

緑茶ポリフェノールは腫瘍血管内皮細胞ならびに 血管内皮前駆細胞に直接的な抑制効果を有する

学位論文内容の要旨

お茶は世界中で最も広く嗜好されている飲用物の一つで、緑茶の飲用は動物モデルでいくつかの癌の増殖を抑えることが知られている。

緑茶の成分の中で、抗腫瘍効果に関連がある成分はポリフェノールの一種であるカテキン群である。カテキン群は多様な効果を有する緑茶ポリフェノールで、なかでも、EGCG エガロカテキンガレートは強い生理活性作用を有し、in vitro の系で腫瘍細胞の増殖、浸潤を抑えることが報告されている。また緑茶の飲用については、臨床試験においても胃癌、大腸癌などに対する発ガン抑制効果が報告されている。

緑茶ポリフェノール EGCG の血管新生に対する効果については、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) やヒト微小血管内皮細胞 (HMVEC) において、EGCG による増殖、遊走能の抑制が報告されている。しかしながら、EGCG の腫瘍血管内皮細胞と血管内皮前駆細胞そのものに対する効果は依然不明である。ごく最近まで、腫瘍血管内皮細胞は正常血管内皮細胞と同じだと考えられており、腫瘍血管内皮細胞に対する薬剤感受性などは解析されることがなかった。

これまで、我々は腫瘍血管内皮細胞の分離と培養を行い、腫瘍血管内皮細胞が正常血管内皮細胞と比較し、TEMs, EGFR などの特異遺伝子を発現している、増殖が早い、染色体の異常をもつ、抗がん剤に抵抗性があるなど、多くの点で異なることを報告してきた。また、血管内皮前駆細胞 endothelial progenitor cell 以下 EPC は、腫瘍組織からの VEGF などの成長因子により骨髓から局所へ動員されることが知られている。この骨髓由来の EPC が腫瘍血管の新生に強く関与している事が現在示されており、この EPC を標的とする治療の重要性も提唱され注目が集まっている。

そこで腫瘍血管内皮細胞以下 Tumor Endothelial Cell :TEC と EPC に対する EGCG の作用を正常血管内皮細胞以下 Normal Endothelial Cell : NEC と比較して

検討した。血管内皮細胞の分離、培養は樋田らが報告した方法に準拠して行った。TEC として、ヒト口腔癌細胞 oral carcinoma と ヒト高転移性メラノーマ Melanoma のマウス皮下移植腫瘍から分離された口腔癌 血管内皮細胞(oral carcinoma EC)とメラノーマ血管内皮細胞 (Melaonoma EC)を用いた。同一条件でマウスの正常皮膚から分離した Skin EC を NEC として用いた。EPC は nude mouse の末梢血から採取された単核球分画から分離培養された。さらに EPC の動員に対する EGCG の作用機序の解析のためにマウス骨髄間質細胞 Bone Marrow Stromal Cell 以下 BMSC を採取して実験に用いた。試薬は緑茶カテキンの一種であるエピガロカテキンガレート EGCG を用いた。

我々が分離培養した血管内皮細胞と EPC の血管内皮細胞の純度を確認するため、フローサイトメトリーによる解析を行ったところ、TEC、EPC、NEC では血管内皮細胞特異マーカーである BS1-B4 Lectin が陽性であった。さらに通常 EPC に発現していることが知られている、幹細胞マーカーの一つである stem cell antigen (sca-1) は EPC だけではなく TEC においても陽性であったが、一方、NEC では陰性であった。このことから我々が分離培養した TEC の中には、EPC 由来の細胞が含まれていることが示唆された。次に EGCG の TEC、EPC、NEC の遊走に対する影響を比較検討するために、 $0\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{M}$ の EGCG で処理した後、血管内皮増殖因子 VEGF に対するそれぞれの遊走能を解析した。NEC と比較して、2つの TEC、EPC では、EGCG 処理により VEGF に対する細胞の遊走が抑制されていた。

次に血管内皮細胞において遊走に関与するシグナリングである Akt signaling に対する EGCG の効果をウエスタンブロット法で比較検討した。 $0\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ の EGCG を 16 時間、低血清培地で pretreatment し、VEGF 刺激 30 分後にタンパクを回収した。NEC 正常血管内皮細胞と比較して、TEC 腫瘍血管内皮細胞と EPC では EGCG 添加で Akt のリン酸化が抑制された。

これまで、腫瘍血管新生に EPC が関与しているという報告が多くある。そこで、EPC の循環への動員に対する EGCG の効果を検討した。ヌードマウスを PBS 投与のコントロール群、EGCG 単独投与群、血管内皮増殖因子 VEGF 投与群、VEGF と EGCG 投与群の 4 つの群に分け、それぞれの薬剤を 2 日間腹腔内投与した後、末梢血を回収し、単核球分画から幹細胞マーカーである CD133 ならびに血管内皮マーカーである VEGF の受容体である VEGF Receptor 2 のダブルポジティブ細胞を EPC として、フローサイトメトリーで細胞数を解析した。EGCG 単独投与では、顕著な EPC 数の減少が認められなかったが、VEGF 投与によって末梢血に動員された EPC の数が VEGF と EGCG 投与では、50%程度にまでに

