

Title	Antisense to Cyclin D1 Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor-Stimulated Growth of Vascular Endothelial Cells : Implication of Tumor Vascularization
Author(s)	安井, 昌義
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47360
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	やす い まさ よし 安 井 昌 義
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 20973 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学 位 論 文 名	Antisense to Cyclin D1 Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor-Stimulated Growth of Vascular Endothelial Cells : Implication of Tumor Vascularization (サイクリン D1 アンチセンスは VEGF 刺激による血管内皮細胞の増殖を抑制する ; 特に腫瘍血管新生との関わりについて。)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 門 田 守 人 (副査) 教 授 野 口 眞 三 郎 教 授 金 倉 謙

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

近年、頭頸部癌・大腸癌・胃癌細胞株においてサイクリン D1 アンチセンスを投与することにより、ヌードマウス皮下腫瘍の発生を抑制したり、抗癌剤感受性を上昇させるなどの抗腫瘍効果が報告されているが、サイクリン D1 が腫瘍血管新生にどのような影響を与えるかについては知られていない。本研究ではサイクリン D1 が血管内皮細胞に及ぼす直接的な抗血管作用と共に、腫瘍の産生する血管新生促進因子である VEGF の発現制御におけるサイクリン D1 の役割について明らかにすることを目的とした。

[方法]

- (1) サイクリン D1 の発現を抑制するために、サイクリン D1 遺伝子をアンチセンス方向に挿入した遺伝子組み換えアデノウイルス液を作成した。毒性のない濃度を細胞ごとに確認し、western blot 法により感染細胞でのサイクリン D1 蛋白発現の減少を確認した。
- (2) 大腸癌細胞株 DLD1、HCT116 皮下移植モデルの作成
DLD1、HCT116 細胞株をヌードマウスの皮下に移植し、皮下腫瘍モデルを作製した。腫瘍径が 6 mm になった段階で組み換えアデノウイルスを 3 回腫瘍内に局注し、サイクリン D1 アンチセンスによる効果について検討した。
- (3) マトリゲルによる in vivo 血管新生の評価
サイクリン D1 アンチセンス産生ウイルスを含むマトリゲルをヌードマウスの腹部皮下に注射し、7 日目に切除して、マトリゲル内の新生血管を測定した。
- (4) HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) に対する作用
VEGF により活性化された HUVEC の二次元増殖 (BrdU assay) と in vitro tube formation がサイクリン D1 アンチセンスにより抑制できるか検討した。
- (5) サイクリン D1 が VEGF 制御機構に果たす役割についての検討

大腸癌細胞株を用いて siRNA (small interfering RNA) 法によりサイクリン D1 発現を阻害した。その際、VEGF 発現の変化と VEGF 遺伝子の上流の転写因子である STAT3 に着目し VEGF 制御機構について検討した。

[成績]

(1-2) 大腸癌細胞株 DLD1、HCT116 皮下移植モデル

サイクリン D1 アンチセンスは HCT116、DLD1 のいずれの大腸癌細胞株でもサイクリン D1 の発現を低下させ、マウス皮下腫瘍モデルにおいては、腫瘍内血管密度の低下と腫瘍増殖抑制を認めた。

(3) サイクリン D1 アンチセンスによりマトリゲル内の新生血管が抑制された。また血管壁は脆弱となり微小出血を認めた。

(4) VEGF 添加により HUVEC 細胞の増殖能は増加し、サイクリン D1、サイクリン A の発現亢進がみられた。サイクリン D1 アンチセンスは VEGF 添加時の HUVEC の増殖を有意に抑制し、in vitro tube formation も同様に抑制した。

(5) siRNA による cyclin D1 の発現減少とともに、DLD1 細胞株では VEGF 蛋白、および RNA の発現低下がみられた。DLD1 ではサイクリン D1 アンチセンスが STAT3 転写因子を不活化し、VEGF プロモーター活性の低下を認めた。一方、HCT116 細胞株ではサイクリン D1 アンチセンスにより VEGF の変化を認めずサイクリン D1 阻害と STAT3 阻害の両者によって初めて VEGF 発現の抑制が認められた。

[総括]

サイクリン D1 阻害により VEGF の存在下であっても血管内皮細胞の増殖・管腔形成は抑制され、直接的な抗血管作用が証明された。さらにサイクリン D1 は腫瘍細胞の産生する VEGF の発現維持・調整に働くことが明らかとなり、癌細胞と腫瘍血管を含む微小環境を標的としたサイクリン D1 アンチセンス療法の可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

近年、頭頸部癌・大腸癌・胃癌細胞株においてサイクリン D1 アンチセンスを投与することにより、ヌードマウス皮下腫瘍の発生を抑制する等の抗腫瘍効果が報告されているが、サイクリン D1 (CyD1) 抑制が腫瘍血管新生にどのような影響を与えるかについては知られていない。本研究では CyD1 抑制が血管内皮細胞に及ぼす直接的な抗血管作用と共に、腫瘍の産生する VEGF の発現制御における CyD1 の役割を明らかにすることを目的とした。CyD1 阻害には adenovirus システム及び siRNA 法を用いた。アンチセンス CyD1 により大腸がん細胞 HCT116、DLD1 によるマウス皮下腫瘍の血管新生と腫瘍増殖が抑制された。siRNA による CyD1 阻害により DLD1 細胞の STAT3 転写因子の不活化と VEGF プロモーター活性の低下、VEGF 蛋白・RNA の減少が認められた。HCT116 細胞では CyD1 と STAT3 の両者の阻害により VEGF 発現が減少した。VEGF により活性化された血管内皮細胞 (HUVEC) の増殖は CyD1 阻害により抑制され、in vitro tube formation および in vivo matrigel angiogenesis も抑制された。

本研究により、CyD1 は腫瘍細胞の産生する VEGF 発現の維持・調整に働くことが明らかとなり、癌細胞と腫瘍血管を含む微小環境を標的としたサイクリン D1 アンチセンス療法の可能性が示唆されており、学位の授与に値すると考えられる。