

氏 名（本籍）	岩 花 倫 生（三重県）
学 位 の 種 類	博士（獣医学）
学 位 記 番 号	獣医博甲第 6 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 1 1 年 3 月 1 5 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	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岩手大学
学 位 論 文 題 目	腫瘍誘導新生血管の定量化と薬剤耐性に関する病理学的研究
審 査 委 員	主査 岩 手 大 学 教 授 岡 田 幸 助 副査 帯広畜産大学 教 授 松 井 高 峯 副査 岩 手 大 学 教 授 小 林 晴 男 副査 東京農工大学 教 授 小久江 栄 一 副査 岐 阜 大 学 教 授 柵 木 利 昭

論 文 の 内 容 の 要 旨

固形腫瘍のなかでも悪性腫瘍は宿主血管を腫瘍内へ誘導し、血管を発達させることにより、栄養物の供給と老廃物の排泄を行い、さらに、血液によりガス交換を行って増殖を続ける。腫瘍の血管誘導能を測定するモデルを *in vivo* および *in vitro* で開発することは腫瘍の悪性度との関連、血管新生機序、および薬剤の評価などの研究に有用である。腫瘍が血管新生因子を産生、放出することが見出されてから、その血管誘導現象を確認する方法として、鶏胚漿尿膜、ラット背部皮下組織、ハムスターの頬袋、およびウサギ角膜などの *in vivo* の方法とヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の培養法が確立されるにともない、*in vitro* の方法が開発されてきた。しかしながら、*in vivo* における誘導現象は定量化することが困難であった。

HUVEC の培養法が確立されてから、血管の特性研究をはじめ、薬剤の探索、作用機作研究など多くの研究が進み、HUVEC が汎用されてきた。腫瘍に構築される血管の特徴も明らかにされつつあるが、腫瘍から血管内皮細胞を単離することが困難であったため、HUVEC などを用いて研究が進められてきた。最近、げっ歯類の移植腫瘍から血管内皮細胞が単離され、その特性が報告され、腫瘍血管の *in vitro* の研究への有用性が示された。

本研究では画像解析法を用いて *in vivo* 血管誘導現象の定量化を試みた。具体的には実験腫瘍として汎用されるマウス腫瘍 S180 に誘導されるマウス背部皮下血管の定量化方法の詳細を明らかにし、薬剤の効果判定に応用した。また、マウス腫瘍の培養上清により HUVEC が走化的に遊走し、遊走した細胞数を画像解析により測定することを可能にした。病理所見の定量化に画像解析法が用いられることがあるが、その詳細についての体系的な記載は少な

い。本研究ではマウスの血管網と染色された細胞核を認識するための画像解析手法の詳細を明らかにし、病理所見の客観的評価方法として新たな手法を提案した。加えて、S180 は分泌型の血管新生因子を産生し、その血管新生機序は血管内皮細胞の増殖と遊走を促進することによって示された。

これまでに鶏胚漿尿膜(CAM)あるいは HUVEC などを用いて血管新生阻害物質の探索が行われてきた。そのうちヘパリン結合物質および増殖因子の抗体などは血管内皮細胞の細胞膜で作用し、コラゲナーゼ阻害物質などは細胞外基質で作用する。一方、癌化学療法剤である vincristine (VCR) および taxol などは細胞内に取り込まれて作用する。細胞膜あるいは細胞外基質で作用する物質には細胞内に取り込まれる必要もなく、また、細胞内の生化学的変化の影響も受けないため、その効果は作用部位に到達すれば発現されるが、細胞内で作用する物質は細胞膜代謝あるいは細胞内の解毒酵素の影響を回避しながら作用すると考えられる。本研究ではマウス腫瘍で誘導される血管新生に対して微小管重合阻害作用を有する VCR が単独では効果を示さなかったことから、新生血管に何らかの薬剤耐性機構があると考えられた。また、VCR は各種組織の細胞膜に局在する P 糖タンパク質の影響を受け、エネルギー依存的に細胞外へ排出されることが知られていたことから、この薬剤耐性が P 糖タンパク質による可能性が考えられた。そこで、P 糖タンパク質の機能を阻害する verapamil (VER) を併用したところ、VCR は血管新生を抑制し、新生血管に P 糖タンパク質の発現が強く示唆された。

ヒト、ウシ、およびブタなどの臍帯静脈、大静脈あるいは大動脈から血管内皮細胞が単離され、継代培養に成功し、その性質について明らかにされているが、腫瘍組織由来の血管内皮細胞は報告が少ない。最近、ラットの移植腫瘍に誘導、構築される血管の内皮細胞(tumor derived endothelial cell: TEC)が単離され、その細胞生理学的性状が明らかにされた。本研究では TEC の薬剤感受性について検討することにより、さらに、新たな性質が明らかになった。すなわち、TEC は HUVEC 同様、5-fluorouracil, cisplatin, および mitomycin C などの癌化学療法剤には感受性が低いこと、さらに、HUVEC と異なり、VCR および taxol に対しても感受性が低いことから、TEC には前述したマウス腫瘍誘導血管と同様に P 糖タンパク質による薬剤耐性機構が働いている可能性が示唆された。P 糖タンパク質の存在を確認するために抗 P 糖タンパク質抗体である C219 を用いてウエスタンブロッティングを実施した。その結果、TEC に P 糖タンパク質の発現が認められたが、HUVEC には認められなかった。このことから、腫瘍に構築される新生血管には P 糖タンパク質が発現し、実際、VCR および taxol に対して薬剤耐性を示すことが明らかになった。

