

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 バヤス グラン

本研究は、消化器癌細胞を皮下移植したマウスモデルを用いて、腫瘍血管新生におけるケモカイン SDF-1/CXCR4 axis の役割について検討を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 大腸癌、膵癌細胞株を皮下移植したマウスモデルで、腫瘍組織内へに浸潤する細胞を比重遠心で回収し、それらの細胞に共通に発現するケモカインレセプターを RT-PCR 法によりスクリーニングしたところ、二種類の腫瘍でケモカイン受容体 CXCR4 の共通発現が確認され、免疫染色の検討でも CXCR4 が二種類の腫瘍で確認され、一部は腫瘍の血管内皮で発現されていた。
2. GFP 骨髄移植したマウスモデルでの蛍光二重染色で GFP と CXCR4 ダブル陽性細胞が腫瘍血管内皮で発現され、それらの細胞はトータル GFP 陽性細胞に対して大腸癌の Colon38 と膵臓癌の Panc02 のモデルでそれぞれ 3.4% (32.3 ± 2.1 v. s. 961.3 ± 36.8)、2.1% (65.7 ± 4.6 v. s. 3185.7 ± 149.8)であった。
3. 比重遠心で末梢血単核球分画を採取、内皮細胞の培養条件下で *in vitro* 培養したところ、末梢血の血管内皮前駆細胞における CXCR4 の発現も確認された。このことから CXCR4 は骨髄由来血管内皮前駆細胞の腫瘍へのリクルートにも関与する可能性が考えられた。
4. 大腸癌、膵癌細胞株を皮下移植したマウスモデルに、CXCR4 の中和抗体を投与し、中和効果を検討したところ、CXCR4 の中和抗体が二種類の腫瘍の増殖をそれぞれ抑えた。
5. *In vitro* で Colon38 と Panc02 細胞に CXCR4 の中和抗体を添加し、MTT assay で検討した結果、中和抗体は癌細胞そのものの増殖に影響は与えなかった。Colon38 細胞は RT-PCR レベルでは CXCR4 を発現することから、RNAi 手法を用いて Colon38 に CXCR4 を Stable Knock Down した細胞株 (siCXCR4) を樹立した。siCXCR4 細胞をコントロール siRenilla 細胞と *in vitro*, *in vivo* で検討したところ、CXCR4 の Knock Down により癌細胞の増殖に影響は与えなかった。

6. CXCR4 陽性細胞が腫瘍の一部血管内皮で発現された結果から、CXCR4 の中和効果の機序は腫瘍直接でなく血管新生を抑えた可能性が示唆され、さらに検討を進めた。中和抗体の投与群とコントロール群の腫瘍組織で CD31 の抗体で蛍光免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で両群での腫瘍血管数を定量した結果、中和抗体を用いた群ではコントロール群より血管の数は 45% ($p < 0.001$) まで減少した。Laser Doppler imaging system を用いて腫瘍内の血流を測定した結果、中和抗体を用いた群ではコントロール群より血流が 65% ($p < 0.01$) まで減少した。
7. CXCR4 の中和効果と VEGF との関連を検討するため、両群の腫瘍から蛋白を回収して、ELISA Assay で VEGF の濃度を測定した結果、両者で VEGF 蛋白の発現量に有意差が認められなかった。このことは CXCR4 が VEGF と非依存的に腫瘍血管新生に関与することを示している。

以上、本論文は癌細胞を皮下移植したマウスモデルでの検討では、CXCR4 に対する中和抗体の投与により、腫瘍血管新生阻害を介して腫瘍増殖を抑制した。SDF-1/CXCR4 axis が、VEGF の阻害とは異なる血管新生抑制機構として、新たな癌治療の分子標的として臨床応用につながることを期待され、学位の授与に値するものと考えられる。

尚、審査会時点から、論文の内容について以下の点が改訂された。

1. 全体の文章構成については、Abstract を削除して、Conclusion を追加いたしました。
2. Introduction と Discussion のところに図表を加えました。
3. Figure 3 の Legend を修正いたしました。特に、Anti-CXCR4 中和抗体の *in vitro* の濃度、及び CXCR4 の Knock-down 細胞は Single clone ではなく、Stable pool であることを記載いたしました。
4. Anti-CXCR4 中和抗体の中和効果については、すでに動物実験モデルでマウスの CXCR4 を効率よく中和できると報告されておりますが、Methods のところに、文献的なコメントを記載いたしました。
5. 「学位論文の要旨」の結語について一部訂正いたしました。