

血管新生因子 **Angiogenin** の
リンパ管新生に果たす役割に関する研究

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

病態制御科学専攻 腫瘍制御学講座 口腔顎顔面外科学分野

藤井 由紀子

A study about the role of angiogenin, an angiogenic factor,
on lymphangiogenesis

Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
Okayama University Graduate School of Medicine,
Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Yukiko FUJII

(平成 28 年 12 月 15 日受付)

緒 言

閉鎖循環系とは、心臓から拍出された血液が動脈を経て毛細血管に至り毛細から静脈を経て心臓へと戻る、すべて血管内を循環する経路である。一方、開放循環系とは、血管外に漏出した組織液が静脈に流入する経路であり、リンパ管がその役割を担う。

リンパ管内に存在するリンパ液の流れが障害されるとリンパ浮腫を生じる¹⁾。明らかな発症要因がなく先天的なリンパ管の形成不全に起因すると考えられる原発性と、癌に対する手術や放射線治療でリンパ管が損傷され発症する続発性に分類される²⁾。リンパ浮腫患者の多くは乳癌、子宮癌、卵巣癌、頭頸部癌などの治療に伴う続発性であり、治療を行った患者の25~30%に発症する^{2,3)}。本邦では約10万人が罹患している⁴⁾。

リンパ浮腫は非常に難治性で、進行に伴い、リンパ漏、皮膚潰瘍、蜂窩織炎および象皮症を合併し、患者のQOLを低下させる。また、まれに悪性化してリンパ管肉腫に移行する^{5,6)}。

リンパ浮腫に対しては、保存的治療と外科的治療が行われてきた⁷⁾。保存的治療は、用手的リンパドレナージや患肢の圧迫を含む複合的理学療法である⁸⁾。外

科的治療であるリンパ管静脈吻合術は、癌治療後も残存したリンパ管と近傍の静脈を吻合し人工的にバイパスを作製し、貯留したリンパ液を静脈に流入させる⁹⁾。しかし、いずれの方法を用いても完治は困難である^{8,9)}。新しいリンパ管を形成することによって、遮断されたリンパ液の流れを再開すれば、リンパ浮腫を制御できる可能性がある。

リンパ管新生はリンパ管内皮細胞が遊走し、増殖し、新しいリンパ管を形成する一連の過程である。リンパ管新生因子はリンパ管内皮細胞に作用し、リンパ管新生を促進している。代表的なリンパ管新生因子である **vascular endothelial growth factor (VEGF) -C** はリンパ管内皮細胞表面の受容体である **VEGFR-3** に結合すると、シグナル伝達因子 **ERK** を介してリンパ管内皮細胞の増殖を促進するとともに、**AKT** を介してリンパ管内皮細胞のアポトーシスを抑制する¹⁰⁾。

angiogenin (ANG) はヒト大腸癌細胞株 **HT-29** の培養上清から単離された¹¹⁾。ANG は、血管内皮細胞に作用し血管新生に重要な役割を果たす。ANG は血管内皮細胞表面の受容体に結合すると、**VEGF-C** と同様に **ERK** と **AKT** を活性化させると同時に、ANG 自体も直接に核に移行する^{12,13)}。核内の ANG はリボソーム DNA (**rDNA**) のプロモーター領域に結合し、リボソーム RNA (**rRNA**)

の転写を促進する¹⁴⁾。ANG の促進する rRNA の転写は、血管新生において必須である¹⁴⁾。しかし、ANG のリンパ管新生に与える影響は未だ解明されていない。そのため本研究は、ANG がリンパ管新生に与える影響を解明し、リンパ浮腫に対する新たな治療法の可能性について検討したので報告する。

材料および方法

1. 試薬

recombinant human angiogenin (ANG) および recombinant human VEGF-C (VEGF-C) は、R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) から購入した。それぞれリン酸緩衝液生理食塩水 (phosphate buffered saline : PBS ; 日本製薬, 東京) で希釈し 10 μ g/ml の濃度に調整した。

