



# 岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

腫瘍血管新生におけるオボムチンの抑制効果に関する超微形態学的ならびに免疫組織学的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小黒, 辰夫 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/2561">http://hdl.handle.net/20.500.12099/2561</a>

氏名(国籍)	小黒辰夫(千葉県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第220号
学位授与年月日	平成13年3月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	腫瘍血管新生におけるオボムチンの抑制効果に 関する超微形態学的ならびに免疫組織学的研究
審査委員	主査 岐阜大学 教授 渡邊 乾 二 副査 信州大学 教授 細野 明 義 副査 静岡大学 教授 碓水 泰 市 副査 岐阜大学 教授 金丸 義 敬

### 論文の内容の要旨

卵白オボムチン(OVM)は卵白蛋白質中の約3.5%を占める繊維性の高い粘性をもつ巨大分子の糖蛋白質である。それは約10-15%の糖を含有する $\alpha$ -サブユニット(分子量約220kDa)と、多かれ少なかれクラスター化したシアル酸(N-アセチルノイラミン酸)を構成体とする50-60%の糖を含有する $\beta$ -サブユニット(分子量約400kDa)から構成されている。

本研究のオボムチンの最大の研究目的は、その分子構造と食品生理学的な活性物質としての機能を解析することにある。これまでの研究において、 $\beta$ -サブユニットと高糖鎖含有の220kDaと120kDaフラグメントが抗腫瘍活性をもつとされてきた。抗腫瘍活性とOVMフラグメントの分子の特性ならびに抗腫瘍活性の機構との関係を明確にするために、前述の220と120kDaフラグメントよりも見かけ上低分子の糖ペプチドを、プロナーゼ処理したOVMから調製した。本研究では、得られた70kDaフラグメント(OVM $\alpha$ 70F)の化学的性質と、二重移植腫瘍系における光学顕微鏡と電子顕微鏡観察に基づいた抗腫瘍活性機構につきまとめた。マウスにおけるMeth-A線維肉腫細胞の移植系にて、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)とその受容体flk-1(KDR)に対し免疫組織化学的ならびに光学および電子顕微鏡的検索を施行したもので、OVM $\alpha$ 70Fがもつ抗腫瘍活性と腫瘍血管新生との関係について検討した。

BALB/cマウスの右腹に $1 \times 10^6$ 細胞と左腹に $2 \times 10^5$ 細胞を同時に移植

した。そしてOVM $\alpha$ 70F (1000  $\mu$ g/マウス/日)または生理食塩水(P S)の各溶液(250  $\mu$ L)を3、4、と5日目に右腹に投与し、それらのマウスを21日間飼育した。そこで、対照群および実験群のマウスは屠殺し、形態学的および免疫組織学的試料を作製した。

OVM $\alpha$ 70Fの化学的組成から、蛋白質部分が $\alpha$ -サブユニットの約35 kDa分子量をもつ糖鎖含有の高い領域であると分かった。二重移植腫瘍系における肉眼的所見として、OVM $\alpha$ 70Fは右腹の腫瘍を直接的にそしてほとんど完全に抑制したが、左腹(遠方)の腫瘍の増殖を間接的に阻害したものの完全阻害とはならなかった。21日目における腫瘍部分の光学および透過型電子顕微鏡による観察から、OVM $\alpha$ 70F処理した右腹腫瘍細胞の大部分が壊死した状態にあり、その左腹のものにおいては一部の細胞が変性した状態にあるとした。さらにOVM $\alpha$ 70F処理していない対照群の腫瘍において、腫瘍周囲には顕著な間質の浮腫が認められ、間質の線維芽細胞は腫瘍塊に対し垂直方向の流れ(正の遊走性)を示し、さらに腫瘍組織に新生血管が多数伸長していた。これに対してOVM $\alpha$ 70F処理した実験群では、間質における浮腫は認めず、そして線維芽細胞は腫瘍塊に対して水平方向の流れ(負の遊走性)が観察され、新生血管の存在は認めなかった。免疫組織学的検索におけるVEGFとその受容体の染色では、実験群および対照群共に、腫瘍細胞、間葉系細胞、毛細血管内皮細胞が陽性であった。それにも拘らず、OVM $\alpha$ 70F処理した実験群では間質の線維芽細胞や血管内皮細胞が、増殖因子に対して反応しなかった点は新知見である。すなわち、腫瘍を取り巻く間質周囲にオボムチンの存在が、増殖因子-受容体の結合を阻止すると結論した。一方、腫瘍周囲の新生血管形成に焦点を合わせ、薄層広視野樹脂包埋法(FSEM)を用いて腫瘍血管網における線維芽細胞の役割について検索した。血管網形成過程において、線維芽細胞は出芽、移動、分枝する血管内皮細胞に付随する形で存在しており、血管新生を誘導するのみならず線維芽細胞自身が血管構築細胞と成りうると結論した。

以上の結果より、OVM $\alpha$ 70F、 $\alpha$ -サブユニット由来の高糖鎖含有フラグメントは、直接的に処理した腫瘍細胞に対して高度の直接的抗腫瘍活性を発揮し、間接的に処理した腫瘍細胞に対して中庸の間接的な抗腫瘍活性を発揮すると分かった。VEGF/receptorの系に仲介して抗血管新生作用をもつことより、腫瘍に対する予防薬として、および化学療法剤としての重要な位置を占めるものと結論した。今後、新たな実験系としてOVMとOVM $\alpha$ 70Fの経口投与による抗腫瘍活性についても明らかにする必要性があると考えた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

