

2002年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

— 在留中国人研究者研究助成 —

2003年3月12日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 汪 華 
所属機関名 広島大学歯学研究科
指導責任者氏名 岡本哲治
職 名 教 授
所 在 地 〒734-8553 広島市南区霞 1-2-3
電 話 082-257-5667 内線

1. 研究テーマ

アミロイドン：その受容体Tie-2を標的とした唾液腺腺癌の血管新生抑制療法

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表 有 ・ 無 (学会名・演題)

日本分子生物学会・第2回春季シンポジウム
静脈奇形における Tie-2 遺伝子変異とその機能解析

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

日本口腔組織培養学会誌
散発性血管腫における Tie-2 遺伝子変異とそのマウスモデルの作成

アンジオポエチンとその受容体 Tie-2 を標的とした唾液腺腺癌の血管新生制御療法

研究者氏名 汪 華
中国所属機関 中国第二軍医大学附属長海病院口腔科
日本研究機関 広島大学歯学研究科第一口腔外科
指導責任者 教授 岡本 哲治
共同研究者名 張 雁, 重森 和子, 山本 哲彰, 岡本 康正

要 旨

固形腫瘍の増大には、栄養と酸素の供給のために、血管新生が必要であることが知られている。この血管新生において、我々は血管内皮細胞に発現する受容体型チロシンキナーゼであるTie-2受容体と同受容体に結合する アンジオポエチン (Ang) が重要な役割を示すことを報告してきた。本研究では、唾液腺腺癌におけるAng/Tie-2系を標的とした血管新生制御療法の開発することを目的に、以下の研究を行った。

Key Words Angiogenesis, Salivary carcinoma, Tie-2, Angiopoietin-1 and Angiopoietin-2

一、 ヒト唾液腺および唾液腺腺癌におけるアンジオポエチン とその受容体 Tie-2 の機能解析

緒 言：

固形腫瘍の増大には、栄養と酸素の供給のために、血管新生が必要であることが知られている。アンジオポエチン (Ang) の受容体であるTie-2は血管内皮細胞において特異的に発現するチロシンキナーゼ型受容体であり、血管新生に関与していると考えられている (1)。我々は、すでにTie-2遺伝子のチロシンキナーゼ領域の変異は、そのチロシンキナーゼの恒常的活性化、MEKおよびSTAT3活性の亢進を誘導し、静脈奇形を引き起こすことを報告した (2, 3)。

一方、唾液腺の管腔形成は発生学的に血管形成機構と共通点が多く、Ang-1/Tie-2のシグナルは唾液腺においても重要な働きをしている可能性が考えられた。そこで本研究では、ヒト正常唾液腺、唾液腺腺癌および腺様嚢胞癌におけるAng-1, Ang-2, Tie-2 mRNA および蛋白質の発現について検討した。またAng-1の唾液腺上皮細胞の増殖およびTie-2関連シグナルに対する影響についても検討した。

材料と方法：

1. 正常唾液腺および唾液腺由来腺癌における Ang-1, -2 および Tie-2 の発現を免疫組織染色にて検討した。

2. Tie-2 mRNA の発現を解析するため、Tie-2 チロシンキナーゼ領域にプライマーを設計し、cRNA プローブを作成後、正常唾液腺上皮細胞 (SMG)、唾液腺腺癌細胞 (HSG, HSY) および腺様嚢胞癌 (ACC) から

抽出した total RNA を用いて Tie-2 mRNA の発現を Northern hybridization にて解析した。

3. ヒト正常唾液腺組織および腺様嚢胞癌組織における Tie-2 の発現を in situ hybridization および免疫組織学的に検討した。

4. pGEX 発現系を用い Tie-2 のリガントである Ang-1 の遺伝子組換え蛋白を作成し、Ang-1 の唾液腺上皮細胞および血管内皮細胞 (MSS) に対する影響を検討した。

5. Ang-1 刺激による唾液腺上皮細胞および血管内皮細胞における Tie-2 チロシンキナーゼのリン酸化活性、MAP キナーゼ (mitogen activated protein kinase) および STAT (signal transducer and activator of transcription) 系シグナルについて検討した。

結果:

1. Tie-2 mRNA の発現を Northern hybridization にて解析した結果、正常唾液腺上皮細胞 SMG、腺癌細胞 HSG, HSY, ACC の全ての細胞で 4.3 Kb Tie-2 mRNA を発現していることが明らかとなった。

