HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Targeting tumor endothelial cells by EGCG causes anti-inflammatory and anti-thrombotic effects [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	賈, 梓
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15958号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92589
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Jia_Zi_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　JIA Zi

審査担当者　主査　教授　樋　田　京　子
副査　教授　北　川　善　政
副査　教授　飯　村　忠　浩

学　位　論　文　題　名

Targeting tumor endothelial cells by EGCG causes anti-inflammatory and anti-thrombotic effects

（腫瘍血管内皮細胞を標的としたEGCG投与による抗炎症・抗血栓効果）

審査は審査担当者全員出席の下，オンラインの公聴会として行われた．はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われ，審査担当者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた．その内容を以下に示す．

腫瘍細胞は血管内皮増殖因子（VEGF）を分泌して血管新生を誘導し，腫瘍の発育に必要な酸素と栄養を供給する．抗VEGF抗体薬：ベバシズマブなどの血管新生阻害剤は，過剰なVEGFによる未熟な血管構造を正常化することにより薬剤送達向上，免疫細胞浸潤の増加をもたらし抗腫瘍効果を発揮する．しかしながら，VEGFは正常血管内皮細胞（Normal endothelial cell: NEC）における生理的な血管新生にも不可欠なため，その阻害剤には副作用が出現する．そのため，腫瘍血管内皮細胞（Tumor endothelial cell: TEC）に特異的な阻害剤の開発は極めて重要である．

腫瘍は炎症性組織であることが知られている．近年，腫瘍微小環境の慢性炎症病態が腫瘍免疫の抑制や腫瘍の浸潤転移の促進につながることが分子生物学的に明らかにされはじめている．申請者らは，TECがん細胞に炎症性シグナルを伝達し,がんの進展に関与することを報告してきた．なお，炎症性血管は血栓形成促進にはたらく．血栓症は高頻度に起こるがんの合併症のひとつである．実際，血栓症によるがん患者の死亡者数はがんによる原病死に次いで2番目に多いことから，その制御は重要な課題である．

緑茶ポリフェノールの一種，エピガロカテキンガレート（EGCG）は，天然の抗酸化剤および抗炎症剤としての機能が広く知られている．そこで，本研究の目的はEGCGによるTECに対する抗炎症および抗血栓効果を明らかにすることとした．

まず，TECとNECにおける炎症性サイトカイン（TNF-α，IL-6，IL-1β）の発現を *in vitro* で比較したところ，TECではこれらの遺伝子発現レベルが有意に高いことが示された．TECにEGCGを処理すると，これら炎症性サイトカインの遺伝子発現レベルが有意に低下した．さらにTECにおける活性酸素レベルの低下，NF-κBリン酸化の抑制もみられ，EGCGはTECに対する抗炎症効果を有することが示唆された．また，TNF-αにより発現誘導される血栓関連因子vWFとTFの発現はEGCG処理により低下した.これらのことからEGCGはTECの炎症抑制を介して血栓形成に抑制的に働く可能性が示された.

以上の結果から,申請者らは EGCGは *in vivo* 投与によってもがん関連血栓症の抑制効果がある

のではないかと考えた.しかし，EGCG は生体内での安定性が低く，消化管からの吸収率も 10%未満のため *in vivo* で十分な血中濃度を維持するのが困難なことから治療薬への応用が進んでいない．そこで申請者は EGCG を効率的に腫瘍に送達させるため，TEC のインテグリンαVβ３に結合する RGD ペプチドを搭載した脂質ナノ粒子 MEND に EGCG を封入した腫瘍血管特異ドラッグデリバリーシステム（EGCG-MEND）を用いて *in vivo* 治療効果を検証した．大腸がん細胞株 CT26 移植腫瘍マウスに EGCG-MEND（10mg/kg ）を尾静脈より 3 日毎，5 回投与後に摘出した腫瘍を組織学的に解析した．CD31 免疫染色により EGCG-MEND 投与群はコントロール MEND 群に比較して微小血管密度の有意な減少を示し血管新生が阻害されたことが示された．また，血管周囲の CD45 陽性免疫細胞は EGCG-MEND 群で有意に減少した．腫瘍内炎症は好中球を刺激し Neutrophil extracellular traps (NET s)を放出させ血栓形成の原因になることが報告されているため，MPO 染色により活性好中球を可視化した．血管周囲の MPO 陽性細胞は EGCG-MEND 群で減少していた．さらに CD41 免疫染色により血小板を解析したところ，EGCG-MEND 群では腫瘍内血栓が減少していた．これらのデータは EGCG が腫瘍内に送達されることにより，血管炎症と血栓形成の抑制が可能であることを示唆していた．近年，免疫チェックポイント分子 PD-L1 発現が腫瘍の炎症状態により誘導されることが報告されている． EGCG-MEND 群ではコントロール MEND 群に比べ腫瘍内の PD-L1 発現細胞が減少し，CD8 陽性 T 細胞数が増加していた．これらのデータは，EGCG による抗炎症作用が腫瘍免疫の改善にもつながることを示唆していた.

本研究は腫瘍血管標的ドラッグデリバリーシステムによる EGCG 投与は血管炎の抑制を介して血栓形成の抑制をもたらすことを示し，がん関連血栓症の予防につながる可能性を示した.

審査は審査担当者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた．以下にその項目を示す.

1) EGCG によって血管内皮細胞における炎症因子発現低下の程度が異なることの考察
2) EGCG が用量依存的に TEC に作用するかどうか
3) EGCG が COVID-19 血栓症に対しても同様の治療効果を持つか
4) 腫瘍と NETs の関係について
5) Treg への作用について
6) がん発症に関わる慢性炎症の例について
7) 緑茶の EGCG 含有量について
8) EGCG の受容体について
9) RGD 搭載 MEND の腫瘍への送達性，特異性について
10) 血管新生阻害剤ベバシズマブと比べた EGCG の長所と短所について

本研究は，EGCG が血管に対する抗炎症作用と抗血栓作用を発揮し，がん患者の予後を改善する可能性を初めて示し学術的にも高く評価されると考えられた．加えて，上記の質疑応答から申請者は本研究内容を中心とした専門分野はもとより，関連分野について十分な理解と知識を有していることが確認された.

以上のことから，審査担当者全員は学位申請者が博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認めた.