時間後から誘導され、通常酸素下と比較して約1.7倍に増強した。また低酸素下培養48時間後でMMP9の有為な誘導が認められたが、MMP2の活性は全測定時間を通して認められなかった。

V. HUVECにおいて、CTGFは血管内皮細胞で発現が報告されているMMPsのmRNAの発現を6時間以内に増強した。一方、MMPの阻害因子であるTIMP-1およびTIMP-2の発現は共に3時間以内に減少した。

【考察】

以上の実験結果から、ある種の癌細胞では、癌組織の低酸素状態が血管新生因子CTGFを初期反応として誘導し、そのCTGFが内皮細胞にMMPを発現させると同時に癌細胞自身もMMPを発現、活性化させて細胞外基質の分解を促し、血管新生を積極的に促進する可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

本研究は癌細胞培養株を実験的低酸素に暴露することによって、血管新生因子である結合組織成長因子(CTGF)を含めてそこで特異的に発現する分子群(マトリクスメタロプロテアーゼ, MMPおよびMMPの阻害因子であるTIMP)の動態を解析したものである。

その結果、ヒト乳腺癌細胞MDA231細胞を低酸素下で培養すると

- I. *ctgf* mRNAの発現が通常酸素下で培養したものと比較して比較的早期に増強された。
- II. その遺伝子発現増大は*ctgf* プロモーター活性化によるものではなく*ctgf* 3'側非翻訳領域(3'-UTR)の遺伝子発現抑制効果の解除に起因していた。
- III. 低酸素暴露によって、培養上清中に産生されるCTGF量は増大し、暴露時間が長くなるとCTGFの分泌効率を増大させてより多くのCTGFを放出した。
- IV. 血管新生に関係の深いMMPs(MT1-MMP, MMP9)の有意な発現、誘導が見られた。
- V. ヒト臍帯静脈血管内皮細胞HUVECにおいて、外部から組み換えCTGFタンパクを添加すると、血管内皮細胞で発現が報告されているMMPsのmRNAの発現を増強する一方、MMPの阻害因子であるTIMPの発現を減少させた。

以上の知見が得られた。

本研究は癌組織の低酸素状態が、血管新生因子CTGFを初期反応として誘導し、そのCTGFが内皮細胞にMMPを発現させると同時に癌細胞自身にもMMPを産生させて、細胞外基質の分解を促進することにより血管新生を誘発するという癌の浸潤の初期課程に関する一つのモデルを示した点で極めて斬新な研究であり、本申請論文は学位論文としての価値を有すると認めた。