

氏名(本籍)	ごほんぎ たけ し 五本木 武志(東京都)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博乙第1774号
学位授与年月日	平成13年11月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Tumor-host interactions in the gallbladder suppress distal angiogenesis and tumor growth : Involvement of transforming growth factor $\beta$ 1 (胆嚢における腫瘍-宿主反応が遠隔部位での血管新生と腫瘍発育を抑制する : transforming growth factor $\beta$ 1 の関与)
主査	筑波大学教授 医学博士 赤座英之
副査	筑波大学教授 医学博士 野口雅之
副査	筑波大学教授 医学博士 田中直見
副査	筑波大学助教授 医学博士 川上康

### 論文の内容の要旨

#### (目的)

原発胆嚢癌による、遠隔部位での腫瘍発育、血管新生への効果を明らかにする。

#### (対象と方法)

- 1) ひと胆嚢癌細胞株 Mz-ChA-2 を SCID mouse の皮下と胆嚢に別々に移植し、腫瘍の発育曲線 (tumor volume (mm<sup>3</sup>)) を作成した。
- 2) 皮下胆嚢癌マウス、胆嚢胆嚢癌マウス非胆嚢癌マウスの3種類のマウスに cranial window を作成し、さらに collagen gel を移植し、ゲル内の血管新生と微少循環を生体蛍光顕微鏡で観察、3種類のマウスの血中に血管新生抑制因子が存在するかどうかを調べた。
- 3) これら3種類のマウスにおいて、血管新生に関与する7種類のサイトカイン : (BFGF, VEGF, TGF  $\beta$  1, TNF  $\alpha$ , thrombospondin-1, angiostatin, endostatin) の血中レベルを測定した。(ELISA, western blot)
- 4) 皮下胆嚢癌と胆嚢胆嚢癌の TGF  $\beta$  1 の免疫染色を行い、発現の違いを観察した。また、ひと胆嚢癌組織も同様に染色して観察した。
- 5) 非胆嚢癌マウスを用いて、TGF  $\beta$  1 を含んだ collagen gel で angiogenesis gel assay を行い、TGF  $\beta$  1 の *in vivo* での血管新生と微少循環への効果を調べた。
- 6) 胆嚢胆嚢癌マウスと非胆嚢癌マウスにおいて、angiogenesis gel assay を行い、それぞれのマウスで抗 TGF  $\beta$  1 中和抗体腹腔内投与群と生食投与群を作成し、ゲル内の血管新生と微少循環が TGF  $\beta$  1 の活性をブロックすることによりどう変化するかを観察した。
- 7) 胆嚢胆嚢癌マウスと非胆嚢癌マウスの cranial mouse に、2次腫瘍 (Mz-ChA-2) を移植し、その発育と微少循環を観察した。
- 8) cranial window に2次腫瘍を移植した胆嚢胆嚢癌マウスに、抗 TGF  $\beta$  1 中和抗体を腹腔内投与し、2次腫瘍の発育と微少循環が生食投与群とどう異なるかを観察した。

9)  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation method により, TGF  $\beta$  1 の *in vivo* での Mz-ChA-2 cell 増殖への効果を調べた。