2. 培養細胞株および細胞培養

正常ヒト皮膚微小リンパ管内皮細胞 (normal human dermal lymphatic microvascular endothelial cells : HMVEC-dLy ; Lonza, Basel, Switzerland) を使用した。リンパ浮腫患者を想定した成人由来の HMVEC-dLy と、増殖能が高く活性が高い新生児由来の HMVEC-dLy を使用した。培養はリンパ管内皮細

胞増殖添加因子 (EGM-2 ; Lonza) を含有した, 内皮細胞基本培地 endothelial basal medium-2 (EBM-2 ; Lonza) を使用し, 5%CO₂, 37°Cで培養した。継代は 0.25%trypsin-EDTA (Lonza) を用いて細胞を剥離させた後, 220×g で5分間遠心し, 5×10³cells/cm² で播種した。

3. 細胞増殖能の検討

ANG がリンパ管内皮細胞の増殖能に与える影響を検討するため, 6 well マルチプレートに HMVEC-dLy を播種し, ANG (1µg/ml) および VEGF-C (1µg/ml) を単独もしくは混和して添加し, 24 時間毎の細胞数を測定して増殖曲線を作成した。細胞数の計測には, TC20 Automated Cell Counter® (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を使用した。

4. 細胞遊走能の検討

ANG がリンパ管内皮細胞の遊走能に与える影響を検討するため, migration assay を用いて評価した。すなわち, Matrigel Invasion Chamber 24-well® (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) においてマトリゲルがコーティングされていないインサートを使用した。これは2層式のチャンバーで, ポアサイズ 8µm のメンブレンにより上下層に分けられている。上層のみに HMVEC-dLy を 3×10⁴ cell/ml ずつ播種し, ANG (1µg/ml) および VEGF-C (1µg/ml) を単独もし

くは混和して添加した。上層には無血清培地を，下層には 10%FBS 含有培地を入れ 24 時間後に，その濃度勾配に従って上層から下層へ移動しメンブレン裏面に付着した細胞をディフ・クイック（国際試薬，兵庫）を用いて固定後に染色し，細胞数を計測した。

5. 細胞運動能の検討

ANG がリンパ管内皮細胞における運動能に与える影響を検討するため，wound healing assay で評価した。すなわち，HMVEC-dLy を 6 well マルチプレートに 5%FBS 含有培地を用いて培養し，サブコンフルエントに達した時点で 1%FBS 含有培地に交換し，ANG (1 μ g/ml) および VEGF-C (1 μ g/ml) を単独もしくは混和して添加した。プレート上を約 1mm 幅のプラスチックチップで擦過し細胞を剥離することで模擬的な創傷を作製した。新たに細胞が移動した面積を計測し，経時的な創傷面積の変化について検討した。面積の測定には画像解析ソフト Image J[®] (version1.43r ; NIH, Bethesda, MD, USA) を使用した。

6. 管腔形成能の検討

ANG がリンパ管内皮細胞の管腔形成能に与える影響を検討するため，Endothelial Tube Formation Assay[®] (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) を用いて評価した。すなわち予め冷却した 96well マルチプレートに ECM ゲルを

加え、37°Cで30分間インキュベートしゲルを形成させた。その後 HMVEC-dLy を播種し、ANG (1 μ g/ml) および VEGF-C (1 μ g/ml) を単独もしくは混和して添加した。細胞をゲル内に封入し三次元培養を行い管腔形成の観察を行った。管腔形成能の評価は形成された管腔の分岐点の数で行った。

7. ウェスタンブロット法

ANG がリンパ管内皮細胞における細胞内シグナル伝達経路に与える影響を検討するため、ウェスタンブロット法を用いて ERK および AKT のリン酸化について検討した。すなわち、HMVEC-dLy を 6cm ディッシュ (Greiner Bio-One, Kremsmuenster, AUT) に播種し、サブコンフルエントに達した時点で無血清培地に交換し 24 時間培養した。その後 ANG (1 μ g/ml) を 0 分、15 分、30 分、60 分、120 分間添加した。細胞溶解液 (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1%NP-40, 0.5%deoxycholate, 1mM sodium vanadate, 20mM leupeptin, 1mM phenylmethyl sulfonylfluoride, 1%aprotinin) を用いて細胞を可溶化したうえで回収し、4°Cで 10 分間、13,500rpm で遠心分離を行い上清を回収した。タンパク定量は BCA Protein Assay Kit[®] (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) を用いて行った。4 μ g のタンパクを含む各サンプルを Laemmli Sample Buffer[®] (Bio-Rad) と β -mercaptoethanol と混合して 95°Cで 5 分間還元状態に

