

氏 名	かわ ぐち みち や 川 口 道 也
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2424 号
学位授与の日付	平 成 14 年 1 月 23 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 分 子 医 学 系 専 攻
学位論文題目	A novel synthetic Arg-Gly-Asp containing peptide cyclo(-RGDf=V-) is the potent inhibitor of angiogenesis (新規合成した Arg-Gly-Asp を含んだペプチド, cyclo (-RGDf=V-)は有効な血管新生阻害剤である。)
論文調査委員	(主 査) 教 授 開 祐 司 教 授 山 岡 義 生 教 授 今 村 正 之

論 文 内 容 の 要 旨

腫瘍は成長増大する際に必要となる酸素や栄養を供給する血管を既存血管より新生させるが、その過程には血管内皮細胞の増殖、移動、細胞外基質への浸潤、接着など幾つかの段階があり、その各段階において細胞接着因子である integrin $\alpha_v\beta^3$ の重要性が示唆されている。一方 Arg-Gly-Asp を含む RGD ペプチドは integrin の ligand であり、その投与により血管新生を抑制するとの報告がある。

今回我々は、新しい RGD を含む環状ペプチドを合成し、その生物学的活性を 2 つの類似体と共に測定し、臨床治療への応用の可能性を検討した。

Cyclo0 (-RGDfV-) (以下 fV)、そのフェニルアラニン基とバリン基間を E-アルケン化した cyclo (-RGDf=V-) (以下 f=V)、フェニルアラニン基をメチル化した cyclo (-RGDf-MeV-) (以下 fMeV) の 3 つの合成環状ペプチドを用いた。integrin $\alpha_v\beta^3$ への親和性を受容体固相法にて測定した所、3 つのペプチドはほぼ同様の親和性を示した。次にヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用い、ビトロネクチンへの接着阻害実験を行った。3 つのペプチドは用量依存性に HUVEC のビトロネクチンへの接着を阻害し、その IC₅₀ 値は fV:21 μ M, f=V:1.3 μ M, fMeV:0.88 μ M であった。ビトロネクチン上での HUVEC の増殖阻害実験をペプチド接触後 48 時間および 72 時間後の細胞数を計測する事によって行った所、48 時間後の IC₅₀ 値は fV:14.56 μ M, f=V:1.23 μ M, fMeV:0.60 μ M であった。72 時間後にはその差はさらに大きくなり、時間依存性であると考えられた。以上、*in vitro* においては fMeV が最も活性が強く、次に f=V そして fV の順番であった。

次に *in vivo* における 3 つのペプチドの抗血管新生作用について検討した。Balb/c ノードマウスにヒト大腸癌細胞株 DLD-1 を 10⁷ 皮下接種し、各ペプチドを 14 日間連日腹腔内投与、15 日目の腫瘍を CD34 にて免疫学的組織染色をする事により腫瘍内血管密度 (MVD) を測定した。各ペプチドを 32.5mg/Kg 一日二回投与したところ MVD は対照群 82.0 $\pm$ 4.4/mm², fMeV 群 77.6 $\pm$ 4.0mm², fV 群 70.2 $\pm$ 3.7mm² (p<0.05), f=V 群 68.8 $\pm$ 3.0mm² (p<0.05) であったが、腫瘍増殖抑制効果としては統計学的有意差を認めなかった。最も高い血管新生抑制効果を示した f=V において、2 倍の濃度 (65mg/Kg) を一日一回投与したところ、MVD は 60.5 $\pm$ 2.0mm² と前回の投与方法より高い血管新生抑制効果を示したが、腫瘍増殖抑制には有意差を認めなかった。以上 *in vivo* においては、f=V が最も高い血管新生抑制効果を示したが、これは E-アルケン化によりペプチダーゼ抵抗性ができたため血中での安定性が増し生体内での高活性が得られたものと推察した。他の *in vivo* 実験系において、MVD の減少に伴い腫瘍増殖抑制効果があるとの報告があるが、腫瘍の種類によってその効果は異なる。今回我々が選んだ DLD-1 は、血管依存性が比較的少ない腫瘍であった可能性がある。

以上の研究により、新たに合成された cyclo (-RGDf=V-) は *in vitro* においても *in vivo* においても高い活性を示し、腫瘍血管新生阻害剤として将来臨床応用が期待出来るが、水溶性が低く高濃度の溶液を作製するとゲル化するなどの問題点があり改良の余地がある。

論文審査の結果の要旨

申請者は腫瘍血管新生において重要な integrin $\alpha_v\beta_3$ に対し拮抗作用を持つ RGD ペプチドに改良を加えた環状 RGD ペプチド cyclo (-RGDfV-) (fV), 新規合成 cyclo (-RGDf=V-) (f=V), cyclo (-RGDf-MeV-) (fMeV) の 3 剤を用いて血管新生阻害効果を比較検討し, *in vivo* における癌抑制効果を検討した。

- 1) integrin $\alpha_v\beta_3$ への親和性を受容体固相法にて比較したところ 3 剤間に差を認めなかった。
- 2) HUVEC を用いた vitronectin への接着阻害実験では, 3 剤とも用量依存的に接着を阻害し, その効果は fMeV > f=V > fV であった。
- 3) vitronectin 上での HUVEC の増殖阻害効果の検討 (48hr, 72hr) でも, fMeV > f=V > fV の順で抑制効果を認めた。
- 4) ヒト大腸癌細胞株 DLD-1 のヌードマウス皮下移植モデルを用いて, 3 剤の腫瘍内血管密度 (MVD) および腫瘍サイズにおよぼす影響を検討した。*in vitro* における検討 (上記 2), 3)) と異なり, f=V と fV が著明に血管新生を抑制したが, fMeV には抑制効果を認めなかった。3 剤とも腫瘍増殖を有意に抑制できなかった。

以上の研究は新規合成ペプチド cyclo (-RGDf=V-) の血管新生に対する阻害作用の解明に貢献し血管新生阻害剤の開発に寄与するところが多い。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13年12月14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。