

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
丸山 栄 勲	主査 教授 勝 岡 洋 治 主査 教授 大 槻 勝 紀 副査 教授 谷 川 允 彦 副査 教授 森 浩 志 副査 教授 植 木 實
主論文題名 Involvement of angiopoietins in cancer progression in association with cancer cell-fibroblast interaction (癌進展における癌細胞－線維芽細胞間相互作用に関連した angiopoietin の役割)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>血管新生は多様な生理学的プロセスを要し、癌の増殖と転移に必須の事象である。様々な血管新生因子の中でAngiopoietin family (ANGs) はvascular endothelial growth factor (VEGF) との共同作用により、癌増殖の中で重要な役割を果たす因子と考えられている。Angiopoietin-1 (ANG-1) は、Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domain-2(TIE-2)に対するリガンドとして、血管内皮細胞と平滑筋細胞または周皮細胞の結合を強化し、血管の安定と成熟を促進させる。一方、Angiopoietin-2 (ANG-2) は血管内皮細胞で大部分が産生される。ANG-2はANG-1の生理的拮抗タンパクでありTIE-2を競合的に阻害し、血管内皮細胞と周皮細胞との結合を疎にして血管壁を不安定な状態に導く。そこで、申請者は癌の進展と増殖にANGsの関与を想定し、ヒト腎正常組織、腎癌組織内でのANG-1、およびANG-2の局在を免疫組織化学的に検討した。さらに、癌増殖に関して様々な調節作用を持つとされる線維芽細胞に注目し、ヒト腎癌細胞株 SN12、SN-PM6を正常ヒト皮膚線維芽細胞株(HDF)と混合培養することにより、癌細胞のANGs産生における線維芽細胞の影響を検討した。</p> <p>《研究方法》</p> <p>1. 患者背景</p> <p>大阪医大泌尿器科で2001.2月～2002.10月までに根治的腎摘除術を施行された患者12例(男7例、女5例)の組織を用いた。年齢は28～70歳(平均55歳)、臨床病期は(1997年版TMN分類)pT1a 5例、pT1b 5例、pT3a1例、pT3b 1例で、全例にリンパ節転移、遠隔転移を認めなかった。腫瘍組織型は全例が腺癌で、7例はclear cell type、5例がgranular cell typeであり、組織学的異型度は全例Grade 2であった。</p> <p>2. ヒト腎癌組織の検討</p> <p>1) 免疫組織化学</p> <p>癌組織を含む腎の切片を約10<math>\mu</math> mにスライスし、1次抗体として抗ANG-1、ANG-2ポリクローナル抗体を用いて光学顕微鏡で観察した。また、一部組織を70nm厚に薄切し、免疫電顕用に用いた。</p>	

### 3. 細胞培養の検討

#### 1) 免疫組織化学

ヒト腎癌細胞(SN12、SN-PM6)とヒト正常線維芽細胞(HDF)を単独培養あるいは癌細胞とHDFとの混合培養を行い、抗ANG-1、ANG-2抗体を用いて免疫細胞化学的に検討した。

#### 2) ANG-1、ANG-2 のウェスタン・ブロット

上記の癌細胞および線維芽細胞から蛋白を抽出しANG-1、ANG-2のウェスタン・ブロットを行い、それぞれの発現量を検討した。

#### 《研究結果》

##### 1. ヒト腎癌組織での ANG-1 および ANG-2 の発現

1) ANG-1: 正常腎組織では、糸球体を構成する毛細血管と podocyte(足細胞)に ANG-1 が発現し免疫電顕的には糸球体内皮細胞の小胞体にその局在が観察された。腎癌組織では線維芽細胞の小胞体にその発現が認められたが、癌細胞には ANG-1 の発現は見られなかった。

2) ANG-2: 正常腎組織では ANG-2 の発現は認められなかった。癌組織では、癌細胞や組織内の小血管、毛細血管の内皮細胞に著明な発現が認められたが、大血管には発現はみられなかった。免疫電顕の結果も同様であり、正常組織ではその発現は認められず、癌細胞の細胞質内小胞にのみ ANG-2 の局在が認められた。患者の性別、年齢、腫瘍径、組織型、病期等では ANG-1、ANG-2 の発現に有意差はなかった。

##### 2. 線維芽細胞と腎癌細胞との混合培養下における ANG-1、-2 の発現

免疫細胞化学的には、単独培養の腎癌細胞もしくは線維芽細胞においては ANG-1、ANG-2 の発現は認められなかった。しかし癌細胞と線維芽細胞との混合培養では、癌細胞周囲の線維芽細胞に ANG-1 の発現を認め、線維芽細胞と癌細胞が相互に接触している部分ではその発現が著明であった。一方、ANG-2 の発現は癌細胞にのみ発現が認められ、癌細胞と線維芽細胞が接触している部分においてその発現が著明であった。ウェスタン・ブロットでも混合培養した場合にのみ ANG-1、ANG-2 の発現の増強が認められた。

