

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	腫瘍制御科学領域顎口腔腫瘍病態学教育研究分野 氏名 成田 紀彦
<p>(論文題目)</p> <p>Production of Growth-related Oncogene Protein-<math>\alpha</math> in A Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Line Stimulated with Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math>: Role in Tumor Angiogenesis and Tumor Proliferation</p> <p>(培養ヒト口腔扁平上皮癌細胞における TNF-<math>\alpha</math> 刺激依存的な GRO-<math>\alpha</math> の誘導 : GRO-<math>\alpha</math> による血管新生作用と腫瘍増殖作用について)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p><u>目的</u></p> <p>Growth-related Oncogene Protein-<math>\alpha</math> (GRO-<math>\alpha</math>) は、CXC ケモカインファミリーに属し、好中球走化性因子として知られている他、血管新生能など多様な機能を有することが明らかとなっている。一方、口腔粘膜上皮において、腫瘍壊死因子 (TNF-<math>\alpha</math>) は GRO-<math>\alpha</math> を誘導すると報告されているが、GRO-<math>\alpha</math> の口腔扁平上皮癌における役割は不明である。そこで、本研究では口腔扁平上皮癌における TNF-<math>\alpha</math> 刺激で誘導される GRO-<math>\alpha</math> を介した血管新生や腫瘍増殖について検討した。</p> <p><u>方法</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞として KOSC-2、HSC-3 および CA9-22 の 3 種類の細胞株を用いた。各々の培養系に TNF-<math>\alpha</math> (10 ng/mL) を添加し、約 80% のコンフルエンスに達した時に実験に供した。</li> <li>2) GRO-<math>\alpha</math> mRNA の発現を検討するため、RNeasy を用い各々の培養細胞から Total RNA を抽出し、一本鎖 cDNA は M-MuLV 逆転写酵素を用いて合成した。GRO-<math>\alpha</math> および 18S rRNA 発現の定量分析には CFX96 リアルタイム PCR システム (Bio-Rad) を使用し、増幅は iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) を用いた。</li> <li>3) TNF-<math>\alpha</math> 刺激後の KOSC-2 細胞を 2 回洗浄して RPMI-HSA で 2 時間培養し、培養上清中の GRO-<math>\alpha</math> タンパクを ELISA 法により測定した。</li> <li>4) 内皮細胞の走化性に対する GRO-<math>\alpha</math> の作用を検討するために、市販のヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) を用い、2% FBS、ヒト組み換え型上皮成長因子 (r(h)EGF)、ヒト組み換え型塩基性線維芽細胞増殖因子 (r(h)bFGF)、ヒドロコルチゾン、ヘパリンを含む Humedia EB-2 で培養した。</li> <li>5) 内皮細胞の走化性は 24 穴走化性チャンバーを用い計測した。TNF-<math>\alpha</math> 刺激後 4 時間培養した KOSC-2 細胞を、r(h)GRO-<math>\alpha</math> (1 ng/mL)、血管内皮増殖因子 (VEGF) 10 pg/mL を含む M199-HSA 馴化培養液に移し 2 時間培養した。この培養液 100 <math>\mu</math>L で下部チャンバーを満たし、上部チャンバーを 100 <math>\mu</math>L HUVEC 懸濁液 (<math>1 \times 10^5</math> cells/mL) で満たした。37°C で 4 時間培養後、各チャンバーの膜をメタノールで固定後、ギムザ染色し顕微鏡下に遊走細胞数を計測した。対照は、r(h)GRO-<math>\alpha</math> と VEGF を含まない培養液とし、実験条件に応じて抗 GRO-<math>\alpha</math> 中和抗体を添加した。</li> <li>6) Wound assay として、KOSC-2 細胞を RPMI-1640 中で培養し、コンフルエンスに達した単層をメスとラバーポリスマンで傷害した後、20mM の PBS (pH 7.4) で洗浄した。次に TNF-<math>\alpha</math> (10 ng/mL) を添加し馴化培養液で 4 時間培養した後、10% ホルムアルデヒドで細胞を固定し、顕微鏡下で写真撮影した。対照は、TNF-<math>\alpha</math> を含まない培養</li> </ol>	

