

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 荷見よう子

婦人科癌のなかで卵巣癌は患者の半数以上が進行期で診断され、腹水貯留を伴うことが多い。腹水貯留は腫瘍の大きさとともに余後不良因子であり、卵巣癌の治療において腹水貯留の抑制は原発巣の治療と同様に重要な課題である。本研究は、卵巣癌の主な進展様式の一つである腹腔内播腫に伴う腹水貯留の抑制に遺伝子治療を応用することを目的として、動物実験モデルを用いた基礎実験を行った。RMG-1 ヒト卵巣癌細胞にアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて、強力な血管透過性亢進作用と血管内皮細胞増殖作用を持つ血管内皮増殖因子 (VEGF) に対する内因性阻害因子である sFlt-1 遺伝子を導入し、sFlt-1 発現による血管内皮細胞増殖阻害効果と腹水貯留抑制効果を *in vitro* での血管内皮細胞増殖能とマウス卵巣癌腹水貯留モデルにおいて検討し、下記の結果を得ている。

1. ヒト卵巣癌細胞株 RMG-1 細胞の培養上清を回収し、ヒト VEGF 測定用 ELISA キットで培養上清中の VEGF 濃度を定量し、VEGF 産生を確認した。In Vitro において sFlt-1 および Neo AAV ベクターあるいは Neo AAV ベクターのみを用いて RMG-1 細胞に遺伝子導入をクローンを得た。抗 sFlt-1 抗体を用いた Western blotting において Neo 発現クローンでは sFlt-1 蛋白の発現を認めず、sFlt-1 発現クローンでは細胞抽出液、培養上清共に sFlt-1 蛋白の発現を認めた。

2. In Vitro における sFlt-1 発現細胞増殖能を検討するため、 1×10^5 個の Neo 発現細胞あるいは sFlt-1 発現細胞を撒き 48-, 72-, 96-時間後に細胞数を計数したところ、In vitro において Neo 発現クローンと sFlt-1 発現クローンに増殖能の差を認めなかった。これにより sFlt-1 発現は腫瘍細胞の細胞

分裂に影響のないことが示された。

3. VEGF の血管内皮細胞増殖作用に対する sFlt-1 の阻害作用を検討した。25%の Neo 発現細胞培養上清存在下の 20ng/ml VEGF による増殖刺激で HUVEC は 5 日間で 70%の細胞数増加を示した。この血管内皮細胞に対する VEGF の細胞増殖作用は 25%の sFlt-1 発現細胞培養上清存在下では完全に阻害された。In vitro では VEGF に誘導された血管内皮細胞増殖の効率的な抑制がみとめられた。

4. In vivo における sFlt-1 持続発現による腫瘍形成及び腹水貯留に対する効果を検討した。ヌードマウスに 2×10^7 個/匹の Neo 発現細胞（5 匹）あるいは sFlt-1 発現 RMG-1 細胞（5 匹）を腹腔内移植したところ、5 週後には sFlt-1 発現 RMG-1 細胞移植群において腹水貯留量、腹水中の腫瘍細胞数、赤血球数は有為に低値を示した。直径 2 mm 以上の腹腔内播腫巣の腫瘍数は sFlt-1 発現 RMG-1 細胞移植群において有為に少なかった。これにより sFlt-1 持続発現は腹水貯留、VEGF の血管透過性亢進作用による赤血球漏出および腫瘍増大を抑制することが示された。ヌードマウスに 2×10^7 個/匹の Neo 発現細胞（6 匹）あるいは sFlt-1 発現 RMG-1 細胞（6 匹）を腹腔内移植し生存期間を検討したところ、sFlt-1 発現 RMG-1 細胞移植群の平均生存期間は 70 日であり、Neo 発現細胞移植群の 55 日に比し Wilcoxon 検定上有為に長かった。これには腹水貯留の抑制と播腫巣の増大抑制が関与すると考えられた。

以上、本論文は RMG-1 ヒト卵巣癌細胞に AAV ベクターを用いて、VEGF に対する内因性阻害因子である sFlt-1 遺伝子を導入し、sFlt-1 発現による血管内皮細胞増殖阻害効果と腹水貯留抑制効果を in vitro での血管内皮細胞増殖能とマウス卵巣癌腹水貯留モデルにおいて示した。本研究は、

最近、臨床応用の始まった卵巣癌に対する遺伝子治療を用いて、これまで報告されていた血管内皮細胞増殖阻害効果と腫瘍増大抑制効果のみでなく、sFlt-1発現による腹水貯留抑制効果をはじめて示したものであり、本法が腹水産生悪性腫瘍の有効な治療法となりうることを示唆し、学位の授与に値するものと考えられる。