した後、泳動用緩衝液（25mM Tris·HCl, 192mM glycine, 0.1% (w/v) SDS）を用いて polyacrylamide を 12%含有するゲルにて 90 分間泳動し、タンパクを分画した（室温, 100V 定電圧条件）。その後、分画したタンパクを転写用緩衝液（25mM Tris·HCl, 192mM glycine, 20%methanol）中で 90 分間 polyvinylidene difluoride 膜 (PVDF 膜: Immobilon-P®; Millipore, Bedford, MA, USA) へ転写した（室温, 100V 定電圧条件）。転写後の PVDF 膜はブロッキング操作を行った後、一次抗体として抗ヒト p-ERK ラビットモノクローナル抗体, 抗ヒト ERK ラビットモノクローナル抗体, 抗ヒト p-AKT ラビットモノクローナル抗体, 抗ヒト AKT ラビットモノクローナル抗体（いずれも Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA）を Can Get Signal Solution 1®（TOYOBO, 大阪）に 1000 倍希釈し 4°Cで 12 時間反応させた。さらに、二次抗体として horseradish peroxidase（HRP）標識ポリクローナル抗体（Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK）を Can Get Signal Solution 2®（TOYOBO）に 1000 倍希釈し室温で 90 分間反応させた。反応タンパクの検出には ECL システム（Bio-Rad）を使用し、ChemiDoc® MP ImageLab PC システム（Bio-Rad）でケミカル検出を行うと同時に標的タンパクに相当するバンドの黒化度を数値化して評価を行った。

8. 免疫蛍光抗体法

ANG がリンパ管内皮細胞における細胞内局在に与える影響を検討するため、免疫蛍光抗体法を用いて評価した。すなわち、カバーガラス上で HMVEC-dLy を培養し、サブコンフルエントに達した時点で無血清培地に交換し、ANG (1 μ g/ml) および VEGF-C (1 μ g/ml) を単独もしくは混和して添加し 37 $^{\circ}$ C で 4 時間培養した。PBS で洗浄し、-20 $^{\circ}$ C の methanol で 10 分間固定した。再度 PBS で洗浄し、3%FBS 含有 PBS で 10 分間ブロッキングを行い、一次抗体として抗ヒト ANG マウスモノクローナル抗体 (Abcam, Cambridge, UK) を 500 倍希釈し 4 $^{\circ}$ C で 12 時間反応させた。PBS で洗浄し、二次抗体として蛍光抗体である Alexa Fluor[®] 488 (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) を 1000 倍希釈し遮光下に 4 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。核染色は、4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma, St Louis, MO, USA) を用いて行った。封入は、Dako Fluorescent Mounting Medium[®] (Dako, Carpinteria, CA, USA) で行い、倒立型電動リサーチ顕微鏡 IX81 (OLYMPUS, 東京) および手動/電動落射蛍光システム (OLYMPUS) を用いて検鏡した。

9. リボソーム形成能の検討

ANG がリンパ管内皮細胞におけるリボソーム形成能に与える影響を検討す

るため、**argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR)** 染色法を用いて評価した。核小体形成領域 (**nucleolar organizer region : NOR**) は、染色体中の **rDNA** がループ構造を形成している領域であり、**rRNA** の転写やリボソーム生合成が行われている。**AgNOR** 染色法は好銀性を示す **NOR** 関連タンパクを染色する方法で、その数がリボソーム生合成を反映している。方法はまず **Cultureslides® (BD Falcon)** のスライドグラス上で **HMVEC-dLy** を培養し、サブコンフルエントに達した時点で無血清培地に交換し、**ANG (1µg/ml)** および **VEGF-C (1µg/ml)** を単独もしくは混和して添加し 24 時間後に染色を行った。すなわちスライドグラス上の細胞を固定した後に、**2%ゼラチン/1%蟻酸水溶液** と **50%硝酸銀水溶液** を **1 : 2** の割合で混和し染色液を作製し、**30 分間** 染色した。蒸留水で洗浄後、**Dako Fluorescent Mounting Medium® (Dako)** で封入した。