2. 正常唾液腺組織における Tie-2 mRNA および蛋白質の発現を in situ hybridization および免疫組織学的に検討した結果、正常唾液腺では血管内皮細胞、介在部導管細胞、筋上皮細胞および漿液細胞に Tie-2 の発現を認めた。

3. 正常唾液腺由来上皮細胞 SMG は keratinocyte growth factor (KGF) により、血管内皮細胞 MSS は fibroblast growth factor-2 (FGF-2) により増殖促進されたが、Ang-1 はいずれの細胞の増殖にも影響を示さなかった。

4. Ang-1 刺激により、血管内皮細胞および唾液腺上皮細胞では、Tie-2 チロシンキナーゼ、MEK1/2 および STAT3 のリン酸化活性の亢進を認めた。

考察:

Tie-2 は血管内皮細胞からクローニングされたチロシンキナーゼ型受容体であり、構造的には細胞外に 1 つの免疫グロブリン様のループと epidermal growth factor (EGF) 様の繰り返し配列を持ち、それに続いて細胞膜直上部の・型フィブロネクチン様の 3 回の繰り返し配列へと続く。一回の膜貫通部を持ち、細胞内にはチロシンキナーゼドメインを有する (4)。血管内皮細胞において、Ang-1 は、その細胞増殖を促進しないが、Tie-2 受容体のチロシンキナーゼリン酸化リン酸化活性、MAP キナーゼおよび STAT-3 リン酸化活性化を促進することが報告されている (5, 6)。本研究では、正常唾液腺組織における、ANG-2 および Tie-2 は、血管内皮細胞のみならず腺房細胞および介在部導管細胞において発現されていた。一方、ANG-1 の発現は、筋上皮細胞および間葉系細胞において認められたが、腺房細胞や介在部導管細胞においては認められなかった。さらに、培養ヒト正常唾液腺由来上皮細胞 (SMG) では、Tie-2 および ANG-2 mRNA の発現を認めたが、唾液腺由来腺癌細胞 (HSG) においては ANG-2 mRNA の発現は認めなかった。さらに、Ang-1 刺激より、Tie-2 のチロシンキナーゼのリン酸化、MAP キナーゼおよび STAT-3 リン酸化活性を認め、同細胞は KGF により増殖促進されたが、Ang-1 および FGF-2 は細胞増殖にも影響を認めなかった。

以上の結果から、Tie-2分子は血管内皮細胞のみならず唾液腺上皮細胞においても発現されていること、そして Ang/Tie-2 シグナルは血管新生のみならず唾液腺においても重要な働きをしている可能性が強く考えられた。

参考文献：

1. Hanahan, D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance, *Science*, 277:48-50, 1997.
2. 汪華, 張雁, 岡本哲治：静脈異形成症例の遺伝子診断．治療学, 34: 441-445, 2000.
3. 汪華, 他：静脈奇形におけるEndothelial-specific Receptor Tyrosine Kinase Tie-2 遺伝子の機能解析．口腔組織培養学会誌, 10 (1) :23-24, 2001.
4. Ziegler, S. F. et al. Molecular cloning and characterization of a novel receptor protein tyrosine kinase from human placenta. *Oncogene*, 8:663-670, 1993.
5. Suri, C. et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for Tie2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, 87:1171-1180, 1996.
6. Korpelainen, B. I. et al. Endothelial receptor tyrosine kinases activate the STAT signaling pathway: mutant Tie-2 causing venous malformations signals a distinct STAT activation response. *Oncogene*, 18:1-8, 1999.

二、海綿様血管腫における Tie2 遺伝子変異とその機能解析

結 言：

チロシンキナーゼ型受容体Tie2 (Tyrosine kinase with Ig and EGF homology domain 2) は Angiopoietin-1 (Ang1) およびAng2の受容体であり血管形成に重要な働きをしている^(1,2)。また、Tie2は家族性静脈奇形の責任遺伝子と考えられている⁽³⁾。我々は、海綿様血管腫(静脈奇形)において、Tie2遺伝子のG2646A変異に基づく、ATP結合領域内のGlycineのAspartic Acidへの置換 (^{G833D}Tie2) およびA2659Tに基づくATP結合領域近傍のGlutamineのHistidineへの置換 (^{Q837H}Tie2) が存在すること、そして^{G833D}Tie2は^{Q837H}Tie2と異なり、内皮細胞の増殖能を促進し、海綿様血管腫の術後再発に関与していることを報告した^(4,5)。海綿様血管腫の病態解明が進むことにより、生体における病的血管新生機構の解明、ひいてはその治療法の確立も可能となるものと期待される。そこで本研究では、海綿様血管腫におけるTie2遺伝子の変異とその発症の分子機構についての解析を行った。