以上の研究成果により、マウス肉腫 S180 が誘導する血管新生を画像解析により定量的に解析することが可能となり、その解析方法の詳細を明らかにし、病理形態の画像化および定量化の新しい方法論を見出した。加えて、マウス肉腫 S180 は分泌型の血管新生因子を産生し、その血管新生因子は血管内皮細胞の増殖および遊走を促進することを明らかにした。また、ラット肉腫由来の血管内皮細胞は癌化学療法剤に耐性を示し、その耐性機序は P 糖タンパク質によることが明らかになり、腫瘍に構築される新生血管に薬剤耐性が獲得されていることが示された。これらにより、腫瘍血管の新生を阻害する薬剤を探索する際に、新生血管の薬剤耐性を考慮する必要があると考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

固形の悪性腫瘍は宿主血管を腫瘍内へ誘導し、血管を発達させることにより、栄養物の供給と老廃物の排泄を行い、さらに、血液によりガス交換を行って増殖を続けることが知られており、腫瘍血管の新生が新たな癌治療の標的と考えられている。このため、腫瘍の血管誘導能を測定するモデルを*in vivo*で開発することは腫瘍の悪性度との関連、血管新生機序、および薬剤の評価などの研究に有用である。これまでに腫瘍が血管新生因子を産生、放出することが見出されてから、その血管誘導現象を確認する様々な*in vitro*の方法が開発されてきた。しかしながら、*in vivo*における誘導現象は定量化することが困難であった。

一方、これまでに鶏胚漿尿膜(CAM)あるいはヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)などを用いて血管新生阻害物質の探索が行われ、ヘパリン結合物質、増殖因子の抗体、コラゲナーゼ阻害物質および一部の癌化学療法剤が血管の発達や血管内皮細胞の増殖を抑制することが見出されてきた。

以上の過去の研究を踏まえ、申請者は実験腫瘍として汎用されるマウス腫瘍S180に誘導されるマウス背部皮下血管の定量化を画像解析法を用いて試み、さらに、本方法を用いて癌化学療法剤の効果を検討した。また、ラット腫瘍由来血管内皮細胞(TEC)およびHUVECに対する癌化学療法剤の薬剤感受性を検討し、薬剤耐性因子について追究した。

マウス背部皮下血管の画像解析では大きさの異なる様々な血管の画像を二値化するために、ラプラス変換を応用し、細い不鮮明な血管画像を他の血管と同様に二値化させることができた。また、S180の培養上清によりHUVECの増殖および遊走が促進され、その遊走はS180が産生する増殖因子に走化性を示すことを示唆した。

癌化学療法剤であるvincristine(VCR)およびtaxolなどは細胞内に取り込まれて作用するが、細胞内で作用する物質は細胞膜代謝あるいは細胞内の解毒酵素の影響を回避しながら作用すると考えられている。本研究でマウス腫瘍で誘導される血管新生に対して微小管重合阻害作用を有するVCRが単独では効果を示さなかったことから、新生血管に何らかの薬剤耐性機構があると考えた。また、VCRは各種組織の細胞膜に局在するP糖タンパク質の影響を受け、エネルギー依存的に細胞外へ排出されることが知られていたことから、この薬剤耐性がP糖タンパク質による可能性を考えた。そこで、P糖タンパク質の機能を阻害するverapamil(VER)を併用した結果、VCRは血管新生を抑制したことから、新生血管にP糖タンパク質が発現していることを示唆した。

*in vitro*の薬剤感受性検討においてTECはHUVEC同様、5-fluorouracil、cisplatin、およびmitomycin Cなどの癌化学療法剤に感受性が低かったこと、さらに、HUVECと異なり、VCRおよびtaxolに対しても感受性が低かったことから、TECには前述したマウス腫瘍誘導血管と同様にP糖タンパク質による薬剤耐性機構が働いている可能性を示唆した。P糖タンパク質の存在を確認するために抗P糖タンパク質抗体であるC219を用いてウエスタンブロッティングを実施した。その結果、TECにP糖タンパク質の発現が認められたが、HUVECには認められなかった。このことから、腫瘍に構築される新生血管にはP糖タンパク質が発現し、実際、VCRおよびtaxolに対して薬剤耐性を示すことを明らかにした。

以上の研究成果により、*in vivo*において腫瘍が誘導する血管新生を画像解析により定量化することが可能となり、その解析方法の詳細を明らかにし、病理形態の画像化および定量化の新しい方法論を見出した。加えて、マウス肉腫S180は分泌型の血管新生因子を産生し、その血管新生因子は血管内皮細胞の増殖および遊走を促進することを明らかにした。また、マウス肉腫が誘導する新生血管およびラット肉腫由来の血管内皮細胞は癌化学療法剤に耐性を示し、その耐性機作はP糖タンパク質によることを示した。これらにより、腫瘍血管の新生を阻害する薬剤を探索する際に、新生血管の薬剤耐性を考慮する必要があることを示した。

以上について、審査委員全員一致で本論分が岐阜大学大学院連合獣医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

Quantification of tumour-induced angiogenesis by image analysis
M. Iwahana, Y. Nakayama, N.G. Tanaka, M. Goryo, and K. Okada
International Journal of Experimental Pathology 77 (3): 109~114, 1996

Drug resistance and P-glycoprotein expression in endothelial cells of newly formed capillaries induced by tumors
M. Iwahana, N. Utoguchi, T. Mayumi, M. Goryo, and K. Okada
Anticancer Research 18 (4C): 2977~2980, 1998