10. マウスリンパ浮腫モデルの作製

ANG が生体内におけるリンパ浮腫に与える影響を検討するため、マウスリンパ浮腫モデルを作製した¹⁵⁾。すなわち、1 群を 5 匹とし 8 週齢雄 **C57BL/6** マウス (日本クレア, 東京) の尾基部から **1cm** 遠位の表皮を、尾静脈は残存させて **2mm** 環状に剝離し、血流障害の影響を排除したマウスリンパ浮腫モデルを作製

した。投与群には ANG (1 μ g/ml) および VEGF-C (1 μ g/ml) を単独もしくは混和し、50 μ g/kg で週 3 回腹腔内投与を行った。また対照群には PBS を使用した。尾の表皮剥離部位の遠位に形成された浮腫組織の最大直径を計測し経時的なリンパ浮腫の程度を検討した。動物実験はすべて岡山大学動物実験管理委員会の指針に従って行った。

11. 免疫組織化学染色法

ANG が生体内におけるリンパ管新生に与える影響を検討するため、免疫組織化学染色法を用いて評価した。すなわち、リンパ浮腫モデル作製後 14 日目にマウスを屠殺し尾の組織採取を行った。尾の組織は 10%中性緩衝 formalin で 24 時間浸漬固定を行った後に脱水し、パラフィン包埋した。浮腫組織の横断面を厚さ 4 μ m で薄切し切片を作製した。脱パラフィン後に、0.3%過酸化水素を含む methanol による内因性 peroxidase の阻止を行った。抗原性の再賦活化法として 0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) で加圧熱処理を行った。一次抗体は抗マウス LYVE-1 ラビットポリクローナル抗体 (Abcam) を 200 倍に希釈し、また抗マウス CD31 ラビットポリクローナル抗体 (Abcam) を 1000 倍に希釈して使用した。二次抗体反応は、Envision®キット (Dako) によって行った。0.01%3,3'-diaminobenzidine (DAB) 含有 0.05M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.6) を

用いて発色させ、光学顕微鏡で検鏡した。リンパ管密度の高い部位を 100 倍視野下で 3 視野選択し、LYVE-1 および CD31 陽性のリンパ管数および血管数を計測し平均値を算出した。

12. 統計分析

各実験系における検定を Student の t 検定によって行った。危険率 5% 未満を有意差ありと判定した。

結 果

1. ANG がリンパ管内皮細胞の増殖能，遊走能，運動能に与える影響

HMVEC-dLy を用いて増殖能を検討した。新生児および成人由来のいずれの細胞においても培養 5 日目では ANG 添加群で増殖能が有意に促進された。

VEGF-C 添加群と ANG/VEGF-C 添加群でも HMVEC-dLy の増殖能が有意に促進された。一方、培養 2 日目では新生児由来 HMVEC-dLy において ANG 添加群と対照群の増殖能に有意差は認められなかった。(図 1)

HMVEC-dLy を用いて migration assay で遊走能を検討した。メンブレン裏面へ遊走した細胞数は、新生児由来 HMVEC-dLy では対照群 119 ± 4 個に対し

て ANG 添加群 158 ± 13 個であり，成人由来 HMVEC-dLy では対照群 100 ± 5 個に対して ANG 添加群 133 ± 15 個であり，増殖能同様 ANG 添加群では対照群と比較して遊走能が有意に促進された。また VEGF-C 添加群と ANG/VEGF-C 添加群でも遊走能が有意に促進された。(図 2)

HMVEC-dLy を用いて wound healing assay で運動能を検討した。新生児および成人由来のいずれの細胞においても，VEGF-C 添加群と ANG/VEGF-C 添加群では対照群と比較して運動能が有意に促進された。ANG 添加群では運動能の促進傾向は認められたが，有意差は認められなかった。(図 3)

