

氏 名 (本籍)	保 坂 智 子
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2 6 9 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 1 年 3 月 2 5 日
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 専 攻	東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科 (博 士 課 程) 医 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	肺 癌 の 血 管 新 生 に お け る 血 管 新 生 抑 制 因 子 Vasohibin1 の 役 割

(主 査)

論 文 審 査 委 員	教 授 近 藤 丘	教 授 佐 藤 靖 史
	教 授 阿 部 俊 明	教 授 八 重 樫 伸 生

# 論文内容要旨

癌は日本人の死因の第1位を占める疾患であり近年その増殖には血管新生を伴うことが明らかとされてきた。VEGFによって血管内皮に誘発される遺伝子群の中から、血管新生抑制活性を示す新規分子 vasohibin 1 (以下 VASH1) は *in vitro* において血管内皮に特異的に作用し、遊走、増殖、管腔形成を抑制した。

今回の研究では、肺癌の血管新生における VASH1 の役割を明らかにすることを目的とした。

第1に手術で摘出したヒト肺癌組織において、VASH1, CD31, podoplanin, VEGF, FGF-2, HIF1 $\alpha$ ,  $\alpha$ SMA の免疫組織化学染色を行い、その関係について検討した。

第2にマウスの皮下に Lewis lung cancer (以下 LLC) cell を移植した腫瘍移植モデルを作成。

1. VASH1 ノックアウトマウスと野生型マウスにそれぞれ腫瘍細胞を移植し、その増殖の比較、および摘出腫瘍組織において CD31,  $\alpha$ SMA, TUNEL 蛍光免疫組織化学染色を行った。
2. 野生型マウスにおいて、腫瘍移植後、外因性にヒト VASH1 遺伝子を搭載したアデノウイルス (以下 AdVASH1) または  $\beta$ -Galactosidase 遺伝子を搭載したアデノウイルス (以下 AdLacZ) を投与し、同様にそれぞれの増殖の比較および蛍光免疫組織化学染色を行った。
3. さらに、AdVASH1 と抗癌剤のシスプラチンを併用し、シスプラチン単独療法と比較して、その併用効果についても検討した。

まず、ヒト非小細胞肺癌の免疫組織化学染色の切片において、VASH1 は腫瘍部で壁細胞によって囲まれた成熟血管内皮細胞に発現しており、リンパ管内皮細胞には発現していなかった。また、VASH1 の血管内皮細胞における発現は低酸素誘導因子である HIF1 $\alpha$  および血管新生促進因子の VEGF, FGF-2 の腫瘍細胞における発現と深く関係していた。

次に、マウス皮下移植モデルにおいて検討した。野生型マウスと VASH1 ノックアウトマウスを比較すると、免疫組織化学染色において、VASH1 ノックアウトマウスでは未成熟の血管およびアポトーシスをおこしていない腫瘍細胞を多く認めた。つづいて、外因性に AdVASH1 を投与し、AdLacZ 投与群や Vehicle 投与群と比較したところ、AdVASH1 投与群では他群と比較して、腫瘍の増殖速度が抑制され、腫瘍血管は壁細胞によって囲まれた小型で円形のものを多く認め、腫瘍内の血管新生が抑制されていた。また、シスプラチンと AdVASH1 の併用した群ではシスプラチン単独群と比較して、さらに抗腫瘍効果を認めた。

まとめ：内因性 VASH1 は主に腫瘍血管の成熟化に関与し、腫瘍の血管新生を停止させる働きがあることが示唆された。また、VASH1 を外因性に十分投与すると、腫瘍血管の発芽を抑制し、さらに血管を成熟化させた。それによって、従来の化学療法と組み合わせると、より抗腫瘍効果を生み出す結果となった。

## 審査結果の要旨

癌は日本人の死因の第1位を占める疾患であり、その癌の中でも肺癌は年々増加している。

近年、癌の増殖には血管新生を伴うことが明らかとされてきた。その血管新生を抑制する因子として、cDNA マイクロアレイ法を用い VEGF によって血管内皮に誘発される遺伝子を解析し、そのうちの1つで機能的には全く不明な遺伝子が VASH1 である。これまで、VASH1 は *in vitro* において血管内皮に特異的に作用し、遊走、増殖、管腔形成を抑制することは明らかとなったが、その働きに関しては未だに解明されていないことが多々ある。本論文は肺癌における VASH1 の役割、効果について検討したものである。

実験は手術で摘出されたヒト非小細胞肺癌組織 44 例を用いて、VASH1、内皮マーカーの CD31、リンパ管マーカーの podoplanin、血管新生因子の VEGF、FGF-2、低酸素において VEGF の発現を調節している HIF1 $\alpha$ 、平滑筋マーカーの  $\alpha$ SMA の免疫組織化学染色を行い、その関係について検討した。またマウス腫瘍移植モデルを作成し、第1に内因性 VASH1 の役割をみるために、VASH1 ノックアウトマウスを用いて腫瘍の増殖の比較、および摘出腫瘍組織に対し CD31、 $\alpha$ SMA、アポトーシスを示す TUNEL 蛍光免疫組織化学染色を行った。第2に外因性 VASH1 の効果をみるために、ヒト VASH1 遺伝子を搭載したアデノウイルス (AdVASH1) をマウスの尾静脈に投与し同様に比較検討した。第3に外因性 AdVASH1 にさらに抗癌剤のシスプラチンを併用し、その増強効果について検討した。

結果はヒト肺癌組織において VASH1 は壁細胞によって囲まれた成熟血管内皮細胞に発現していたが、リンパ管には発現していなかった。また HIF1 $\alpha$ 、VEGF、FGF-2 の腫瘍細胞での発現と VASH1 の血管内皮細胞における発現は深く関係していた。VASH1 ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して、未熟な血管およびアポトーシスを起こしていない腫瘍細胞を多く認めた。また、外因性に VASH1 を投与すると腫瘍の増殖速度が抑制され、壁細胞で囲まれた小型で円形な成熟血管を多く認め、血管新生も抑制された。また、シスプラチンとの併用によりさらに抗腫瘍効果を認めた。

本研究より、内因性 VASH1 は腫瘍血管に特異的に発現し、主に腫瘍血管の成熟化と関与し、腫瘍の血管新生を停止させる働きがあると考えられた。また外因性 VASH1 は腫瘍血管の発芽を抑制し、さらに血管を成熟化させる。そのことにより抗癌剤が腫瘍へ流れやすくなり、従来の化学療法と組み合わせることでさらに抗腫瘍効果を生み出す可能性が示唆された。

これらの結論から、新生抑制因子 VASH1 が今後の肺癌における診断、および治療的有効性を示唆する重要な研究であると考えられる。よって本論文は博士 (医学) の学位論文として合格と認める。

