

肺癌切除例における Vasohibin ファミリー遺伝子発現の 免疫組織学的研究

[1] 組織

代表者：樋田 泰浩
(北海道大学病院 循環器・呼吸器外科)
対応者：佐藤 靖史
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：西原 広史 (北海道大学医学研究科)
樋田 京子 (北海道大学歯学部)

研究費：物件費30万円

[2] 研究経過

Vasohibin-1 は血管内皮増殖因子 **Vascular endothelial growth factor (VEGF)** によって血管内皮細胞で発現が誘導される遺伝子として同定され、血管新生のネガティブフィードバック機構で重要な働きを持つことが *in vitro* 実験や動物実験で見出され、その機序が研究されてきた。腫瘍血管新生を抑制することから副作用の少ない治療分子になることが期待されている。また Vasohibin-1 との相同性から発見された Vasohibin-2 は単核球やがん細胞に発現して血管新生を亢進させることが見出されており、がんの治療標的や診断マーカーになる可能性がある。

これまでの研究は主に血管内皮細胞を用いた *in vitro* 実験とマウスを用いた動物実験から得られた知見で有り、今後、臨床的な意義を確認するために様々なヒトの臨床がん検体における発現や、発現と悪性度、病期、無再発生存気管全生存期間との関係が重要になると考えられる。現在、死亡患者数の最も多い肺癌における Vasohibin ファミリーの発現状況と臨床病理学的因子の関係を検討するために本研究を計画した。

北海道大学内の研究打ち合わせは毎月第2木曜日に行った。研究対応者である佐藤靖史先生との打ち合わせは電子メールで定期的に行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

<1. ポジティブコントロールの設定>

まず、Vasohibin-1, -2 のポジティブコントロールを探すために PCR プライマーを設計した。それぞれ血管内皮細胞と単核球での発現を検出できることを確認した。

次にヒトがん細胞細胞株6株と正常細胞4種における vasohibin-1, -2 の発現を検討した。以下の悪性黒色腫細胞株 A375, A375SM, 腎細胞がん OSRC2, 口腔扁平上皮癌 HSC3, 皮膚線維芽細胞 BJ6, 皮膚血管内皮細胞 HMVEC, 膀胱癌細胞 Miapaca2, 上皮癌細胞 A431, 胎児腎細胞 HEK293T, 末梢単核球細胞 PBMC を使用した。PCR の結果、Vasohibin-1 のポジティブコントロールは HMVEC, ネガティブコントロールは OSRC2 が、Vasohibin-2 のポジティブコントロールは HEK293T, ネガティブコントロールは A375 が適していることが明らかになった。

