

氏 名（本籍）	ほし 星	だ 田	とおる 徹
学 位 の 種 類	博	士	（ 医 学 ）
学 位 記 番 号	医	第	3 2 9 0 号
学位授与年月日	平 成	14 年	9 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
最 終 学 歴	平 成	3 年	3 月 28 日 東北大学医学部医学科卒業
学 位 論 文 題 目	膵癌に対する soluble flt-1 Vascular Endothelial Growth Factor receptor を用いた遺伝子治療の 検討		

（主 査）

論 文 審 査 委 員	教授 里 見	進	教授 松 野 正 紀
	教授 下瀬川	徹	教授 金 丸 龍之介

論文内容要旨

背景と目的

拡大手術や集学的治療によっても、膵癌は予後不良な腫瘍である。新しい治療戦略の開発が求められるなか、抗血管新生療法が可能性の一つとして有望視されている。Vascular endothelial growth factor (VEGF) は重要な血管新生因子であり、多くの腫瘍で過剰発現している。VEGF 受容体 flt-1 及び flk-1/KDR は、細胞外リガンド結合部分、細胞膜部分、細胞内チロシンキナーゼ部分からなる。可溶性の細胞外部分である soluble flt-1 は、腫瘍細胞から産生された VEGF を捕捉してその活性を阻害し、また通常の VEGF 受容体とヘテロダイマーを形成してドミナントネガティブ効果によりシグナル伝達を阻害することにより、強力な抗血管新生因子となりうる。今回我々は、ヒト膵癌細胞株に対するアデノウィルスベクターを用いた soluble flt-1 遺伝子局所投与の腫瘍増殖抑制効果を検討した。

方法

ELISA, RT-PCR, ノーザンブロット法にて 9 種の膵癌細胞株の VEGF 蛋白産生および mRNA 発現レベルを評価し、VEGF 低発現細胞株と高発現細胞株を選んで以下の実験に用いた。また、膵癌細胞皮下腫瘍と培養膵癌細胞の VEGF mRNA も比較した。培養膵癌細胞に soluble flt-1 を組み込んだアデノウィルス (Adsflt) 及びコントロールウィルス (AdLacZ) を感染させて、*in vitro* の細胞増殖に対する影響を評価した。*In vivo* の腫瘍増殖抑制効果を検討するために、膵癌細胞を SCID マウスの皮下に植えて皮下腫瘍モデルを作製した。Adsflt, AdLacZ または vehicle を腫瘍に局所注射し、腫瘍径を計測した。CD 31 免疫染色により各群の腫瘍の微小血管密度を評価した。TUNEL 染色にて各群のアポトーシス指数も検討した。また、VEGF と vimentin の二重蛍光免疫染色で膵癌皮下腫瘍内の VEGF 発現の局在を検討した。さらに、skinfold chamber モデルを用いて、Adsflt 感染細胞、AdLacZ 感染細胞、野生型細胞における腫瘍血管新生のプロセスを生体下に顕微鏡観察した。

結果

使用した全細胞株で VEGF の発現を認め、VEGF 低発現株として Panc-1 細胞、高発現株として PK-8 細胞を用いた。どちらの細胞においても、Adsflt 感染群と AdLacZ 感染群の間で *in vitro* の細胞増殖に差はなかった。*In vivo* 実験では、Panc-1 細胞、PK-8 細胞いずれにおいても Adsflt 投与群では AdLacZ 投与群、コントロール群と較べ腫瘍増殖が有意に抑制された。微小血管密度は Adsflt 群の腫瘍で有意に低かった。アポトーシス指数は Adsflt 群で高かった。

Skinfold chamber 実験においても、両細胞株ともに、Adsflt 感染群で、AdLacZ 感染群、コントロール群と比べ血管新生・腫瘍増殖が抑制された。また、VEGF 発現は Panc-1 皮下腫瘍において培養 Panc-1 細胞の 2 倍のレベルであり、二重蛍光免疫染色では、VEGF 発現は癌細胞のみならず、腫瘍間質の間葉系細胞にも認められた。