材料と方法：

^{G833D}Tie2, ^{Q837H}Tie2および野生型Tie2遺伝子、またはベクターのみをそれぞれ導入した内皮細胞をヌードマウス大腿筋肉に移植し、造腫瘍性を検討した。次に、形成腫瘍の組織像、PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1), Tie2およびVEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) 蛋白の発現を検討した。また、各導入細胞のVEGF mRNAの発現に及ぼすTie2のリガントであるAng1と

Ang2 (Angiopoietin-1, -2) の影響についても検討した。

結果：

1. Tie2のチロシンキナーゼリン酸化活性について検討した結果、野生型Tie2を導入した細胞では、Ang1に依存した活性を認めたが、^{G833D}Tie2 及び^{Q837H}Tie2遺伝子導入した細胞では、Ang1に依存しない恒常的自己リン酸化活性を認めた。一方、Ang2は野生型Tie2を導入した細胞においてTie2のリン酸化活性を抑制したが、^{G833D}Tie2細胞に対してはTie2のリン酸化活性を抑制しなかった。

2. Ang-1の刺激により、すべての細胞においてVEGF mRNAの発現が促進されたが、特に^{G833D}細胞ではVEGF mRNAの発現が著しく促進されることがわかった。Ang-1存在下で、Ang2を添加すると、ベクターのみおよび野生型Tie2を導入した細胞でのVEGF mRNA発現は抑制したが、^{G833D}および^{Q837H}導入細胞では、VEGF mRNAの発現は抑制しなかった。

3. 次に、*In vitro*での増殖能について検討しました。0.5%血清を含む培地で、^{G833D}導入細胞は野生型Tie2導入細胞に比べ、高い増殖能を示した。そこで、同培養条件でのVEGF mRNAの発現を検討した。^{Q837H}、野生型Tie2およびベクターのみを導入した内皮細胞と比較して、^{G833D}導入した内皮細胞ではVEGF mRNAの高発現を認めた。

4. ^{Q837H}Tie2、野生型Tie2およびベクターのみを導入した内皮細胞はヌードマウスにおいて造腫瘍性を示さなかったが、^{G833D}Tie2導入内皮細胞は、移植後3ヶ月以内に腫瘍を形成し、形態的に筋肉内血管腫様の管腔様構造を示した。また、隣接している筋肉にも浸潤していた。^{G833D}Tie2導入内皮細胞移植後5ヶ月の腫瘍では、拡張した管腔形成が観察され、同腫瘍表面は肉眼上青紫色を呈した。

5. 免疫組織学に検討した結果、同腫瘍細胞ではTie2、PECAM-1およびVEGFの高発現を認めた。この腫瘍は^{G833D}Tie2の変異を有するヒト血管腫の組織像に類似していた。

考察：

以上の結果から、Tie2遺伝子の変異の質的差異 (Genotype) は臨床症状 (Phenotype) に密接に関係していること、さらに、Tie2遺伝子の変異に基づく海綿様血管腫の発症の分子機構の一端を明らかにすることが出た。これらは、今後海綿様血管腫の治療法の選択や予後の予知を行う上で非常に有用であると考えられた。

【参考文献】

1. Folkman, J. and D' Amore, P. : Cell, 87:1153-1155, 1996.
2. Suro, C., Jones, P.F., et al: Requisite role of angiopoietin-1 a ligand for the tie-2 receptor during embryonic angiogenesis. Cell, 87:1171-1180, 1996.
3. Viskula, M., Boon, L.M., et al. : Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase tie-2. Cell, 87:1181-1190, 1996.

4. 汪華, 張雁, 岡本哲治: 静脈異形成症例の遺伝子診断. 治療学, 34: 441-445, 2000.
5. 汪華, 張雁, 岡本哲治: 静脈奇形における Endothelial-specific Receptor Tyrosine Kinase Tie-2 遺伝子の機能解析 口腔組織培養学会誌 10 (1) 23~24, 2001.

本研究は2002年5月13-14日「The Molecular Biology Society of Japan, Spring Symposium」にてポスター発表, 2002年11月7日「日本口腔組織培養学会」にて口演発表。

作成日: 2003年2月24日