#### 《考 察》

近年の報告では、ANG-1 は血管を成熟させ、血管新生の際にみられる新生血管の発達を阻害することで癌増殖を阻害し、一方で ANG-2 は血管壁を不安定化させ血管新生を促し癌増殖を促進しているのではないかと推測されている。本研究では ANG-1 は腫瘍組織、特に線維芽細胞を中心にびまん性に発現し、ANG-2 は癌細胞の他に血管内皮細胞や、微小血管に発現していた。この結果は、癌増殖の過程においてANGsが関与しており、ANG-2は腫瘍の血管新生に貢献しているという仮説を肯定するものである。また、腫瘍細胞の増殖には (a)線維芽細胞—腫瘍細胞間の直接相互作用、(b)線維芽細胞由来の因子(c)腫瘍細胞—化学因子間の相互作用(d)腫瘍細胞—Extracellular matrix(ECM)といった癌細胞—間質(線維芽細胞)の相互作用が関わっていると考えられている。線維芽細胞は間質を構成する主細胞であり、様々な ECM の分泌源である。最近、線維芽細胞のもつ多様な表現型により、腫瘍細胞の増殖を調節しているといった報告が見られる。今回、申請者が報告した癌細胞と線維芽細胞を混合培養した場合においてのみ ANG-1、ANG-2 が著明に産生されるという所見は癌増殖における線維芽細胞の関与を強く裏付けるもので興味深い。

#### 《決 語》

癌組織内でのANGsの産生において、線維芽細胞が大きな影響を及ぼし、血管新生に関与することで癌細胞の増殖を促進することが示唆された。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	丸 山 栄 勲
論文審査担当者		主 査 教 授 勝 岡 洋 治 主 査 教 授 大 槻 勝 紀 副 査 教 授 谷 川 允 彦 副 査 教 授 森 浩 志 副 査 教 授 植 木 實	
主論文題名 Involvement of angiopoietins in cancer progression in association with cancer cell-fibroblast interaction (癌進展における癌細胞－線維芽細胞間相互作用に関連した angiopoietin の役割)			
論文審査結果の要旨			
<p>癌の増殖、進展において血管新生は重要な役割を担っている。泌尿器科癌についても同様であるが、腫瘍進展における血管新生の詳細なメカニズムについては明らかにされていない。様々な血管新生因子の中で Angiopoietin family (ANGs) は特に vascular endothelial growth factor (VEGF) との共同作用により、癌増殖の中で重要な役割を果たす因子と考えられている。Angiopoietin-1 (ANG-1) は、Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domain-2(TIE-2)のリガンドとして、血管の安定と成熟に寄与している。一方、Angiopoietin-2 (ANG-2) は ANG-1 の生理的拮抗タンパクであり血管壁を不安定な状態に導き、VEGF の存在下に血管新生を誘導する。本研究ではヒト腎正常組織、腎癌組織内での ANG-1、および ANG-2 の局在を免疫組織化学的に明らかにし、ヒト腎癌細胞株 SN12、SN-PM6 を正常ヒト皮膚線維芽細胞株(HDF)と混合培養することにより、癌細胞の ANGs 産生における線維芽細胞の影響を検討し以下の結果を得ている。</p> <p>1) ANG-1 は正常腎組織においては糸球体を構成する毛細血管と podocyte(足細胞)に発現を認め、腎癌組織では線維芽細胞の小胞体にその発現が認められた。</p> <p>2) 正常腎組織では ANG-2 の発現は認められず、癌組織においては癌細胞や組織内の小血管、毛細血管の内皮細胞に著明な発現が認められた。</p> <p>3) 単独培養の癌細胞、線維芽細胞には ANG-1、ANG-2 の発現は認めなかった。癌細胞と線維芽細胞との混合培養では、癌細胞周囲の線維芽細胞に ANG-1 の発現が、癌細胞内に ANG-2 の発現がそれぞれ認められた。</p> <p>4) ANG-1、ANG-2 共に線維芽細胞と癌細胞が相互に接触している部分ではその発現が著明であった。ウェスタン・ブロットでも混合培養した場合にのみ ANG-1、ANG-2 の発現の増強が認められた。</p> <p>以上のことから、線維芽細胞が癌組織内での ANGs の産生および血管新生に関与することで癌細胞の増殖を促進することが示唆された。癌増殖、進展の制御の手段として今後の臨床応用に期待が持たれる。</p>			

以上により、本論文は本学大学院学則第 9 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

ANTICANCER RESEARCH 25(1): 2005 in press