

|             |                                                                                                                                                      |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | 森 章                                                                                                                                                  |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                            |
| 学 位 記 番 号   | 医 博 第 2101 号                                                                                                                                         |
| 学位授与の日付     | 平成 11 年 3 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 | Vascular endothelial growth factor-induced tumor angiogenesis and tumorigenicity in relation to metastasis in a HT1080 human fibrosarcoma cell model |
|             | (HT1080ヒト線維肉腫細胞モデルにおいて血管内皮増殖因子により誘導される腫瘍血管新生能と転移に関わる腫瘍増殖能)                                                                                           |
|             | (主査)                                                                                                                                                 |
| 論 文 調 査 委 員 | 教 授 日 合 弘 教 授 開 祐 示 教 授 今 村 正 之                                                                                                                      |

論 文 内 容 の 要 旨

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) は血管内皮細胞に特異的な増殖因子である。これまで腫瘍における VEGF の意義について、臨床的検討から VEGF と腫瘍内微小血管数との関連や、VEGF 発現度と腫瘍増殖、転移促進との相関などが報告されてきた。しかし、腫瘍血管新生や転移の形成過程における VEGF の役割の研究は少ない。本研究の目的は、VEGF 遺伝子導入株を樹立し、それを用いて VEGF による腫瘍血管新生を時間的、空間的に解析すること、また VEGF の転移促進作用が転移過程のどの段階で起こっているかについて詳細に解析することである。

ヒト大腸癌標本より RT-PCR で得た全長 hVEGF<sub>121</sub> cDNA を発現プラスミドベクター pCAG-BSD に挿入し、pCAG-BSD-VEGF を作成した。pCAG-BSD-VEGF あるいは pCAG-BSD vector のみをヒト線維肉腫細胞 HT1080 にリポフェクタミン法で遺伝子導入し各 stable 発現株を樹立した。培養細胞の Northern blot, 培養上清の Western blot により株を選択し VEGF 高発現株 (以下, S 株) とコントロール株 (以下, V 株) の各遺伝子導入株を得た。

各遺伝子導入株  $5 \times 10^6$  個をヌードマウス大腿筋に接種後 3 日目または 6 日目に犠死し、Microangiography を施行し腫瘍血管新生を時間的、空間的に評価した。細胞接種 3 日目, S 株由来腫瘍の径は約 1 mm であり、血管新生を腫瘍内には認めず腫瘍周囲の結合組織や筋肉内に認めた。細胞接種 6 日目, S 株由来腫瘍は径が約 5 mm となり、著明な血管新生を腫瘍周囲、特に皮下組織に認め、さらに腫瘍内部にも認めた。肉眼的にも腫瘍を被覆する皮膚に発赤を認め、皮膚及び皮下の血流が豊富であることをうかがわせた。一方, V 株由来の腫瘍では、腫瘍内、腫瘍周囲ともに血管新生は乏しく、肉眼的色調の変化はみられなかった。

腫瘍生着能は、マウス皮下に接種後 5 週以内に腫瘍を形成する最少接種細胞数で評価したところ、S 株では  $2 \times 10^5$  個、V 株では  $1 \times 10^6$  個であった。各遺伝子導入株をマウス皮下に  $4 \times 10^6$  個接種し腫瘍体積を経時的に計測、腹腔内に  $2 \times 10^6$  個接種し 14 日目に犠死、肝内に  $5 \times 10^6$  個接種し 16 日目に犠死、脾内に  $3 \times 10^6$  個接種し 28 日目に犠死せしめ種々の臓器における腫瘍生着増殖能を評価した。皮下、腹腔内、肝内、脾内とも S 株が V 株より有意に亢進していた。脾内接種では、接種直後に大部分の細胞が経門脈的に肝へ流入すると考えられるが、S 株も V 株もともに肝転移は形成しなかった。

マウス大腿筋に接種し 6 日目の腫瘍切片に対し TUNEL 染色を行いアポトーシス細胞を検索した。腫瘍内のアポトーシス細胞は、S 株由来腫瘍では V 株由来腫瘍に比べ有意に少数であった。

以上から、本研究は、VEGF 高発現株を樹立することにより VEGF が血管新生促進作用と腫瘍細胞のアポトーシス抑制作用により、腫瘍増殖を促進することを明らかにし、また、腫瘍細胞の転移標的臓器着床後に細胞増殖を促進することにより転移能を高めていること、さらに、VEGF による腫瘍血管新生は、腫瘍増殖早期には腫瘍周囲に起こり、続いて腫瘍内に新

生血管が形成されていくことを示した。

## 論文審査の結果の要旨

最近、消化器癌においてVascular Endothelial Growth Factor (VEGF) と腫瘍内微小血管増生、腫瘍増殖、転移促進などの相関が報告されている。しかし、腫瘍血管新生や転移の形成過程におけるVEGFの役割について詳細な解析がなされていない。本研究では、VEGFによる腫瘍血管新生を時間的、空間的に解析し、VEGFによる転移促進作用の詳細をVEGF高発現細胞株を作成し解析した。ヒト線維肉腫細胞HT1080にVEGF cDNAを遺伝子導入しVEGF高発現細胞株 (S株) とベクターのみ導入したコントロール細胞株 (V株) を樹立した。Microangiographyによる時間的、空間的な腫瘍血管新生の評価、マウス皮下、腹腔内、肝内、脾内における腫瘍生着増殖能の評価、TUNEL染色によるアポトーシス細胞の検索を行った。S株腫瘍における血管新生は、接種3日目では、腫瘍内には認めず腫瘍周囲に認め、6日目に、腫瘍内部にも認めた。V株腫瘍では、腫瘍内、腫瘍周囲とも血管新生は乏しかった。生着増殖能は、皮下、腹腔内、肝内、脾内ともS株が有意に亢進した。脾内接種では、両株とも肝転移は認めず。腫瘍内アポトーシス細胞は、S株腫瘍で有意に少数であった。以上から、VEGFは、血管新生促進作用とアポトーシス抑制作用により腫瘍増殖を促進し、転移標的臓器着床後の腫瘍増殖促進作用により転移能を亢進すること、またVEGFによる腫瘍血管新生は、腫瘍増殖早期には腫瘍周囲に起こり、続いて腫瘍内に形成されることを示した。

以上の研究は、腫瘍血管新生と腫瘍増殖におけるVEGFの役割の解明に貢献し、腫瘍血管学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、本学位授与中請者は、平成11年2月8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。