2. ANG がリンパ管内皮細胞の管腔形成能に与える影響

HMVEC-dLy を用いて管腔形成能を検討した。新生児および成人由来のいずれの細胞においても，ANG 添加群では対照群と比較して管腔形成能が有意に促進された。また VEGF-C 添加群と ANG/VEGF-C 添加群においても管腔形成能が有意に促進された。ANG/VEGF-C 添加群では ANG 添加群および VEGF-C 添加群と比較して管腔形成数が有意に増加した。(図 4)

3. ANG がリンパ管内皮細胞の細胞内シグナル伝達経路に与える影響

ANG を培地に添加したときの HMVEC-dLy の細胞内シグナル伝達経路における経時的な変化を，ウェスタンブロット法を用いて検討した。新生児由来

HMVEC-dLy では、ERK は添加 15 分後に、AKT は添加 15 分後から 30 分後でリン酸化のピークを迎え、その後低下した。成人由来 HMVEC-dLy では、ERK および AKT はともに添加 60 分後にリン酸化のピークを迎え、その後低下した。

(図 5)

4. ANG がリンパ管内皮細胞の細胞内局在に与える影響

ANG が HMVEC-dLy における細胞内局在に与える影響について免疫蛍光抗体法で検討を行った。新生児および成人由来のいずれの細胞においても、ANG 添加群および ANG/VEGF-C 添加群では ANG の核内移行が認められた。

VEGF-C 添加群では ANG の核内移行は認められなかった。(図 6)

5. ANG がリンパ管内皮細胞のリボソーム形成能に与える影響

HMVEC-dLy を用いて AgNOR 染色法でリボソーム形成能を検討した。ANG 添加群では新生児および成人由来のいずれの細胞においても、AgNOR 陽性数が有意に増加した。また VEGF-C 添加群および ANG/VEGF-C 添加群でも AgNOR 陽性数が有意に増加しており、リボソーム形成能が有意に促進された。(図 7)

6. ANG がマウスリンパ浮腫モデルに与える影響

尾に形成された浮腫組織の最大直径を、経時的に計測した。投与後 10 日目から、ANG 投与群、VEGF-C 投与群および ANG/VEGF-C 投与群では対照群と比

較して浮腫の形成が有意に抑制された。計測中は体重変化に有意差は認められなかった。(図 8)

7. 免疫組織化学染色法

浮腫組織のリンパ管新生について免疫組織化学的に検討した。LYVE-1 はリンパ管内皮細胞上のヒアルロン酸受容体として同定された内在性膜糖タンパクであり、リンパ管内皮細胞マーカーとして用いられる。ANG 投与群、VEGF-C 投与群および ANG/VEGF-C 投与群ではリンパ管新生が有意に促進された。ANG/VEGF-C 投与群では ANG 投与群および VEGF-C 投与群と比較してリンパ管新生が有意に促進された。また CD31 は I 型膜貫通型糖タンパクで、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する細胞表面受容体であり、リンパ管内皮細胞表面および血管内皮細胞表面に集中して発現している。ANG 投与群と ANG/VEGF-C 投与群ではリンパ管新生および血管新生が有意に促進された。(図 9)

考 察

ANG は 1985 年に大腸癌細胞株の培養液中から血管新生因子として発見され

た¹¹⁾。そのため血管新生において ANG が重要であることは今まで詳細に研究されてきた。しかし、そのリンパ管新生に与える影響については、全く不明であった。

本研究では、ANG は新生児および成人由来 HMVEC-dLy において、増殖能、遊走能および運動能を促進した。ANG 受容体は、血管内皮細胞表面に存在を確認され、質量が 170kDa であることは明らかとなっているが、構造は全く不明である¹⁶⁾。また血管内皮細胞の ANG 受容体の発現はその細胞密度に最も依存していると報告されている¹⁶⁾。本研究で用いた HMVEC-dLy に対して ANG は経時的に増殖能を促進し、その細胞動態に影響を与えたことから、リンパ管内皮細胞の細胞表面にも受容体が存在することが示唆された。