考 察

In vivo での明らかな腫瘍増殖抑制効果にも関わらず、*in vitro* での細胞増殖は Adsflt 感染で阻害されなかった。これは sflt-1 の腫瘍増殖抑制効果が *in vivo* のメカニズムによるものであることを示唆する。さらに、CD 31 免疫染色で示された微小血管密度減少と skinfold chamber モデルで示された生体下の腫瘍血管新生抑制は、この抗腫瘍効果が抗血管新生機序に基づくものであることを強く示す。また、アポトーシスの関与も示唆された。今回の検討では、VEGF 低発現細胞株においても、高発現細胞株と同様に soluble flt-1 による抗血管新生療法の効果が見られた。これは、ノーザンブロット法及び二重蛍光免疫染色で明らかにされたように、腫瘍内においては VEGF が癌細胞のみならず腫瘍間質の間葉系細胞からも産生されることによると考えられた。今回我々は、Adsflt 局所投与による腫瘍増殖抑制効果を検討したが、Adsflt 遺伝子治療は局所でのみ抗腫瘍効果を現したとする報告と、遠隔臓器にも効果を及ぼしうるとする報告があり、その結論は出ていない。遠隔転移に対する治療を含めた将来の臨床応用という観点からは、この点は重要なポイントである。全身的效果か局所効果かという問題、全身的副作用の問題、VEGF 発現レベルと治療効果の相関性など解決されねばならない問題はあるが、アデノウィルスによる soluble flt-1 遺伝子治療は、膀胱癌を含めた多くの悪性腫瘍治療の強力な戦略となりうる。

審査結果の要旨

拡大手術や集学的治療によっても、膵癌は未だ予後不良な腫瘍であり、新しい治療戦略が求められるなか、抗血管新生療法が可能性の一つとして有望視されている。VEGFは腫瘍血管新生において重要な役割を果たす血管新生因子である。VEGF受容体の可溶性細胞外部分である soluble flt-1は、VEGFと結合し、また通常のVEGF受容体とヘテロダイマーを形成して、VEGF-受容体系の活性を抑制し、強力な抗血管新生因子として働く。他方、遺伝子治療は次世代の治療技術として期待されており、癌治療への応用も研究されている。

本研究は、マウスに作製したヒト膵癌細胞皮下腫瘍に対する、アデノウィルスベクターを用いた soluble flt-1 遺伝子局所投与の腫瘍増殖抑制効果を検討したものである。はじめに、膵癌細胞株の VEGF 発現強度を検討し、高発現株として PK-8、低発現株として Panc-1 を選んだ。Soluble flt-1 を組み込んだアデノウィルスベクター Adsflt は皮下腫瘍に対して、いずれの細胞株においても有意な増殖抑制効果を示した。微小血管密度の減少とアポトーシスの増加も認められた。Skinfold chamber model を用いた生体下の腫瘍血管新生の観察では、Adsflt 感染細胞において著明な血管新生および腫瘍増殖の抑制が認められた。また、免疫染色で VEGF が腫瘍間質の間葉系細胞からも産生されることが示され、これが細胞株の VEGF 発現強度にかかわらず十分な抗腫瘍効果が得られる理由として考えられた。

膵癌は乏血管性の腫瘍であり、血管新生抑制療法に対して抵抗性を示すのではないかという意見もあるが、本研究は、soluble flt-1 を用い、膵癌に対しても抗血管新生療法が有用な戦略となることを skinfold chamber model を用いて実証した点に意義がある。また、soluble flt-1 を使った抗血管新生遺伝子治療の膵癌に対する可能性を提示した。さらに、腫瘍細胞からの VEGF 産生が注目されるなか、腫瘍の大きな成分である間葉系細胞からも VEGF が産生されることを二重蛍光免疫染色で証明した初めての業績である。以上より本研究は学位に値すると判定した。