<2. 肺癌細胞株における Vasohibin 発現の検討>

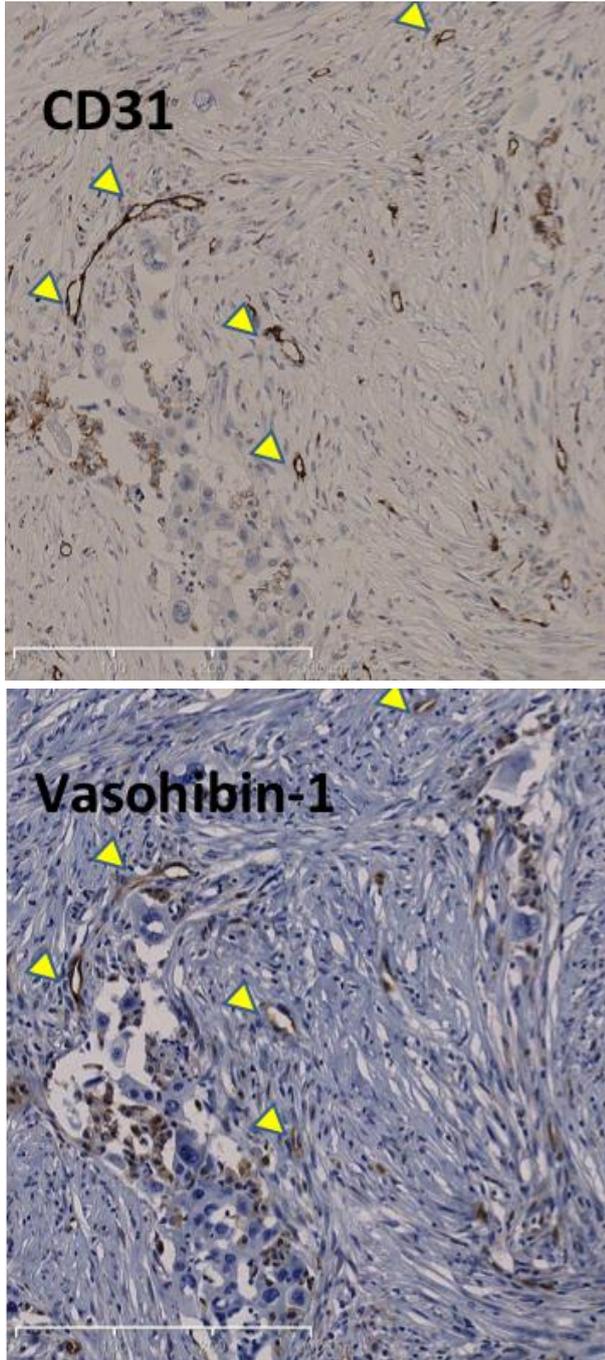
次に肺癌細胞株12株における発現をPCRで検討した。腺癌細胞5株 (A-549, ABC-1, PC-3, NCI-H23, NCI-H522), 扁平上皮癌3株 (LC-1/sq, EBC-1, NCI-H226), 巨細胞癌株 (Lu99), 大細胞癌株 (NCI-H460), 非小細胞癌株 (NCI-H1299), 小細胞癌株 (DMS-114) を用いた。

PCR で腺癌 NCI-H522 と小細胞癌 DMS-114 で Vasohibin-1, -2 のいずれも高発現を認めた。

<3. 肺癌臨床検体における Vasohibin-1 の発現>

免疫染色プロトコールの評価のため、肺癌切除検体パラフィン包埋切片薄切片の Vasohibin-1 染色を行った。腫瘍内の血管内皮細胞が染色される症例とされない症例がみられた。非癌部肺組織では血管内皮に Vasohibin-1 陽性部はなかった。

【Vasohibin-1 陽性肺癌】



Vasohibin-1 染色面積と正の相関を示した。浸潤、進展形式の検討では膨張性進展を呈する症例では Vasohibin-1 の発現が低く、浸潤性進展する症例では高発現が認められた。

(3-2) 波及効果と発展性など

Vasohibin-1 については肺癌，口腔扁平上皮癌における発現が確認された。臨床的な意義，治療分子としての可能性については症例を増やして検討中であり，いわゆる *aero digestive tract cancer* の治療分子としての適格性が示されることが期待される。Vasohibin-2 については新しく作成されたモノクローナル抗体で染色中であるが，すでに卵巣癌などで腫瘍の悪性度との相関が報告されており，肺癌においても治療分子標的であることが示されることが期待される。

[4] 成果資料

本共同研究による論文は未発表であるが，肺癌における Vasohibin-1 と-2 の臨床病理学意義に関する論文2編を執筆予定である。

口腔扁平上皮癌における論文も準備中である。

<4.肺癌切除症例の Tissue microarray の作成>

1996年から2005年に北海道大学病院呼吸器外科で切除した肺癌症例240例のホルマリン固定パラフィン包埋切片から Tissue microarray を作成した。腺癌158例，扁平上皮癌68例，その他の組織型14例。現在，染色・解析中である。

<5. 口腔扁平上皮癌切除例の Vasohibin-1 発現>

口腔粘膜内の血管内皮細胞は Vasohibin-1 陰性であったが，口腔扁平上皮癌組織内では陽性症例が多く，micro vessel density count を行った14例では