ANG はヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells : HUVEC) において、受容体に結合後にシグナル伝達因子である ERK と AKT をリン酸化することが報告されている^{12,13)}。HMVEC-dLy でも ANG の刺激により、ERK と AKT がリン酸化された。また新生児由来の細胞は、成人由来の細胞と比較して早期にシグナル伝達因子がリン酸化された。血管内皮細胞において、これらのシグナル伝達因子の活性化は細胞増殖や血管新生に必要である。リンパ管新生においてもこれらのシグナル伝達因子の活性化が重要な役割を果

たしている可能性がある。

ANG はシグナル伝達因子を活性化させると同時に、ANG 自体も直接に核に移行する^{12,13)}。核内移行した ANG は核小体を集積し、rDNA のプロモーター領域に結合し、rRNA の転写を促進する^{14,17,18)}。細胞増殖の速度は、増殖するために必要なタンパクを細胞内で合成する速度と比例している。タンパク合成はリボソーム合成によって厳密に制御されている。リボソーム合成の律速段階となっているのが rRNA 転写である。ANG の細胞増殖促進作用は、この rRNA 転写を促進することによる。

ANG が rRNA 転写を促進するには、核に移行することが必須である。アミノグリコシド系抗生物質ネオマイシンで ANG の核内移行を阻害すると血管新生が抑制される¹⁹⁾。線維芽細胞は ANG を分泌していることが報告されているが、ANG の核内移行は確認できず、増殖能も促進されない^{20,21)}。今回、HMVEC-dLy において ANG の細胞内局在を検討したところ核内に存在していた。また ANG によってリボソーム合成が促進されていた。これらのことから ANG はリンパ管内皮細胞に直接的に作用し細胞増殖を促進していると考えられる。

ANG 以外の血管新生因子である bFGF (basic fibroblast growth factor) や VEGF による血管新生において、ANG は血管内皮細胞の核内に移行し rRNA

の転写を促進する¹⁴⁾。また ANG 発現を阻害すると、bFGF や VEGF による血管新生は阻害される¹⁴⁾。つまり ANG の促進する rRNA の転写は、血管新生において必須である。本検討では、VEGF-C の刺激では ANG の核内移行は認めなかった。リンパ管新生においては ANG の核内移行と rRNA 転写の促進は必須ではなく、他の増殖因子が rRNA 転写を促進している可能性がある。bFGF による刺激によって線維芽細胞の細胞増殖は促進されるが、前述のように ANG は核内に移行しないのと同様で、ANG の促進する rRNA 転写が細胞増殖に果たす役割は、細胞種によって異なっているかもしれない。しかし ANG の核内移行は細胞密度に逆相関しており、細胞密度が疎な状態で促進され、密になると抑制される²²⁾。ANG の核内移行はこのように細胞密度によって厳密に制御されており、また非常に短時間で起こるので、細胞内局在の観察方法や細胞の培養条件によっては観察できない可能性もあり、今後さらなる詳細な検討が必要と考えられる²²⁾。

ANG による増殖能、遊走能および運動能の促進効果は、VEGF-C よりも弱く、また VEGF-C との相乗効果を認めなかった。一方、管腔形成能やリンパ浮腫動物モデルにおいては VEGF-C との相乗効果を認めた。ANG は細胞表面の α 平滑筋アクチンと複合体を形成し、その ANG アクチン複合体は組織プラスミノー

ゲン活性化因子を活性化し、細胞外基質の分解および浸潤能や遊走能を促進する^{23,24}。上記のような VEGF-C にはない ANG の作用によって、ANG と VEGF-C の相乗効果が *in vivo* のみに生じた可能性があると考えられた。LYVE-1 はリンパ管内皮細胞に特異的なマーカーであり、CD31 はリンパ管内皮細胞および血管内皮細胞に発現する。リンパ浮腫動物モデルにおいては VEGF-C よりも ANG の方が浮腫形成の抑制が良好であった。ANG 投与群ではリンパ管密度と血管密度がともに増加しており、そのため浮腫軽減の効果がより強かったと考えられた。

