HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | Studies on establishment of novel experimental model of human angiosarcoma and VEGF-targeting therapeutic experiment [an abstract of dissertation and summary of dissertation review] |
| Author(s) | 保科, 大地 |
| Description | 配架番号：2058 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(医学) |
| Dissertation Number | 甲第11042号 |
| Issue Date | 2013-06-28 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/53200 |
| Rights(URL) | https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/ |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Daichi_Hoshina_abstract.pdf, 論文内容の要旨 |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

# 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏 名　　保科　大地

Studies on establishment of novel experimental model of human angiosarcoma and VEGF-targeting therapeutic experiment

（新規ヒト血管肉腫の実験モデルの樹立と血管内皮増殖因子標的治療の検討）

**背景と目的**

血管肉腫は、比較的まれではあるが間葉系悪性腫瘍の中で最も悪性度の高い腫瘍のひとつである。血管肉腫は様々な臓器に発生しうるが、最も頻度の高い発生部位は皮膚であり、特に高齢者の頭頸部皮膚に生じる。治療としては、放射線療法や化学療法が施行されているが、しばしば再発や転移を起こし、死の転帰を辿る。血管肉腫の病態は解明されていないことが多いが、この原因の１つにヒト血管肉腫の実験モデルが非常に限られている点があげられる。ヒト血管肉腫の培養細胞は、過去にISO-HASおよびAS-Mの２つの培養細胞が報告されているのみである。また、ヒト血管肉腫の*in vivo*の実験モデルを用いた治療実験はほとんど施行されていない。このような状況が、ヒト血管肉腫に対する有効な治療の確立のための障壁となっているものと考えられる。

血管内皮成長因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)は最も強力な血管新生誘導因子である。悪性腫瘍には、自らを栄養する腫瘍血管新生という病態が存在するが、VEGFはその病態への関与が想定されており、腫瘍の生存に大きな役割を果たしている増殖因子の１つと考えられている。腫瘍の血管新生を阻害することで腫瘍の増大を抑制しうるという想定のもと、VEGFシグナルを標的とした様々な薬剤が開発され、進行期の腫瘍に対してさえ抗腫瘍効果を示すことが報告されている。血管肉腫は、血管内皮細胞由来の間葉系悪性腫瘍と考えられており、VEGFはその病態に大きく関与していていると考えられている。血管肉腫の組織ではVEGFやVEGF受容体(VEGF receptors: VEGFRs)が発現しているという報告から、血管肉腫の増殖や浸潤、転移にはVEGFシグナルが関与していると想定されている。このことから、VEGFシグナルを標的とした治療薬は、血管肉腫に対して有望な治療薬になりうるものと期待されている。今回、上記の仮説を検証するため実験を行った。

**実験方法**

（１） ヒト血管肉腫の実験モデルの作成

手術検体として切除されたヒト血管肉腫の組織の一部を、免疫抑制マウスの皮下に移植して、ヒト血管肉腫の腫瘍組織を生着・増大させた(xenograftの作成)。その後、増大した腫瘍を再度摘出して培養細胞の樹立や*in vivo*実験モデルの作成を試みた。

（２） VEGFを標的とした治療薬による治療実験

培養細胞におけるVEGFおよびVEGFR2の発現を免疫染色やフローサイトメトリー、ウエスタンブロットにて検証した。また、VEGFシグナルが機能しているかどうか検討するため、cell proliferation assayを用いて検討した。その後、VEGFおよびVEGFR2を阻害する薬剤が抗腫瘍効果を発揮するかどうか確認するため、*in vitro*, *in vivo*の治療実験を行った。

（３） 細胞内におけるVEGFの制御の解析

薬剤によるVEGFR阻害により代償的にVEGFの活性が亢進している可能性につき検討した。

**結果**

（１） ヒト血管肉腫の組織の一部を免疫抑制マウス(NOD/*Scid*)の皮下へ移植したところ、暗赤色調の腫瘍の形成が得られた。形成された腫瘍は組織学的にヒト血管肉腫であったため、この腫瘍組織を処理し、血管内皮細胞用培地にて培養したところ、紡錘系の細胞の増殖が得られた。フローサイトメトリーにて培養細胞はhCD31を発現していた。また、*in vitro* tube formation assayにて管腔の形成が確認された。さらに、培養細胞を再び免疫抑制マウスへ移植したところ、ヒト血管肉腫の腫瘍組織が形成された。これらの実験結果から、この細胞がヒト血管肉腫の培養細胞であることを証明し、細胞をHAMONと命名した。また、ヒト血管肉腫の組織は、細切して免疫抑制マウス皮下に継代移植することで維持可能であり、*in vivo*実験モデルとして使用した。

（２） 免疫染色、フローサイトメトリーおよびウエスタンブロッティングによる検討により、HAMONおよびヒト血管肉腫組織はVEGFおよびVEGFR2を発現していることが確認された。また、HAMONはVEGFを添加すると細胞増殖が促進された。そこで、抗ヒトVEGF抗体(bevacizumab)および受容体型チロシンキナーゼ阻害剤(sunitinib malate)を用いた治療実験を行った。しかし、*in vitro*, *in vivo*ともにこれらの薬剤は抗腫瘍効果を示さなかった。

（３） VEGFR2阻害によるVEGFの代償的な発現亢進の可能性につき検討したが、sunitinib malateを投与してもVEGFのmRNA発現およびVEGFタンパクの分泌量には変動がなく、VEGFR2のリン酸化にも変動はなかった。

**考察**

（１） 今回樹立したヒト血管肉腫培養細胞のHAMONは、１）免疫抑制マウス体内で血管肉腫組織を形成する、２）市販の血管内皮細胞用培地にて培養可能である、といった点で過去に報告された細胞株と比較すると有用であると考えられる。また、組織継代を用いた*in vivo*実験モデルも、遺伝子操作により不死化した細胞由来の腫瘍よりも、血管肉腫の病態を反映しているものと考えられる。

（２） 従来、血管肉腫はVEGFおよびVEGFR2を発現しているため、VEGFを標的とした治療薬は有望であると考えられてきた。しかし、これらの薬剤が奏功したという症例報告は散見されるものの、比較的規模の大きい治験の結果はその仮説を強く支持する結果とはなっていない。今回の私の実験はpreclinicalなものではあるが、このような臨床での治療成績と同様の結果となった。しかし、今回の治療実験はbevacizumabおよびsunitinib malateによる単剤での治療であり、他の治療薬の有効性を否定するものではないし、今回単剤での使用で無効であった薬剤も、他の抗腫瘍薬や放射線療法との併用で治療効果を発揮する可能性もある。また、*VEGFR2*遺伝子の変異を有する血管肉腫の症例では、これらの薬剤が奏功するという可能性もある。

**結論**

血管肉腫は非常に予後の悪い間葉系悪性腫瘍であるが、実験モデルがほとんどなかったため、病態の解明が遅れ新規治療薬の開発も進んでいないのが現状である。今回の実験結果、ならびに作成した実験モデルが、今後の血管肉腫の病態解明および実診療に役立てられることを期待する。