



## Antitumor effect of human gastric cancer and induction of apoptosis by vascular endothelial growth factor neutralizing antibody

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 神谷, 欣志 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1640">http://hdl.handle.net/10271/1640</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 363号	学位授与年月日	平成14年 3月25日
氏名	神谷欣志		
論文題目	Antitumor effect on human gastric cancer and induction of apoptosis by vascular endothelial growth factor neutralizing antibody (ヒト胃癌におけるVEGF中和抗体によるアポトーシスの誘導と抗腫瘍効果)		

博士(医学) 神谷欣志

### 論文題目

Antitumor effect on human gastric cancer and induction of apoptosis by vascular endothelial growth factor neutralizing antibody

(ヒト胃癌におけるVEGF中和抗体におけるアポトーシスの誘導と抗腫瘍効果)

## 論文内容の要旨

### [はじめに]

腫瘍成長は、細胞増殖と細胞死のバランスにより調整されることが報告され、近年抗腫瘍療法におけるアポトーシス誘導の重要性が示されている。血管新生を阻害することによって誘導される“Tumor Dormancy”の概念は、新しい癌治療法の標的として注目されている。腫瘍血管新生は様々な血管新生因子によって誘導されるが、血管内皮細胞に特異的に作用するvascular endothelial growth factor(VEGF)はその代表的な因子の一つである。われわれは、これまでVEGF中和抗体によるヒト消化器癌の腫瘍増殖・転移抑制効果を報告してきた。本研究では、VEGF中和抗体のヒト胃癌に対する増殖・転移抑制作用およびアポトーシスの誘導に関する検討を行い、抗腫瘍効果発現におけるアポトーシスの意義を検討することを目的とした。

### [材料ならびに方法]

当科で樹立したヒト胃癌株MT2ヌードマウス同所移植モデルを作成した。治療群(n=15)では、移植腫瘍組織片を胃壁に縫着後11日目よりVEGF中和抗体100 $\mu$ g/bodyを隔日12回腹腔内投与し、移植42日目にマウスを犠牲死せしめ移植腫瘍重量・肝転移数を測定した。HE染色にて移植腫瘍細胞を2000以上カウントし、Kerrの基準に基づきアポトーシス細胞を同定し、apoptotic index(AI)(%)を算出した。ER-MP12抗体による免疫組織化学染色法にて、移植腫瘍の微小血管を同定し、microvessel density(MVD)を算出した。さらに、northern blot analysisにより、移植腫瘍のVEGFmRNA発現を評価した。

### [結果]

- (1) 移植腫瘍重量(g) ( $0.81 \pm 0.11$  vs  $0.53 \pm 0.05$ ,  $p=0.03$ ; 対照群vs治療群、p値; 以下同)、肝転移個体数 ( $10/15$  vs  $2/14$ ,  $p=0.004$ ) は、いずれも治療群において抑制された。
- (2) MVD(counts/x200 field) ( $33.6 \pm 8.0$  vs  $21.1 \pm 5.4$ ,  $p<0.0001$ ) は、治療群において有意に低値であった。
- (3) AI(%) ( $4.73 \pm 1.11$  vs  $7.26 \pm 1.62$ ,  $p<0.0001$ ) は、治療群において有意に高値であった。
- (4) 移植腫瘍のVEGFmRNA発現は対照群、治療群間で差を認めなかった。

### [考察]

抗腫瘍療法におけるアポトーシスの誘導はその効果発現において重要な過程である。また、腫瘍血管新生が腫瘍成長に必要不可欠であり、血管新生阻害による抗腫瘍効果が報告されているが、その作用機序はまだ十分解明されていない。本研究は、VEGF中和抗体を用いてVEGFの作用を阻害することで、血管新生を阻害し、腫瘍細胞のアポトーシスを誘導することを同所移植モデルで最初に示した報告である。