本研究では、ANG 投与がリンパ管新生を促進することで、リンパ浮腫に対する新規治療法となる可能性を見出した。しかし ANG 発現は、リンパ行性に転移を認める乳癌、前立腺癌、頭頸部癌などにおいて亢進していることが報告されている^{25,26,27}。将来的に、これらの癌治療後のリンパ浮腫に ANG を応用する場合にはリンパ節転移を促進する危険性があるため、担癌でないことを十分に確認する必要がある。また前立腺癌動物モデルにおいて抗 ANG 中和抗体やアンチセンスを作用させると、リンパ節転移が抑制されることが報告されている²⁸。本研究で得られた知見は、癌リンパ節転移に関する基礎的研究へも発展が可能と考えられた。

まとめ

血管新生因子である ANG は、リンパ管内皮細胞の増殖能，遊走能，運動能および管腔形成能を促進した。ANG はリンパ管内皮細胞上の受容体に結合すると ERK や AKT のようなセカンドメッセンジャーを活性化し，また ANG 自体は核内移行しリボソーム形成能を促進した。In vivo において ANG はリンパ浮腫形成の抑制を示し，新規リンパ浮腫治療薬の候補となりうると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり，本研究を行う貴重な機会を与えていただき，終始御懇篤なる御指導と御高閲を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔顎顔面外科学分野，佐々木朗教授に深甚なる感謝の意を表します。また，本研究の遂行に際し，御指導，御協力いただきました岡山大学病院口腔外科（病態系），伊原木聰一郎博士に心から感謝いたします。さらに，本研究を進めるにあたり様々な面で御配慮，御援助，御助言いただきました岡山大学大学院医歯薬学総

合研究科口腔顎顔面外科学分野および岡山大学病院口腔外科（病態系）の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Alitalo, K., Tammela, T. and Petrova, T.V. : Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*, **438**, 946-953, 2005.
- 2) Olszewski, W.L. : Clinical picture of lymphedema. *Lymph Stasis : Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment*, 347, 1991.
- 3) Deng, J., Murphy, B.A., Dietrich, M.S., Wells, N., Wallston, K.A., Sinard, R.J., Cmelak, A.J., Gilbert, J. and Ridner, S.H. : Impact of secondary lymphedema after head and neck cancer treatment on symptoms, functional status, and quality of life. *Head and Neck*, **438**, 1026-1035, 2013.
- 4) 上山武史：リンパ浮腫治療に対する社会認識の現状と今後の課題。リンパ浮腫診療の実際-現状と展望。分光堂，東京，2003，129-135頁。
- 5) Warren, A.G., Brorson, H., Borud, L.J. and Slavin, S.A. : Lymphedema : a

- comprehensive review. *Ann. Plast. Surg.*, **59**, 464-472, 2007.
- 6) 廣田彰男：リンパ動態学からみたリンパ浮腫. 脈管学, **48**, 159-165, 2008.
- 7) 伊原木聰一郎：リンパ管新生の分子機構とリンパ浮腫. 上原生命科団研報, **26**, 1-6, 2012.
- 8) 小川佳宏：リンパ浮腫の内科的治療の最近の進歩. 脈管学, **48**, 167-172, 2008.
- 9) 光嶋 勲：リンパ浮腫の外科的治療の最近の進歩. 脈管学, **48**, 173-178, 2008.
- 10) Makinen, T., Veikkola, T., Mustjoki, S., Karpanen, T., Catimel, B., Nice, E.C., Wise, L., Mercer, A., Kowalski, H., Kerjaschki, D., Stacker, S.A., Achen, M.G. and Alitalo, K. : Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J.*, **20**, 4762-4773, 2001.
- 11) Fett, J.W., Strydom, D.J., Lobb, R.R., Alderman, E.M., Bethune, J.L., Riordan, J.F. and Vallee, B.L. : Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochem. J.*, **24**, 5480-5486, 1985.
- 12) Liu, S., Yu, D., Xu, Z.P., Riordan, J.F. and Hu, G.F. : Angiogenin activates ERK1/2 in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res.*

