

京都大学	博士（医学）	氏名	山内文生
論文題目	<i>In Vivo</i> FRET Imaging of Tumor Endothelial Cells Highlights a Role of Low PKA Activity in Vascular Hyperpermeability (腫瘍内皮細胞の生体内 FRET イメージングは血管透過性亢進における低 PKA 活性の役割を明らかにする)		
(論文内容の要旨)			
<p>【背景】 腫瘍の病理学的特徴の一つである血管透過性亢進は、血管新生や転移と関係するため、その分子メカニズムを理解することは重要である。腫瘍の血管透過性に関連する代表的な分子は、血管内皮成長因子 (VEGF) である。VEGF は、VEGF レセプター (VEGFR) を介して血管内皮細胞に作用し、血管透過性を増加させる。別の関連分子として、cAMP は血管内皮細胞の内皮バリア機能を強くする作用によって、血管透過性を抑える方向に働く。これらの分子の研究は、これまでは培養細胞を用いており、生きた個体の腫瘍血管では調べられていなかった。そこで本研究では、血管透過性亢進の分子メカニズム解明のために、生体内での腫瘍血管内皮細胞の PKA 活性と血管透過性の関連を調べた。</p> <p>【方法】 生体内での細胞内 PKA 活性を可視化するために、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) に基づく PKA バイオセンサーを発現するマウス (PKAchu マウス) を用いた。二光子励起顕微鏡を用いて、生きた状態の担癌マウスの腫瘍血管を観察し、血管内皮細胞の PKA 活性を調べた。正常組織 (皮下、腸、肝臓) の血管内皮細胞も同様に調べた。比較のために、Extracellular signal-regulated kinase (ERK) の活性も同様に調べた。組織の血管透過性は、マイルスアッセイにより測定した。生体内と培養細胞内の比較のために、PKA バイオセンサーを発現させたヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) を用い、VEGF に対する PKA 活性の応答を観察した。</p> <p>【結果と考察】 PKAchu マウスの生体内 FRET イメージングの結果、腫瘍血管内皮細胞の PKA 活性は、正常血管内皮細胞に比べて、有意に低いことがわかった。一方、ERK 活性については、腫瘍内皮と正常内皮の間に差は認められなかった。腫瘍内皮細胞の低い PKA 活性と血管透過性の関係を調べるために、腫瘍と皮膚の血管透過性を調べた。その結果、皮膚に比べて、腫瘍は高い血管透過性を示したが、cAMP 類似体を投与した担癌マウスでは、腫瘍の血管透過性が低下した。cAMP 類似体による腫瘍内皮細胞の PKA 活性化が認められたことから、低い PKA 活性は腫瘍の高い血管透過性に関与していることが示唆された。次に、血管透過性制御に関わる VEGFR 経路と PKA 活性の関係を調べた。VEGFR 阻害剤である Motesanib を担癌マウスに投与した結果、腫瘍の血管透過性が低下した。生体内 FRET イメージングと免疫染色解析により、Motesanib は腫瘍内皮細胞の PKA を活性化すること、また VEGFR2 リン酸化活性を低下させることがわかった。よって、血管透過性制御において、VEGFR は PKA のサプレッサーとして機能することが示唆された。この仮説をさらに検証するため、VEGF を皮下に注射して内皮 PKA 活性と血管透過性を評価した結果、VEGF による皮下の血管透過性亢進部において、PKA 活性の低下が認められた。これらの結果より、VEGF 依存的な血管透過性の亢進メカニズムには、PKA の活性低下が少なくとも関与しているものと考えられる。一方で、HUVEC に</p>			

において VEGF は PKA を活性化させることが分かり、生体内の結果とは一致しなかった。

【結論】 正常内皮細胞に比べて、腫瘍内皮細胞の PKA 活性が低いこと、ならびに腫瘍内皮 PKA は血管透過性を負に制御することが示された。生体内 FRET イメージングによって、より生理的な条件下での解析が可能になると考えられ、癌研究における本手法の有用性が示された。

(論文審査の結果の要旨)

腫瘍血管の透過性が亢進していることや、VEGF や cAMP による培養血管内皮細胞の透過性制御メカニズムはよく知られているが、その一方で、腫瘍の血管内皮細胞の分子活性を生きた個体で詳細に解析することは技術的に困難であった。申請者は、生きた個体で分子活性を評価できる FRET マウスを用い、腫瘍血管内皮細胞における cAMP 依存性リン酸化酵素(PKA)の活性を可視化し、血管透過性亢進におけるその役割を明らかにすることを目的に研究を行った。FRET バイオセンサーを発現する担癌マウスの二光子顕微鏡による観察および解析結果から、腫瘍血管内皮細胞の PKA 活性は、正常血管内皮細胞に比べて低いことを見出した。ついで、PKA 活性と血管透過性の関係を調べた結果、cAMP 類似体は腫瘍の血管透過性を低下させること、ならびに腫瘍内皮細胞の PKA を活性化させることを示し、腫瘍における高い血管透過性は、血管内皮の PKA 活性が関与していることを示した。さらに、PKA 活性と VEGF 経路との関係を調べた結果、VEGF 依存的な血管透過性亢進のメカニズムにも PKA が関与していることを見出した。また、培養ヒト内皮細胞と生体内血管内皮細胞とでは、VEGF に対する PKA の反応が異なることも明らかにするとともに、癌研究における生体内 FRET イメージングの有用性も示した。

以上の研究は生体内イメージングの価値向上ならびに腫瘍血管透過性亢進メカニズムの解明に貢献し、癌治療薬開発に寄与するところも大きい。

したがって、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 29 年 1 月 27 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。

要旨公開可能日： 年 月 日以降