#### (結果)

- 1) 胆嚢に移植した胆嚢癌は皮下に移植した胆嚢癌よりも早い発育を示した。
- 2) cranial window 内の collagen gel での血管新生は胆嚢胆嚢癌マウスにおいてのみ阻害され, 胆嚢胆嚢癌マウスの血中に血管新生抑制物質活性があることが判明した。
- 3) TGF  $\beta$  1 が胆嚢胆嚢癌マウスで他の 2 種類のマウスに比べ, 有為に上昇していた。
- 4) TGF  $\beta$  1 の免疫染色により, 胆嚢の胆嚢癌は皮下の胆嚢癌よりも強い染色を示した。  
しかし, 細胞内の染色パターンは組織型によって異なった。Pre-malignant lesion も染色されたが, 正常胆嚢粘膜は染色されなかった。
- 5) 血管新生は TGF  $\beta$  1 を含んだゲル内で, TGF  $\beta$  1 を含まないゲルに比べ, 有為に阻害された。
- 6) 抗 TGF  $\beta$  1 中和抗体投与により, 胆嚢胆嚢癌マウスで観察された血管新生の抑制は, 部分的にリバースされた。しかし, 非胆嚢マウスでは血管新生は抗体投与により変化がなかった。
- 7) 胆嚢胆嚢癌マウスに移植された 2 次腫瘍の発育速度と血管新生は, 非胆嚢マウスに移植された 2 次腫瘍のそれらに比し, 有為に阻害された。
- 8) 抗 TGF  $\beta$  1 中和抗体投与により, 胆嚢胆嚢癌マウスに移植された 2 次腫瘍に血管新生の阻害は, 部分的にリバースされた。しかし, 2 次腫瘍の発育速度 (表面積) は変化がなかった。
- 9) cell proliferation assay で exogenous TGF  $\beta$  1 は Mz-ChA-2 cell の増殖を濃度依存性に有為に阻害した。

#### (考察)

近年, angiostatin, endostatin が発見されて以来, 腫瘍は抗血管抑制因子を産生し, 腫瘍自身の発育を抑制していることが分かってきた。原発巣から分泌される抗血管新生抑制因子のため, 全身の血管新生活性は抑制に傾き, 転移巣は dormant state に保たれるが, 原発腫瘍切除により遠隔転移で血管新生が起こり, 転移腫瘍は爆発的に増大する。腫瘍から分泌される抗血管新生抑制因子を同定し, そのメカニズムを解明することは, 原発腫瘍切除後の抗血管新生治療を行う上で大きな意義を持つと思われる。胆嚢癌は, 消化器系の悪性腫瘍の中でも予後不良の疾患であり, 原発腫瘍切除後早期の遠隔転移の出現症例があるが, いままで血管新生促進, 抑制因子に関する研究報告はなく, マウス胆嚢癌モデル, および転移モデル確立の報告もない。本研究は, 今後の本疾患の抗血管新生治療に関する研究に重要な意義を持つと思われる。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究により, 同所性の胆嚢癌が, 異所性胆嚢癌よりも有意に高い TGF  $\beta$  1 を産生し, TGF  $\beta$  1 は遠隔転移部位において血管新生を阻害するということが明らかになった。一方で, TGF  $\beta$  1 は血管新生抑制作用による原発腫瘍の発育は阻害しないのだろうか。また, 同所性胆嚢癌が, 異所性胆嚢癌より高いレベルの TGF  $\beta$  1 を生産するなら, その抗血管新生作用により, 観察された結果とは逆に, 同所性胆嚢癌は異所性胆嚢癌よりも発育が抑制されるのではないかという疑問が生じる。

その疑問に対し, 原発胆嚢癌は腫瘍サイズも大きく, nutrient supply の意味からも establish されており, TGF  $\beta$  1 と同様, 組織内では他の多くの growth factor が産生されていることが予想される。それらの growth factor が TGF  $\beta$  1 の血管新生抑制作用に打ち勝ち, すべての産生される growth factor の作用の総和として血管新生は促進され, 腫瘍は発育するが, 遠隔微小転移巣では腫瘍血管は未熟で, 他の growth factor の産生が TGF  $\beta$  1 の血管新生阻害作用に打ち勝つのに十分ではなく, 結果的に血管新生は抑制されるのかも知れないという, 著者の考察は妥当で

ある。これらの仮説を検証するには、原発腫瘍と遠隔転移腫瘍の血管新生の比較、およびTGF  $\beta$  1の原発腫瘍への血管新生への影響を明らかにすること、また、同所性および異所性胆嚢癌の他のgrowth factorおよびanti-growth factorの発現を調べることが必要と思われる。これらの研究は今後、腫瘍発育のメカニズムを知る上で非常に重要である。本論文はすでにNature Medicineに掲載されており、今回の審査においても研究内容に対する評価は高いものであった。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める