

氏 名	近 藤 陽 子
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2251 号
学位授与の日付	平 成 12 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 内 科 系 専 攻
学位論文題目	大腸癌の発育進展転移課程における Vascular Endothelial Growth Factor に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 山 岡 義 生 教 授 日 合 弘 教 授 千 葉 勉

論 文 内 容 の 要 旨

一般に腫瘍が 1 mm^3 を越えて増大するためには、血管新生が必要と考えられている。近年、数多くの血管新生因子が報告されているが、なかでも VEGF は、もっとも強力で特異的な血管内皮増殖因子で癌の増殖転移に影響が大きいと推察される。

一方、大腸癌は、一般に adenoma-carcinoma sequence に沿った多段階発癌過程を示すが、浸潤転移に関与する分子の発現動態は解明されていない。本研究は臨床の切除標本を用いて大腸癌の発生、進展過程における VEGF の発現動態を観察することによりその意義を解析し、ついで VEGFcDNA 導入大腸癌細胞株を樹立し、その増殖、転移における意義を検証することを目的とした。腺腫 27 例、早期大腸癌 46 例を用い VEGFmRNA 発現を RT-PCR 法で、VEGF 及び p 53 蛋白発現を免疫組織学的染色法で、マウス抗ヒト CD 31 抗体を用いての免疫組織学的染色法を行い、微小血管密度を算出した。VEGFmRNA 発現は mild-moderate dysplasia では認めず、早期大腸癌の m 癌の段階より発現を認め、sm 癌の段階では 100% の症例で VEGFmRNA 発現を認めた。VEGF 蛋白発現は severe dysplasia より発現陽性となり m 癌では約 62% の症例で発現を認め、sm 癌では全症例で発現陽性であった。

微小血管密度も腺腫、m 癌、sm 癌の順に 3.0 ± 0.55 , 6.1 ± 1.12 , 12.0 ± 1.35 ($0.739\text{ mm}^3/1$ 視野) と進展に伴い増加する傾向にあった。全症例が VEGF 蛋白発現陽性であった sm 癌では、染色強度を 3 段階評価した結果、陽性強度にともない、血管数も増加した。また、VEGF の発現を誘導する因子の一つとして mutant p 53 の関与が報告されているが、m 癌での VEGF 及び p 53 蛋白発現の挙動は、よく一致し免疫染色における染色部位も類似していた。以上の研究より、VEGF による血管新生は腺腫から早期大腸癌への発育進展に関与し、m 癌での VEGF 発現は mutant p 53 により誘導される可能性が示唆された。

ついで、ヒト大腸癌細胞株である LoVo にヒト VEGFcDNA をリポフェクタミン法で遺伝子導入し高 VEGF 発現株を樹立した。高 VEGF 発現株とコントロール株は invitro での増殖能に差はないが、in vivo での増殖能は皮下腫瘍で検討したところ高 VEGF 発現株で有意亢進していた(平均腫瘍体積は高 VEGF 発現株では $5215 \pm 1612.04\text{ mm}^3$, コントロール株で $528 \pm 181.78\text{ mm}^3$) 皮下腫瘍の微小血管密度も有意差があり高 VEGF 産生株では 6.63 ± 1.08 , コントロールの皮下腫瘍では 2.29 ± 1.08 であった。Dorsal air sac 法を用いた血管新生能は、高 VEGF 発現株で旺盛であった。転移能の評価には、脾注肝転移、腹膜播種転移能、同所移植を行い、各々 nude mouse 10 匹で評価した。脾注肝転移では 2×10^6 個の細胞を脾注し、4 週間後に犠死検索した。高 VEGF 産生株では 50% の確率で肝転移を生じ、腹膜播種でも 90% の確率で播種果を生成したがコントロール株では、いずれも認めなかった。さらに皮下腫瘍の一部を回盲部に移植した場合は、高 VEGF 発現株はコントロール株に比べ旺盛な増殖能を示したが、明らかな肝転移は認めなかった。以上の実験的研究より VEGF は、腫瘍の血管新生を誘導することにより腫瘍の増大と転移果での増大に強く関与することが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

本研究では臨床切除標本を用いて大腸癌の発生、進展過程における VEGF の発現動態を観察することにより、その意義を解析し、さらに VEGFcDNA 導入大腸癌細胞株を樹立。その増殖能、転移能における意義を検証した。

大腸腺腫 27 例、早期大腸癌 46 例を用いて RT-PCR 法、免疫組織染色を施行した。

VEGFmRNA 発現は、m 癌から、蛋白発現は severe dysplasia の段階から認められた。

微小血管密度は、腫瘍の進展に伴い増加する傾向にあり、sm 癌では VEGF の染色強度との間に相関関係を有した。

また、m 癌での VEGF 染色陽性部位は DO-7 (抗 p 53 蛋白抗体) での免疫組織染色の陽性部位と一致する傾向にあった。以上より、VEGF 蛋白発現と微小血管密度は、腺腫から早期大腸癌への進展に関与し、m 癌での VEGF 発現は mutant p 53 に誘導される可能性が示唆された。

次に、ヒト大腸癌細胞株である LoVo にヒト VEGFcDNA をリポフェクタミン法で遺伝子導入し高 VEGF 産生大腸癌細胞株を樹立した。高 VEGF 産生株では、in vivo での皮下腫瘍増殖能、Dorsal air sac 法を用いた血管新生能で有意に亢進していた。脾注肝転移、腹膜播種、同所移植実験では、高 VEGF 産生株は高率に、肝転移果、播種果を示したが、同所移植実験では明らかな肝転移は認めなかった。

よって、VEGF は、腫瘍の血管新生を誘導することにより腫瘍の増大と転移果での増大に強く関与することが明かとなった。

以上の研究は大腸癌の発育進展及び転移過程における血管新生の意義の解明に貢献し、消化器病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、本学位授与申請者は、平成 12 年 2 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。