卵白オボムチン(OVM)は卵白蛋白質中の約3.5%を占める繊維性の高い粘性をもつ巨大分子の糖蛋白質で、10~15%の糖を含有する $\alpha$ -サブユニット(分子量約220 kDa)と、50~60%の糖を含有する $\beta$ -サブユニット(分子量約400 kDa)から構成されている。

本研究では、プロナーゼ処理したOVMから70 kDaフラグメント(OVM  $\alpha$  70F)を精製し、その化学的性質と、Meth A線維肉腫細胞を用いての二重移植腫瘍系における光学顕微鏡と電子顕微鏡観察に基づいた抗腫瘍活性機構につき解析し、その結果を三章にまとめた。

BALB/cマウスの右側に $1 \times 10^6$ 細胞と左腹に $2 \times 10^5$ 細胞を同時に移植した。OVM  $\alpha$  70F (1000  $\mu$ g/マウス/日)または生理食塩水(PS)の各溶液の250  $\mu$ Lを3、4と5日目に右腹に投与し、それらのマウスを21日間飼育した。そこで、対照群および実験群のマウスを屠殺し、形態学および免疫組織学的試料を作製した。

OVM  $\alpha$  70Fの化学的組成から、蛋白質部分が $\alpha$ -サブユニットの約35 kDaという分子量をもつ糖鎖含有の高い領域であると分かった。二重移植腫瘍系における肉眼的所見として、OVM  $\alpha$  70Fは右腹の腫瘍を直接的にそしてほとんど完全に抑制したが、左腹(遠方)の腫瘍の増殖を間接的に阻害したものの完全阻害とはならなかった。21日目における腫瘍部分の光学および透過電子顕微鏡による観察から、OVM  $\alpha$  70F処理した右腹腫瘍細胞の大部分が壊死した状態にあり、その左腹のものにおいては一部の細胞が変性した状態にあるとした。さらにOVM  $\alpha$  70F処理していない対照群において、腫瘍周囲には顕著な間質の浮腫が認められ、腫瘍組織に新生血管が多数伸長していた。これに対して、OVM  $\alpha$  70F処理した実験群では、新生血管の存在は認められなかった(第I章)。免疫組織学的検索において、腫瘍を取り巻く間質周囲におけるOVM  $\alpha$  70Fの存在が、増殖因子(VEGF、血管内皮細胞増殖因子)-受容体の結合を阻止し、血管新生を抑制するものと結論した(第II章)。

腫瘍周囲の新生血管形成に焦点を合わせ、薄層広視野樹脂包埋法(FSEM)を用いて腫瘍血管網における線維芽細胞の役割について検索した。血管網形成過程において、線維芽細胞は出芽、移動、分岐する血管内皮細胞に付随する形で存在しており、血管新生を誘導するのみならず、線維芽細胞自身が血管構築細胞と成りうると推論した(第III章)。

以上の結果より、OVM  $\alpha$  70F ( $\alpha$ -サブユニット由来の高糖鎖含有フラグメント)は、直接的に処理した腫瘍細胞に対して高度の直接的抗腫瘍活性を発揮し、間接的に処理した腫瘍細胞に対して中庸の間接的な抗腫瘍活性を発揮すると分かった。OVM  $\alpha$  70FがVEGF-受容体の系を介した抗血管新生作用をもつことは、今後、その予防薬あるいは化学療法剤としての重要な発展が期待される。

本論文の審査委員会では、以上の論文構成や内容について慎重に審議した。得られた知見は血管新生阻害という観点から $\alpha$ -サブユニットの抗腫瘍活性を示したもので、学術的に価値があるものと判断された。その結果、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

〈学位論文の基礎となる学術論文〉

- 1) Tatsuo Oguro, Kenji Watanabe, Hisanori Tani, Hifumi Ohishi and Takusaburo Ebina: Morphological observations on antitumor activities of 70 kDa fragment in  $\alpha$ -subunit from pronase treated ovomucin in a double grafted Tumor system. Food Sci. Technol. Res., 6 (3), 179-185 (2000)
- 2) 小黒辰夫、大秋美治・浅野伍朗・海老名卓三郎・渡邊乾二：腫瘍血管新生におけるオボムチンの抑制効果に関する超微形態学的ならびに免疫組織学的研究、日本臨床電子顕微鏡学会誌、33, 89-99 (2001)
- 3) 小黒辰夫、大秋美治・浅野伍朗・海老名卓三郎・渡邊乾二：腫瘍血管網形成における線維芽細胞の役割に関する超微形態学的研究、日本臨床電子顕微鏡学会誌、33 131-135 (2001)

〈既発表学術論文〉

- 1) Z. Q. Samra, T. Oguro, R. Fontaine and M. Ashraf: Immunocytochemical localization of xanthine oxidase in rat myocardium. J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 23 (3), 379-390 (1991)
- 2) T. Oguro, K. Aida, T. Onodera and M. Ashraf: Ultrastructural effects of hydrogen peroxide on the sarcolemma of rat heart. Am. J. Cardiovasc. Pathol., 4 (3), 265-276 (1992)
- 3) T. Onodera, G. Takemura, T. Oguro and M. Ashraf: Effect of exogenous hydrogen peroxide on myocardial function and structure in isolated rat heart. Can. J. Cardiol., 8 (9), 989-997 (1992)
- 4) Kuniharu Aida, Tomoya Onodera, Tatsuo Oguro and Muhammad Ashraf: Hydrogen peroxide-mediated injury to cultured adult rat myocytes. Cardiovascular Pathobiology, 2 (2), 97-106 (1997)