

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 齋藤桃実

本研究は血管内皮細胞特異的因子アンジオポエチン(Ang)とその受容体 Tie2 のシステムが血管新生および血管透過性にどのように作用しているかを明らかにするため、(1) 培養ヒト血管内皮細胞を用いて Ang-Tie2 系の分子細胞生物学的な解析を、(2) マウス腹水癌の系を用いて *in vivo* における血管新生、血管透過性への Ang-Tie2 系の関与の検討を試みたものであり、下記の結果を得ている。

(1-1). 培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) において Ang1 は MAP kinase を弱く活性化したが、HUVEC の増殖に影響は見られなかった。しかしながら、無血清下において HUVEC にアポトーシスを誘導した系では、Ang1 は VEGF、HGF および bFGF と比較すると弱いながら阻害することが分かった。Ang1 の抗アポトーシス効果には PI3-kinase/Akt 系の活性化が関与していることが示唆された。

(1-2). HUVEC とヒト繊維芽細胞の共培養による管腔形成のモデル系を用いた結果、Ang1 は VEGF、HGF および bFGF 同様、管腔形成量を増大させた。抗 VEGF 中和抗体を各リガンドとともに加えた場合 Ang1 に誘導される管腔形成は著しく阻害されたことから、Ang1 による管腔形成の促進は内在性 VEGF に強く依存していることが示された。

(1-3). 共培養の系において HUVEC のアポトーシスの割合を調べた結果、Ang1 は PI3-kinase 系を活性化することで HUVEC のアポトーシスを抑制し、管腔形成量を増大することが示された。管腔形成中にアポトーシスを起こす HUVEC では活性化 Caspase-3 の発現亢進が免疫染色により確認され、Ang1 の抗アポトーシス効果は Caspase-3 活性化の阻害が関与していることが示唆された。

(2-1). マウス腹水癌株細胞、乳癌 MM2 細胞内の Ang1、Ang2 の発現を RT-PCR 法により確認したところ、ともに発現は認められなかった。6 週齢、C3H/He マウスに MM2 細胞を腹腔内移植し、移植後 7 日目に腹壁を摘出し Ang2 の発現の変化を RT-PCR 法で調べた結果、MM2 細胞移植により腹壁中の Ang2 の mRNA レベルの上昇が認められた。抗 VEGF 中和抗体を用いて MM2 細胞の分泌する VEGF を阻害したところ、腹壁中 Ang2 の発現は抗 VEGF 中和抗体の投与により減少する傾向が見られ、興味深いことに Ang1 は Ang2 と反対に、MM2 移植により発現が下がり、抗 VEGF 中和抗体投与により回復する傾向が見られた。また、免疫組織染色の結果、Ang2 は新生血管の内皮細胞で主に発現していることが示された。

(2-2). 腹水癌における Ang-Tie2 系の阻害を目的に、アデノ Tie2-Fc を 6 週齢、BALB/C ノードマウスに腹腔内投与し、12 時間後に MM2 細胞を腹腔に移植した。血清中の Tie2-Fc タンパク量はアデノ Tie2-Fc 投与後 4 日目に約 34 μ g/ml に達し、10 日目には約 9 μ g/ml まで減少することが分かった。アデノ lacZ 投与と比較し、アデノ Tie2-Fc 投与により MM2 細胞移植後 7 日目における腹水の量、腹水中の腫瘍細胞数に有意な減少が示された。

以上、本論文は (1) HUVEC の単独培養系および繊維芽細胞との共培養系を用いて、Ang-Tie2 系が HUVEC のアポトーシスを阻害し管腔形成を誘導すること、および (2) マウス腹水癌の系を用いて、Ang2 の発現上昇が腹壁における血管新生、血管透過性亢進に関与していることを明らかにした。本研究はこれまで解析が進んでいなかった Ang-Tie2 系の血管新生、血管透過性における作用の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。