液を用いた場合とし、r(h)GRO- $\alpha$  (1 ng/mL) を含む培養液を用いた場合と併せて同様に Wound assay を行った。

7) 内皮細胞の走化性に関するデータについては一元配置分散分析 (ANOVA) を用いて比較し、多重比較のため Tukey's post-hoc 解析を行い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

#### 結果

- 1) KOSC-2 細胞と HSC-3 細胞の GRO- $\alpha$  mRNA 発現は、TNF- $\alpha$  刺激直後から認められ、いずれの細胞も 4 時間で最大に達した。KOSC-2 の GRO- $\alpha$  mRNA 発現は HSC-3 細胞に比べ非常に大きく、Ca9-22 細胞では GRO- $\alpha$  mRNA の発現はほとんど認められなかった。また、KOSC-2 細胞からの GRO- $\alpha$  タンパク産生も同様の経過を示した。
- 2) TNF- $\alpha$  刺激による KOSC-2 細胞の GRO- $\alpha$  mRNA 発現は、TNF- $\alpha$  濃度依存性に増大した。また、TNF- $\alpha$  は GRO- $\alpha$  タンパク産生を誘導し、10 ng/mL で最大の効果を示した。
- 3) HUVECs の走化性は少量の VEGF で誘導され、TNF- $\alpha$  処理された KOSC-2 細胞の馴化培養液は、有意に HUVECs の走化性を増強した。また、抗 GRO- $\alpha$  中和抗体の添加実験により、GRO- $\alpha$  も HUVECs の走化性を増強することが明らかになった。
- 4) Wound assay の結果、TNF- $\alpha$  処理 KOSC-2 細胞は、培養 20 時間後には傷害部位に遊走し、対照に比べて速かった。また、r(h)GRO- $\alpha$  も KOSC-2 細胞の遊走促進作用を示した。

#### 考察

TNF- $\alpha$  は、当初、腫瘍細胞壊死誘導因子とされたが、条件によっては「腫瘍細胞増殖因子」として機能する。TNF- $\alpha$  は、AP-1 及び NF- $\kappa$ B などの転写因子活性化により種々のケモカインを誘導する。本研究により、TNF- $\alpha$  は KOSC-2 細胞の GRO- $\alpha$  発現を誘導することが明らかとなった。GRO- $\alpha$  は、内皮細胞、気管支上皮、マクロファージおよび多形核好中球を含む種々のタイプの細胞で発現することが知られており、口腔ケラチノサイトでは TNF- $\alpha$  により GRO- $\alpha$  が発現すると報告されている。しかし、TNF- $\alpha$  刺激による GRO- $\alpha$  の発現が CA9-22 では認められなかったのに対し、KOSC-2 細胞では強く誘導されたことから、GRO- $\alpha$  の発現は個々の口腔扁平上皮癌細胞に依存していることが示唆された。

GRO- $\alpha$  は、好中球走化性の活性化により炎症反応において重要な役割を担うが、その発現が多彩であることから、走化性以外の生物学的事象にも関与するとされている。また、GRO- $\alpha$  のような CXC ケモカインは、血管新生抑制機能を示すが、一方では CXC ケモカインの一部は、血管新生因子として作用することも証明されている。本研究では、TNF- $\alpha$  処理 KOSC-2 細胞の馴化培養液には GRO- $\alpha$  タンパク質が相当量含まれ、内皮細胞の遊走を増強すること、r(h)GRO- $\alpha$  も内皮細胞の遊走を増強することが明らかにされた。TNF- $\alpha$  処理 KOSC-2 細胞の馴化培養液には、IL-8、ENA-78、VEGF といった内皮細胞走化性因子が多く含まれているが、GRO- $\alpha$  も一定程度の活性を有することが示唆された。元来、GRO- $\alpha$  は悪性腫瘍細胞の増殖促進因子とされているが、Wound assay により、GRO- $\alpha$  は KOSC-2 細胞の増殖を促進することが示され、TNF- $\alpha$  は KOSC-2 細胞の増殖に関わる自己分泌調節機構を制御している可能性が示唆された。

以上のことから、TNF- $\alpha$  は、KOSC-2 細胞による GRO- $\alpha$  の分泌を刺激し、血管新生および腫瘍細胞増殖を介して腫瘍の増大を制御するものと思われた。