京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	山﨑 俊成
論文題目	Tumor microvasculature with endothelial fenestrations in *VHL* null CC-RCC as a potent target of anti-angiogenic therapy （VHL 不活化を伴う淡明型腎細胞癌において、血管内皮 fenestration を伴う腫瘍血管は抗血管新生療法の標的となる）		

（論文内容の要旨）

【背景】淡明型腎細胞癌(CC-RCC)では pVHL の不活化に伴い発現が亢進する遺伝子産物を標的とする治療法が開発され、vascular endothelial growth factor（VEGF）阻害剤による抗血管新生療法が代表的である。実臨床では 20～40%に治療効果を認めるが、事前に効果を予測するマーカーはない。VEGF 阻害に伴うマウス正常血管の形態学的変化の検討により、内皮細胞に多数の Endothelial Fenestration（EF）を持つ血管は VEGF 依存性に増殖・維持されていることが報告されているが、このような形態学的特徴を持つ血管が CC-RCC において抗血管新生療法の標的となっているかは解析されていない。

【目的】CC-RCC において pVHL 不活化が EF を発現する腫瘍血管の増生に寄与しているか、それらの血管が抗血管新生療法の標的となっているかどうかを明らかとすることを目的とした。

【方法】CC-RCC 臨床検体を電子顕微鏡下に観察し、腫瘍血管の EF 発現量を調べた。*VHL* 変異を同定し、EF との相関を検討した。また RCC 細胞株から xenograft を作製し、pVHL 不活化の有無と抗 VEGF 抗体投与による抗腫瘍効果、腫瘍血管の微小血管密度(MVD)や EF 発現量の変化を検討した。次に EF 発現血管の増生における HIF 経路の関与について検討を行った。*VHL*-/- RCC 細胞株に野生型 VHL、さらに HIF-2α を導入した subclone を用いて微小血管の観察を行うとともに、pVHL により制御される血管新生因子を同定するため qPCR array を用いた解析を行った。

【結果】CC-RCC 臨床検体において pVHL 野生型腫瘍に比べ pVHL 不活化腫瘍では、腫瘍血管の EF が有意に多く認められた。この結果は xenograft model においても再現され、*VHL*-/- RCC 細胞由来の腫瘍は *VHL*+/+ RCC 由来のものに比べ腫瘍血管の EF を多く認めた。*VHL*-/- xenograft では抗 VEGF 抗体投与により有意に腫瘍増殖が抑制され、MVD 及び EF が減少したが、*VHL*+/+ xenograft では腫瘍増殖は抑制されず、血管形態の変化を認めなかった。*VHL*-/- 786-0 細胞に野生型 VHL を導入(WT8)した xenograft では EF を発現する血管の増生が抑制された。しかしながら、WT8 に恒常的活性型 HIF-2α を発現させると腫瘍内 VEGF 濃度は 786-0 細胞と同等であるにもかかわらず、腫瘍血管の EF 発現量や抗 VEGF 抗体に対する感受性は戻らなかった。また qPCR array では 786-0 細胞において CCL2 を含むいくつかの血管新生に関わる分子が HIF-2α 非依存的に発現が亢進しており、CCL2 中和抗体投与でも 786-0 xenograft の EF 発現血管が減少した。これらの結果から CC-RCC での EF 発現腫瘍血管の増生には pVHL 不活化による HIF-2α 非依存的経路が関与することが示唆された。

【結論】pVHL 不活化を有する CC-RCC では内皮に EF を多く発現する VEGF 依存性腫瘍血管が存在した。VEGF 阻害によりこれらの血管は消退し、EF 発現の少ない血管が残存することから CC-RCC に対する抗血管新生療法の標的血管であることが示唆された。本形態学的特徴を持つ血管の増殖・維持には VEGF のみならず、HIF 経路を介さず pVHL で制御される CCL2 等も関与しており、新規治療標的になりうると考えられた。

（論文審査の結果の要旨）

淡明型腎細胞癌(CCRCC)において VHL 遺伝子不活化に伴う HIF/VEGF 経路の活性化が腫瘍血管新生に寄与すると考えられ、抗 VEGF 療法が進行性腎癌治療の中心となっている。一方、VEGF 依存性に増殖・維持される血管は Endothelial Fenestration(EF)を発現することが報告されているが、この形態学的特徴を持つ腫瘍血管が CCRCC において抗血管新生療法の標的となっているかは解析されていない。本研究では腫瘍血管の EF を指標とした VEGF 依存性血管の有無が CCRCC の薬剤感受性に与える影響を検討した。CCRCC 臨床検体及び細胞株由来 xenograft において、pVHL 野生型に比べ pVHL 不活化腫瘍では腫瘍血管の EF を有意に多く認めた。抗 VEGF 抗体投与により *VHL*-/- xenograft のみで腫瘍増殖が抑制され、EF 発現血管が消退した。*VHL*-/- RCC 細胞株に wt-VHL を導入した xenograft では EF 発現血管の増生が抑制されたが、さらに活性型 HIF2α を発現させても EF 発現血管は増生せず、抗 VEGF 抗体による抗腫瘍効果は認めなかった。また、pVHL 不活化により CCL2 を含む血管新生関連因子が HIF 非依存的に発現亢進し、CCL2 中和抗体は *VHL*-/- RCC の腫瘍増生や EF 発現血管新生を抑制した。以上より pVHL 不活化は HIF 非依存的経路も介して VEGF 依存性血管の増殖・維持に関与し、これらの血管が抗 VEGF 療法における治療標的であると考えられた。

以上の研究は腎細胞癌の抗血管新生療法に対する抗腫瘍効果の解明に貢献し、個別化治療の選択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 24 年 11 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。

要旨公開可能日： 年 月 日 以降