減少していた。このことから EGCG は VEGF 刺激下での EPC の末梢への動員を抑えることが示唆された。

EPC の循環への動員 mobilization には骨髓腔 stromal zone における BMSC の MMP-9 が関与しているという報告が多くある。そこで口腔癌担癌 nude mouse の大腿骨から骨髓間質細胞以下 BMSC を分離培養し、BMSC における EGCG の MMP-9 の発現への影響を検討した。分離された BMSC の間質細胞での性質を regular PCR によって確認したところ、ネガティブコントロールである正常血管内皮細胞である、skin EC では発現が認められなかったが、骨髓間質細胞 BMSC では間質細胞マーカーである FAP (fibroblast activation protein), SDF-1(stromal derived factor-1), α SMA(α smooth muscle actin) が陽性であり、分離培養された BMSC は間質細胞としての性質を持つことが示唆された。この BMSC を $0\mu\text{M}$ 、 $25\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ の EGCG で 24 時間処理後、RNA を回収し、cDNA を作製後、MMP-9 の発現について、real time PCR を行った。EGCG 処理により、BMSC の MMP-9 の mRNA 発現が濃度依存的に減少していた。この結果により EGCG が骨髓腔内で、骨髓間質細胞での MMP-9 の発現を抑えることにより、EPC の末梢への動員を抑える可能性が示唆された。

これらのことにより EGCG は腫瘍内の血管内皮細胞と血管内皮前駆細胞に対してより特異的に作用する血管新生阻害剤として単独、もしくは他の治療法との併用で応用が可能であることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則

副 査 教 授 進 藤 正 信

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

緑茶ポリフェノールは腫瘍血管内皮細胞ならびに 血管内皮前駆細胞に直接的な抑制効果を有する

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。審査論文の概要は以下の通りである。

緑茶ポリフェノール的一种であるカテキン群、なかでもエピガロカテキンガレート (EGCG) は強い生理作用を有し、*in vitro* の系で腫瘍細胞の増殖、浸潤を抑えることが報告されている。また EGCG はヒト臍帯静脈血管内皮細胞やヒト微小血管内皮細胞に対して、増殖や遊走を抑制することが報告されているが、正常血管内皮細胞とは明らかに異なるとされる腫瘍血管内皮細胞に対する効果は明らかではない。さらに、最近、血管内皮前駆細胞は腫瘍組織からの VEGF などの成長因子により骨髄から局所へと動員され、腫瘍血管の新生に強く関与することが示されているが、EGCG との関係は不明である。

本研究は、腫瘍血管内皮細胞 (TEC) と血管内皮前駆細胞 (EPC) に対する EGCG の作用を明らかにする目的で、正常血管内皮細胞 (NEC) に対する効果と比較検討したものである。腫瘍血管内皮細胞として、ヒト口腔癌血管内皮細胞とメラノーマ血管内皮細胞を用い、同一条件でマウスの正常皮膚から分離した内皮細胞を正常血管内皮細胞として用いた。血管内皮前駆細胞はヌードマウス末梢血から採取した単核球分画から分離培養した。さらに血管内皮前駆細胞の末梢への動員に対する EGCG の作用機序の解析のために、マウス骨髄間質細胞を採取して実験に用いた。

まず、フローサイトメトリーを用いて血管内皮細胞と血管内皮前駆細胞の純度を解析し、分離培養した腫瘍血管内皮細胞の中に血管内皮前駆細胞由来の細胞が含まれていることを確認した。次に $0\mu\text{M}$ と $50\mu\text{M}$ の EGCG で処理した後、血管内皮増殖因子 VEGF に対するそれぞれの遊走能を解析し、2 種類の腫瘍血管内皮細胞と血管内皮前駆細胞では、正常血管内皮細胞に比較して、EGCG 処理により VEGF に対する遊走が抑制されることを示した。そこで Akt signaling に対する EGCG の効果を明らかにするため、血管内皮細胞を飢餓状態にした後、 $100\mu\text{M}$ の EGCG を添加した低血清培地中で 16 時間処理し、VEGF 刺激

30 分後にタンパクを回収して、ウエスタンブロット法で比較検討し、腫瘍血管内皮細胞と血管内皮前駆細胞では、EGCG 添加により Akt のリン酸化が抑制されることを示した。

次に、ヌードマウスを PBS 投与のコントロール群、EGCG 単独投与群、VEGF 投与群、VEGF と EGCG 投与群の 4 つの群に分け、それぞれの薬剤を 2 日間腹腔内投与した後、末梢血を回収して、血管内皮前駆細胞の循環への動員に対する EGCG の効果を検討し、EGCG は VEGF 刺激下での血管内皮前駆細胞の末梢への動員を抑えることを示した。さらに骨髄間質細胞を $0\mu\text{M}$ 、 $25\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ の EGCG で 24 時間処理し、MMP-9 の発現について real time PCR で検索した。その結果、EGCG 処理により、マウス骨髄間質細胞 (BMSC) における MMP-9 の発現は濃度依存的に減少することを確認し、EGCG が骨髄腔内で、BMSC における MMP-9 の発現を抑えることにより、血管内皮前駆細胞の末梢への動員を抑える可能性を示した。

これらの結果から、EGCG は腫瘍内の血管内皮細胞 (TEC) と血管内皮前駆細胞 (EPC) に対してより特異的に作用する血管新生阻害剤として単独、もしくは他の治療法との併用で応用が可能であることを示した。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。

主な質問事項は、

- 1) VEGF で動員された EPC と無刺激状態の EPC は同じ性格を持っているのか、
 - 2) EPC は遺伝子異常を有するのか、抗癌剤に対して抵抗性を示すのか、
 - 3) TEC, TEC, EPC の遊走能について、
 - 4) Akt のリン酸化機構ならびにその意義について、
 - 5) ジフテリアトキシンでヒト細胞が死滅するのは何故か、
 - 6) フローサイトメトリーの原理について、
- 等であった。

いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、EGCG は腫瘍内の血管内皮細胞と血管内皮前駆細胞に対してより特異的に抑制する作用を持つことを明らかにし、腫瘍に対する血管新生阻害剤として有用であることを示したことが高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士 (歯学) の学位授与に値するものと認められた。