



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Identification of Novel Targets for Antiangiogenic Therapy [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	大坪, 嗣輝
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	乙第6905号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56320
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Tsuguteru_Otsubo_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(歯学) 氏 名 大 坪 嗣 輝

	主査 教授	進藤 正信
審査担当者	副査 特任准教授	樋田 京子
	副査 教授	田村 正人

学 位 論 文 題 名

Identification of Novel Targets for Antiangiogenic Therapy
(血管新生阻害療法のための新規標的分子の同定)

審査は、審査担当者全員の出席の下、行われた。

【背景と目的】 ベバシズマブの登場以来、血管新生阻害剤はがん薬物治療の有力な手段の一つとなっており、マルチキナーゼ阻害剤を始めとして、血管新生阻害作用を有する複数の薬剤が上市または開発されている。しかしながら、これら既存の血管新生阻害剤は正常血管の生存にも重要な VEGF シグナルを遮断するため、出血、血栓症、消化管穿孔、創傷治療遅延といった副作用をも有する。そこで本研究では、VEGF 及びその受容体以外の分子を標的とし、腫瘍血管に特異的に作用するより安全かつ有効な血管新生阻害剤の開発を目的として、腫瘍血管特異的に発現する新規標的分子の同定を試みた。

【材料と方法】 近年、正常血管と腫瘍血管は大きく異なることがわかり、腫瘍血管内皮細胞(TEC)を対象とした研究の重要性が益々高まってきている。そこで本研究では、3種類のヒトがん細胞のマウス皮下移植腫瘍から TEC を、マウスの皮膚から正常血管内皮細胞(NEC)をそれぞれ分離培養し、それらの遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイおよび定量的 RT-PCR 法で網羅的に比較解析した。NEC と比較して TEC において発現亢進していた遺伝子については、siRNA を用いてその発現を抑制することによる TEC の細胞増殖または遊走への影響を検討した。機能が確認された遺伝子については、ヒト腎がん患者から切除したがん組織から作成した病理切片ならびにがん組織から分離した TEC における発現を、免疫染色および RT-PCR にてそれぞれ検討した。

【結果と考察】 NEC と比較して TEC において 5 倍以上発現亢進していた 131 個の遺伝子を標的候補遺伝子として選抜した。siRNA を用いた機能解析の結果、腫瘍血管

新生に必須のステップである TEC の細胞増殖または遊走を制御する 5 遺伝子 (Tmem176b, Pcdhb22, Enah, Nsg1, Def6) を見出すことに成功した。これら 5 遺伝子のうち、Tmem176b および Def6 の 2 遺伝子については、in vivo ヒト腎がん TEC においてもその発現亢進が確認された。以上の結果から、Tmem176b および Def6 は、腎がんにおいて腫瘍血管特異的に作用する血管新生阻害剤の新規な標的分子となり得る可能性が示唆された。

【結論】 TEC と NEC の網羅的な遺伝子発現プロファイル解析の結果、異常な腫瘍血管新生を引き起こす可能性のある新規な遺伝子を複数見出すことに成功した。本研究成果は、より安全かつ有効な血管新生阻害剤の開発に繋がる可能性がある。

論文について申請者による概要の説明後、各審査員より、本研究の背景、方法、結果、考察および関連の研究について質問がなされた。主な質問内容は、①これまでにどれくらいの血管新生阻害剤が上市されているのか、②腫瘍血管内皮マーカーに関する報告がいくつかあるが、それらが実用化に至っていない理由は腫瘍血管内皮細胞の質(純度や性質)に問題があったせいなのか、それともマーカーが実用化に向いていないものであったのか、③マイクロアレイにおいて5倍以上腫瘍血管内皮で発現が高かった遺伝子を選抜したとあるが、なぜ5倍を基準にしたのか。また、アレイのシグナルに意味がない(極端に発現が低い)遺伝子を選抜していないか、④がんの種類によって腫瘍血管内皮マーカーの発現レベルに差があるようだが、がん細胞による違いなのか、がんが発生する臓器による違いなのか、⑤がんの悪性度の違いによって腫瘍血管内皮細胞の遺伝子発現に差はあるのか、⑥siRNA による遺伝子のノックダウン効果と phenotype (増殖能、遊走能)の抑制の程度は相関するのか、⑦複数の遺伝子のノックダウンを行うと形質は相乗的に抑制されるのか、⑧マーカーの GOF (正常血管内皮細胞に過剰発現させる)をしたか、⑨DEF6 が Rho family を活性化するのであれば、増殖ではなく遊走に関与しているのではないか、⑩これらの分子の阻害を in vivo でもみているか、などであった。論文提出者はいずれの質問に対しても明確かつ的確に回答し、さらに今後の研究についても発展的な将来展望を示した。

本論文は、腫瘍血管内皮細胞と正常血管内皮細胞の遺伝子発現プロファイルの違いを明らかにし、さらに異常な腫瘍血管新生を引き起こす可能性のある新規な遺伝子を複数見出すことに成功しており、より安全かつ有効な血管新生阻害剤の開発に繋がる可能性を示唆している。本研究には新規性が認められ、今後の歯科医学の発展に大きく貢献するものと評価された。また、学位申請者は、本研究を中心とした専門分野はもとより、関連分野についても十分な学識を有していることが明らかになり、学位申請者は北海道大学博士(歯学)の学位を授与される資格があるものと認められた。