

論文の内容の要旨

論文題目 **Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Tyrosine Kinase** は血管新生及びマクロファージ系細胞遊走の促進を介して固形腫瘍の増殖に関与する

指導教員 清木 元治 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成17年4月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 村松 昌

論文要旨

背景

血管内皮細胞増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor : VEGF/VEGF-A) とその受容体 (VEGFR-1、VEGFR-2) システムは、正常な血管発生や血管新生だけでなく、がんなどを含む病的血管新生においても非常に重要な役割を担っている。VEGFR-1 及び VEGFR-2 は主に血管内皮細胞に発現しているが、VEGFR-1 はほかにも単球・マクロファージ系細胞において発現が確認されており、細胞の遊走などに関与しているとの報告がある。

腫瘍はその異常な増殖を維持するために、近隣にある既存の血管から新たな血管新生を誘導し、栄養素や酸素の供給を行なう必要がある。腫瘍からは様々な血管新生誘導因子が分泌され、その中でも VEGF は主軸を担っていると考えられている。このように、腫瘍血管と腫瘍増殖は密接な関係にあるため、腫瘍血管新生を阻害し、腫瘍抑制効果を期待する「抗血管新生療法」が 1970 年代に提唱された。それ以降、VEGF をはじめとする血管新生誘導因子が次々と発見され、腫瘍増殖と VEGF/VEGFR に関する研究は盛んに行なわれている。現在までに、原発巣が転移する前に VEGFR-1 陽性細胞がそれを支持するような働きをするという報告や、VEGFR-1 に対する特異的なリガンドであ

る胎盤由来成長因子（Placenta Growth Factor：PIGF）を中和抗体で阻害することにより、有意な腫瘍増殖抑制効果が得られるという報告などがある。

本研究では私は、VEGFR-1 シグナルががんの増殖促進にどのように関与するかを調べた。VEGFR-1 シグナルを解析するにあたり、VEGFR-1 のチロシンキナーゼより下流を欠損しているマウス（VEGFR-1 Tyrosine Kinase-deficient mouse：VEGFR-1 TK (-/-)マウス）を使用した。VEGFR-1 TK (-/-)マウスは、見かけ上正常な発達をするが VEGFR-1 のシグナルのみを欠損しているため、野生型マウスと比較実験を行なうことで VEGFR-1 のシグナル解析において非常に有用なモデルとなると考えられる。

結果

本研究では、まず野生型マウス及び VEGFR-1 TK (-/-)マウスに対して腫瘍移植実験を行ない、その増殖曲線を作成して VEGFR-1 シグナルが腫瘍増殖に寄与するかどうかを検討した。使用した腫瘍細胞は C57BL/6J マウス子宮体部由来子宮がん細胞 HSML 及び同系マウス肺由来肺がん細胞 LLC、同系マウス皮膚由来悪性黒色腫 B-16 を使用した。腫瘍移植実験の結果より、これら 3 種類の腫瘍のうち、VEGFR-1 TK (-/-)マウスに移植した HSML 腫瘍及び B-16 腫瘍の 2 種類の腫瘍増殖が、野生型マウスに移植したものと比較して有意に抑制されていた。一方、LLC 腫瘍の増殖には有意な差は認められなかった。

この腫瘍増殖の抑制効果が、VEGFR-1 シグナルを介した腫瘍血管新生に起因するものかどうかを検討するために、抗 CD31 モノクローナル抗体を用いて、免疫組織化学的染色を行なった。その結果、HSML 腫瘍及び LLC 腫瘍における腫瘍内への血管新生は、野生型マウスに移植した腫瘍と比較して、VEGFR-1 TK (-/-)マウスに移植した腫瘍において、有意に抑制されていた。驚くべきことに、腫瘍内への血管新生は抑制されていたにもかかわらず、腫瘍周辺部位における血管新生は、野生型マウスに移植した腫瘍と VEGFR-1 TK (-/-)マウスに移植した腫瘍で、大きな差は認められなかった。また、腫瘍内の新生血管を定量したところ、HSML 腫瘍内における血管内皮細胞は、VEGFR-1 TK (-/-)マウスに移植した腫瘍内において野生型マウスに移植した腫瘍内に比べ、約 45 %にまで減少していた。

一方、VEGFR-1 を発現している細胞として、単球・マクロファージ系細胞が挙げられる。これらにおける VEGFR-1 シグナルが、腫瘍増殖に関与しているかを検討するた

めに、活性化されたマクロファージを認識する抗 F4/80 モノクローナル抗体を用いて、免疫組織化学的染色を行なった。その結果、野生型マウスに移植した腫瘍内と比較して、VEGFR-1 TK(-/-)マウスに移植した腫瘍内では、F4/80 陽性マクロファージ系細胞の浸潤が、著しく抑制されていた。また、注目すべきことに腫瘍周辺部位への F4/80 陽性マクロファージ系細胞の遊走は、野生型マウスと VEGFR-1 TK(-/-)マウスのもので有意な差は認められなかった。浸潤してきた F4/80 陽性細胞を定量したところ、VEGFR-1 TK(-/-)マウスに移植した腫瘍内部へ浸潤してきた細胞は、野生型マウスの腫瘍内と比較して約 15 %にまで減少していた。

