

氏 名	むら い のぞむ 村 井 望
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 1854 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 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	Apoptosis of human glioma cells in vitro and in vivo induced by a neutralizing antibody against human basic fibroblast growth factor (抗 basic FGF 中和抗体によるヒト神経膠腫細胞のアポトーシス誘 導)
論文調査委員	(主 査) 教 授 野 田 亮 教 授 上 田 國 寛 教 授 菊 池 晴 彦

### 論 文 内 容 の 要 旨

basic fibroblast growth factor (bFGF) は神経外胚葉, 中胚葉組織に対して増殖因子, 血管新生因子として働いている。これまで bFGF 及び bFGF レセプター 1, 2 の発現がヒト神経膠腫組織と細胞株において著明に高まっており, その発現量は神経膠腫の悪性度, 血管新生とも相関することが報告されてきた。一方抗 bFGF 中和抗体, antagonist, antisense oligonucleotides などの投与により神経膠腫細胞の成長が抑制されることも観察された。これらの事実から, bFGF は神経膠腫細胞の重要な増殖因子であり, autocrine growth factor として作用していると推測されている。一方, 抗 Fas / APO1 抗体, protein kinase C inhibitor などの投与のほか, epidermal growth factor, insulin-like growth factor のブロックによっても神経膠腫細胞に apoptosis が誘発されることが報告されている。本研究では, 抗 bFGF 中和抗体 (3H3 MAbs) を投与し, bFGF autocrine loop を阻害することによって神経膠腫細胞に apoptosis を起こすことを証明した。

3H3 Mab はヒト変異 bFGF タンパク (CS23) を抗原として作られた mouse monoclonal antibody (IgG class 1) であり, 他の FGF ファミリータンパクとは交差反応しない。域養ヒト神経膠腫細胞 U87MG, U251MG に 3H3 MAbs を添加し, 60 時間後, 両細胞株とも浮遊しはじめた。これらより DNA を抽出し, 電気泳動法により DNA の断片化を確認した。また, Acridine Orange 染色によって核の濃縮, 細胞の凝縮, apoptotic body が認められた。さらに同細胞をヌードマウス皮下に移植し, 腫瘍塊周囲に 3H3 MAbs を局所投与し, *in vivo* においても apoptosis が惹起されるか否かを確認した。摘出した標本を DNA 断片化検出キット (ApopTag kit) にて染色したところ, 腫瘍細胞核は陽性に染色された。これらはいずれも対照として使用した normal mouse IgG class1 投与群と明らかな差異を示した。さらに, bcl-2 遺伝子を強発現する同細胞株を作成し, 3H3 Mab 存在下に培養したところ, 細胞死は誘導されなかった。

以上から抗 bFGF 中和抗体により, *in vitro*, *in vivo* の両方において神経膠腫細胞に apoptosis が誘発されることが証明された。bFGF は神経膠腫細胞にとって重要な増殖因子であり, bFGF autocrine loop を形成していることが裏付けられた。また, U87MG 細胞が野性型 p53 を有し, U251MG は変異型 p53 を有するにも関わらず, 抗 bFGF 中和抗体を介した apoptosis の誘導阻止においては同様な挙動を示した。この apoptosis は p53 dependent pathway を介さずに進行し, bcl-2 の発現によって抑制されることが示された。

今後, 抗 bFGF 中和抗体は神経膠腫の臨床的治療の一助となることが期待される。

### 論文審査の結果の要旨

basic fibroblast growth factor (bFGF) の発現はヒト神経膠腫細胞及び組織において著明に高まっており, 神経膠腫細胞の増殖に関して autocrine loop を形成すると考えられている。bFGF の autocrine loop を阻害することによって神経膠腫細胞の成長は著明に抑制されるが, アポトーシスを起こすという報告はどの腫瘍においても見られない。本実験では培養ヒト神経膠腫細胞に抗 bFGF 中和抗体を添加すると, アポトーシスを起こすことを示した。またヌードマウス皮下に移植した腫瘍細胞に抗 bFGF 中和抗体を局所投与してもアポトーシスの起こることを示した。さらに, bcl-2 遺伝子を強発現させた細胞株では, 抗 bFGF 中和抗体投与下でも, 細胞死が誘導されなかった。以上から抗 bFGF 中和抗体により, *in vitro* と *in vivo* において神経膠腫細胞にアポトーシスが誘発されることが証明された。また, このアポトーシスは p53 遺伝子の変異に拘わらず進行し, bcl-2 の発現によって抑制されることが示された。

以上の研究はアポトーシスを利用した脳腫瘍治療の進歩に寄与するところが多い。

従って, 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9年2月4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。