

|          |  |
|----------|--|
| 氏名       | くははじめ<br>久保肇   |
| 学位(専攻分野) | 博士(医学)   |
| 学位記番号    | 医博第2273号   |
| 学位授与の日付  | 平成12年7月24日   |
| 学位授与の要件  | 学位規則第4条第1項該当   |
| 研究科・専攻   | 医学研究科外科系専攻   |
| 学位論文題目   | Involvement of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 in maintenance of integrity of endothelial cell lining during tumor angiogenesis<br>(血管内皮増殖因子受容体ファミリーのひとつである VEGFR-3 は、腫瘍血管新生の際、内皮細胞層の密着性の維持に働く。) |
| 論文調査委員   | (主査)<br>教授 開 祐司 教授 今村正之 教授 山岡義生  |

### 論文内容の要旨

腫瘍の増大に血管新生は不可欠であり、抗血管療法は新しい癌治療として、期待されている。抗癌剤と違い、薬剤耐性が生じないことが大きな特徴である。

血管新生において中心的な役割を果たしている分子は、血管内皮増殖因子(VEGF)とその受容体(VEGFR-1, VEGFR-2)である。内皮細胞の分化、増殖、遊走、血管透過性の増大など、血管形成の早期過程に必須であることが知られている。一方、そのファミリーである VEGF-C は、発生学的にリンパ管新生に強く意味づけられてきた。VEGF-C のトランスジェニックマウスは、リンパ管の過形成を示し、受容体 VEGFR-3 は、リンパ管に限局発現する。しかし、最近になって、VEGFR-3 のノックアウトマウスが、血管形成異常で胎生致死となることがわかった。血管発生は認めるが、原始的な微小血管網の形にとどまり、大血管から小血管という高度に階層化された血管構造へのリモデリングの過程が障害されている。

VEGF-C/VEGFR-3 が、腫瘍の進展する環境で、血管新生においていかなる働きをするかを調べるため、我々はマウス VEGFR-3 に対するモノクローナル抗体を作成した。

この抗体(AFL4)によって、胎生12日以降のマウスにおいて、VEGFR-3 がリンパ管内皮細胞に特異的に発現していることが確認された。成体マウスの皮膚においても、VEGFR-3 はリンパ管にのみ発現していた。次に腫瘍のモデルとして、ラット C6 グリオブラストーマの腫瘍細胞株をマウス皮下に注射した。この腫瘍は、腫瘍血管を伴い急速に腫瘤形成する。抗体による免疫組織染色で、腫瘍内と腫瘍周囲の血管内皮細胞に VEGFR-3 の発現誘導が認められた。

AFL4 は、VEGF-C と VEGFR-3 の結合を阻害し、VEGF-C による VEGFR-3 のリン酸化を抑制する。in vivo での効果を確認するため、隔日で AFL4 を全身投与(皮下あるいは腹腔内)した。3 週間の投与で、明らかな効果はみられず、VEGFR-3 はリンパ管の恒常的な維持には働いていないと考えられた。次いで腫瘍血管における VEGFR-3 の役割を調べるため、C6 腫瘍皮下注射後 AFL4 を隔日で全身投与した。コントロールと比較し、AFL4 投与群は、腫瘤形成を75%抑制した。AFL4 投与群の特徴的な組織像は、微小出血である。腫瘍内血管密度も有意に小さかった。腫瘤を取りまく血管構造は微小血管網が主で、高度に階層的な血管構造を形成するに至らなかった。微小出血の部位は、走査電顕による観察で post-capillary venule (後細静脈)に限局することがわかった。後細静脈は血管の新生時に、管腔が発芽(Sprouting)する部位である。これらの結果から、VEGFR-3 は腫瘍血管新生の際に内皮細胞層の維持に働いていると考えている。

VEGF-C/VEGFR-3 は、血管の発芽とリモデリングの過程で、内皮細胞層を維持するために働いていることがわかった。近年、血管形成研究において、このリモデリングの過程は注目されている。血管網に血液が流れると、流体力学的な圧が加わることになる。その圧に対し、周細胞、血管平滑筋細胞といった血管壁細胞が、血管内皮細胞を裏打ちすることが、必要であるとされている。興味深いことに、AFL4 投与群の微小出血部において、壁細胞の異常はみられなかった。血管新生

のリモデリングの過程で血管の維持のために、壁細胞の他に血管内皮層の維持機構も不可欠であることが示唆される。さらに、VEGF-C/VEGFR-3は、抗血管療法の新たなターゲットとして期待される。

### 論文審査の結果の要旨

血管増殖因子 VEGF のファミリーである VEGF-G と、その特異的受容体 VEGFR-3 は、従来リンパ管新生に関与する分子として報告されてきた。本研究では、マウス VEGFR-3 に対する中和モノクローナル抗体を作成し、血管新生における VEGFR-3 の役割について検討した。

抗体による免疫組織染色で、生理的条件下において、VEGFR-3 が、マウスのリンパ管に特異的に発現することを確認した。抗体の全身投与で、明らかな影響が認められず VEGFR-3 が正常リンパ管の維持に必ずしも必要でないと考えられた。

次にヌードマウス皮下腫瘍株移植モデルを用いて抗体を隔日に全身投与すると、腫瘍増殖は抑制された。本モデルでは腫瘍血管に VEGFR-3 の発現を認め、抗体投与群で有意な血管密度の減少と特異的な微小出血があった。走査電顕による観察で、この微小出血が血管新生の場とされる後細除脈に局限することも確認した。血管新生は、既存の血管構造が再度緩やかになることで、新たな血管の萌芽を促す機構である。しかし、そこに最低限度の integrity が保証されていないと、出血をもたらすことになる。従って、病理学的条件下で VEGFR-3 は、この integrity を維持する役割を果たすと考えられる。

抗血管新生療法は、新たな癌治療の戦略として期待されて VEGFR-3 が新たなターゲットとなる可能性が示唆された。

以上の研究は、血管新生のメカニズムの解明に貢献し、癌治療の発展に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成12年6月20日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。