腫瘍の急速な増大や血管閉塞によって引き起こされる急激な虚血変化においては、腫瘍細胞は壊死に

陥る。しかし、血管新生阻害剤による新生血管の減少は、腫瘍組織の緩徐な低酸素を引き起し、この緩徐な低酸素によりアポトーシスが誘導されるものと考えられた。そして、このアポトーシス誘導により、VEGF中和抗体の腫瘍増殖・転移抑制効果が導かれたものと考えられる。

また、腫瘍細胞におけるVEGFmRNA発現は治療群と対照群とで差を認めなかった。このことは、VEGF中和抗体によるVEGFシステムの阻害による低酸素刺激は、新たなVEGF高発現を引き起こさないことを示唆している。

#### 〔結論〕

VEGF中和抗体はヒト胃癌に対して、腫瘍組織の血管新生を抑制し、アポトーシスを誘導することで、腫瘍増殖・転移抑制効果をもたらすことが示された。VEGF/VEGFレセプターを標的として“Tumor Dormancy”を誘導することで、胃癌患者の予後の改善が期待される。

### 論文審査の結果の要旨

固形悪性腫瘍の多くは、その増殖に必要な栄養や酸素を十分に摂取するために血管新生因子を放出し、腫瘍血管の新生を誘導する。現在この腫瘍血管新生をターゲットにした癌の分子標的治療法が注目されている。腫瘍血管新生を誘導する血管新生因子としてはvascular endothelial growth factor (VEGF) や angiopoietinなどが報告されている。申請者は最も代表的なVEGFに焦点を絞り、その中和抗体を用いて、VEGFの阻害による癌治療の可能性を検討した。特に本研究では、本学第二外科で確立されたヒト胃癌株MT2を用いたヌードマウス同所移植モデルを用いて、モノクローナル抗ヒトVEGF中和抗体の治療効果とその抗腫瘍メカニズムについて解析した。実験結果の概要を以下に示す。

- 1) ヒト胃癌株MT2をヌードマウス胃壁に移植後(肝転移の始まる)11日目VEGF中和抗体を12回隔日投与したところ、対照のPBS投与群に比べて移植腫瘍重量が有意に減少した。
- 2) また、肝転移に関して検討したところ、転移した個体数が有意に減少した。
- 3) PECAM-1抗体を用いた染色により腫瘍組織の血管形成をスコア化したところ、VEGF中和抗体投与により有意に低下することがわかった。
- 4) さらにVEGF中和抗体投与により腫瘍組織においてアポトーシス細胞の数が有意に増加していることを見いだした。

以上の結果よりVEGF中和抗体は腫瘍血管の新生を阻害することにより、原発巣の低酸素状態によるアポトーシスを誘導する抗腫瘍効果を有することが示された。また腫瘍血管新生阻害の転移抑制効果が実験的に証明された。

このように申請者は腫瘍血管新生を分子標的とした治療法が抗腫瘍効果を発揮し、転移にも有効であることを独自のモデルで証明した。さらにMT2細胞はp53変異を有しており、この治療法がp53遺伝子に変異を持つ癌に対してもアポトーシスを誘導する効果がある事が示唆されたことは注目すべき点である。審査委員会ではこれらの研究成果を高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑応答を行った。

- 1) MT2細胞を選択した理由は
- 2) MT2細胞のVEGF発現の程度について
- 3) 肝転移、血管新生阻害の評価方法の妥当性は
- 4) ER-MP2抗体の抗原および特異性は
- 5) アポトーシスの評価方法について
- 6) 移植の生着率、転移率について
- 7) 移植から治療にいたる実験のプロトコールについて
- 8) コントロールの妥当性について
- 9) VEGF中和抗体のサブクラスは
- 10) VEGF中和抗体の認識エピトープとVEGFファミリーに対する特異性は
- 11) 内因性(マウス)VEGFに対する反応性は
- 12) 本治療法で予想される副作用は
- 13) MT2細胞のVEGF受容体を介したVEGF中和抗体の増殖抑制効果をどうして否定できるか
- 14) 低酸素状態でのVEGFmRNAの発現は

これらの質問に対し申請者の解答はほぼ適切であり、問題点も十分理解していた。よって博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 北川 雅 敏  
副査 小出 幸 夫 副査 馬 場 聡