- Commun.*, 287, 305-310, 2001.
- 13) Kim, H.M., Kang, D.K., Kim, H.Y., Kang, S.S. and Chang, S.I. :
Angiogenin-induced protein kinase B/Akt activation is necessary for
angiogenesis but is independent of nuclear translocation of angiogenin in
HUVE cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 352, 509-513, 2007.
- 14) Kishimoto, K., Liu, S., Tsuji, T., Olson, K. and Hu, G.F. : Endogenous
angiogenin in endothelial cells is a general requirement for cell
proliferation and angiogenesis. *Oncogene*, 24, 445-456, 2005.
- 15) Boardman, K.C. and Swartz, M.A. : Interstitial flow as a guide for
lymphangiogenesis. *Circ. Res.*, 92, 801-808, 2003.
- 16) Hu, G.F., Riordan, J.F. and Vallee, B.L. : A putative angiogenin receptor
in angiogenin-responsive human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.
U S A*, 94, 2204-2209, 1997.
- 17) Xu, Z.P., Tsuji, T., Riordan, J.F. and Hu, G.F. : The nuclear function of
angiogenin in endothelial cells is related to rRNA production. *Biochem.
Biophys. Res. Commun.*, 294, 287-292, 2002.
- 18) Xu, Z.P., Tsuji, T., Riordan, J.F. and Hu, G.F. : Identification and

- characterization of an angiogenin-binding DNA sequence that stimulates luciferase reporter gene expression. *Biochemistry*, **42**, 121-128, 2003.
- 19)Hu, G.F. : Neomycin inhibits angiogenin-induced angiogenesis. *Biochemistry*, **95**, 9791-9795, 1998.
- 20)Moenner, M., Gusse, M., Hatzi, E. and Badet, J. : The widespread expression of angiogenin in different human cells suggests a biological function not only related to angiogenesis. *FEBS J.*, **226**, 483-490, 1994.
- 21)Moroianu, J. and Riordan, J.F. : Nuclear translocation of angiogenin in proliferating endothelial cells is essential to its angiogenic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**, 1677-1681, 1994.
- 22)Hu, G.F., Xu, C.J. and Riordan, J.F. : Human angiogenin is rapidly translocated to the nucleus of human umbilical vein endothelial cells and binds to DNA. *J. Cell Biochem.*, **76**, 452-462, 2000.
- 23)Hu, G.F., Strydom, D.J., Fett, J.W., Riordan, J.F. and Vallee, B.L. : Actin is a binding protein for angiogenin. *Biochemistry*, **90**, 1217-1221, 1993.
- 24)Hu, G.F. and Riordan, J.F. : Angiogenin enhances actin acceleration of plasminogen activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **197**, 682-687,

- 1993.
- 25) Montero, S., Guzman, C., Cortes-Funes, H. and Colomer, R. : Angiogenin expression and prognosis in primary breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 4, 2161-2168, 1998.
- 26) Katona, T.N., Neubauer, B.L., Iversen, P.W., Zhang, S., Baldrige, L.A. and Cheng, L. : Elevated expression of angiogenin in prostate cancer and its precursors. *Clin. Cancer Res.*, 11, 8358-8363, 2005.
- 27) Marioni, G., Marino, F., Blandamura, S., D'Alessandro, E., Giacomelli, L., Guzzardo, V., Lionello, M., De Filippis, C. and Staffieri, A. : Neoangiogenesis in laryngeal carcinoma : angiogenin and CD105 expression is related to carcinoma recurrence rate and disease-free survival. *Histopathology*, 57, 535-543, 2010.
- 28) Olson, K.A., Byers, H.R., Key, M.E. and Fett, J.W. : Inhibition of prostate carcinoma establishment and metastatic growth in mice by an antiangiogenin monoclonal antibody. *Int. J. Cancer*, 98, 923-929, 2002.

表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 腫瘍制御学講座

口腔顎顔面外科学分野 (主任：佐々木 朗教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

第 57 回日本口腔外科学会総会・学術集会 (平成 24 年 10 月, 横浜)