LLC 腫瘍では、VEGFR-1 TK(-/-)マウスに移植した腫瘍内部において、腫瘍血管新生及び F4/80 陽性マクロファージ系細胞の浸潤が抑制されていたにもかかわらず、HSML 腫瘍のものと比較して、いずれも野生型マウスに移植したものと差は小さいものであった。これが腫瘍細胞から分泌される様々な増殖因子やケモカインの違いによるものかを検討するため、培養した腫瘍細胞から mRNA を抽出し、リアルタイム PCR 法によって mRNA レベルでの発現検討を行なった。その結果、HSML 及び B-16 と比べ、LLC においては FGF-2 の発現が約 150 倍にも亢進していた。

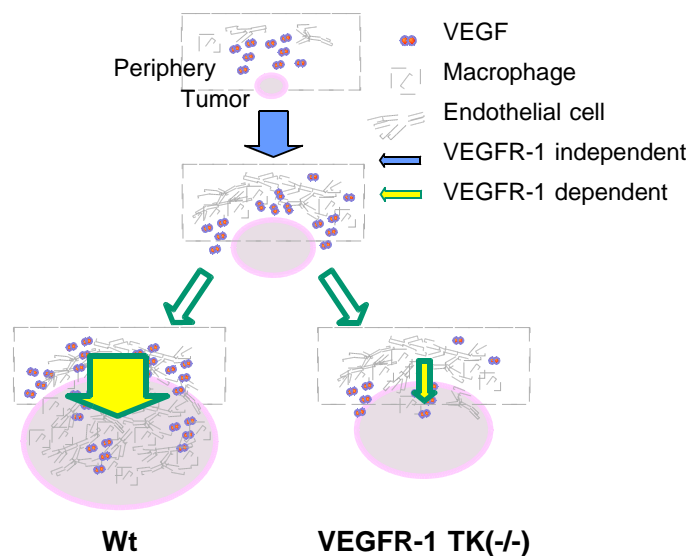
次に、VEGFR-1 を発現している、血管内皮細胞及びマクロファージ系細胞において、どちらの VEGFR-1 シグナルがどの程度寄与しているかを検討するために、骨髄移植実験を行なった。骨髄移植を受けるマウスは野生型とし、骨髄提供をするマウスを野生型 (Wt / Wt) と VEGFR-1 TK(-/-)型 (Wt / VEGFR-1 TK(-/-)) にした。HSML 腫瘍を移植して増殖曲線を作成した結果、Wt / VEGFR-1 TK(-/-)マウスに移植した腫瘍の増殖は、Wt / Wt マウスに移植したものと比較して、有意に抑制されていた。また、腫瘍内への血管新生及びマクロファージ系細胞の浸潤を検討した結果、骨髄を VEGFR-1 TK (-/-)型に置換したマウスにおいて有意に減少していた。以上のことから、VEGFR-1 は腫瘍増殖に関与しており、腫瘍周囲ではなく腫瘍内へ血管新生、細胞浸潤に作用していることが明らかとなった。さらに骨髄由来細胞であり、且つ VEGFR-1 を発現している細胞すなわちマクロファージ系細胞における VEGFR-1 シグナルが、腫瘍血管新生を促進し、結果として腫瘍増殖へと繋がることに大きく関与していることが示唆された。

考察

VEGF-A による血管新生及び腫瘍血管新生には、VEGFR-2 のシグナルによる血管内

皮細胞の増殖が重要であると考えられてきた。しかし本研究において私は、VEGFR-1 TK(-/-)マウスにおける腫瘍移植実験によって、VEGFR-1 シグナルが腫瘍増殖に深く関与していることを見出した。さらに詳細な実験の結果から、腫瘍周辺部位においては野生型マウスと VEGFR-1 TK(-/-)マウスに移植した腫瘍で有意な差が認められなかったこと、VEGFR-1 TK(-/-)マウスに移植した腫瘍では、腫瘍内への腫瘍血管新生及びマクロファージ系細胞の浸潤が著しく抑制されることも明らかにした。すなわち、腫瘍周辺部位への血管内皮細胞及びマクロファージ系細胞の遊走は VEGFR-1 シグナル非依存的であり、腫瘍内組織への浸潤には VEGFR-1 シグナル依存的なシグナルが働いていることが示唆された (図)。腫瘍内へ浸潤したマクロファージ系細胞は、免疫担当細胞としての機能だけでなく、腫瘍関連マクロファージ (Tumor-associated macrophage : TAM) として自ら血管新生誘導因子を分泌し、腫瘍血管新生を亢進するという腫瘍増殖促進作用が報告されている。骨髄移植の実験結果から、骨髄由来細胞は VEGFR-1 を介して腫瘍内に浸潤し、それが腫瘍血管新生及び腫瘍増殖にも寄与することが示唆された。

以上のことから、VEGFR-1 のチロシンキナーゼを標的としたがん治療は、骨髄由来細胞の浸潤を抑え、腫瘍血管を抑制することが示唆されるので、正常血管における副作用を軽減し、抗腫瘍効果が期待できるものと考えられる。



図：腫瘍増殖に関与する VEGFR-1 チロシンキナーゼの有無の概略図