

る。

以上の研究結果は、LRVES の新たな症状の可能性とその対応を明らかにしたものであり、今後の本症患者の診断や治療に大きく貢献するものと思われる。また最終試験にも合格しており、博士論文としての価値を十分有すると思われる。

氏 名	小 ^こ 寺 ^{でら} 康 ^{やす} 夫 ^ま
学位の種類	博 士 (医学)
学位記番号	医 第 1 0 7 5 号
学位授与の日付	平 成 2 4 年 3 月 2 2 日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	Sunitinib inhibits lymphatic endothelial cell functions and lymph node metastasis in a breast cancer model through inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 3 (スニチニブは VEGFR3 の阻害を介してリンパ管内皮細胞の機能と乳癌モデルにおけるリンパ節転移を阻害する)
論文審査委員 (主 査)	教 授 西 尾 和 人
(副主査)	教 授 植 村 天 受
(副主査)	教 授 高 橋 英 夫

論文内容の要旨

【目的】

リンパ管新生は新しくリンパ管を形成する現象であり、腫瘍内のリンパ管新生は癌患者における転移の進行に関わると考えられている。このリンパ管新生においては、vascular endothelial growth factor receptor3 (VEGFR3) が重要な役割を果たすことが知られている。一方、スニチニブは VEGFR family を含む複数のレセプタータイロシンキナーゼを阻害する低分子阻害剤である。スニチニブは既に臨床で使用されており、血管新生阻害作用を有することが知られているが、そのリンパ管新生に対する効果あるいはリンパ節転移に対する効果は不明であった。そこで、本研究では VEGFR3 を介したリンパ管新生に対するスニチニブの効果を経験細胞と動物モデルを用いて検討した。

【方法】

ヒトリンパ管内皮細胞を用いて VEGFR2/3 とその下流の因子のシグナル伝達に対する影響を Western blot 法で解析した。次に、同細胞を用いて VEGF 刺激による細胞増殖、遊走、チューブ状構造の形成に対するスニチニブの影響を検討した。また、次にルシフェラーゼを発現させた乳癌細胞を移植するリンパ節転移マウスモデルにおいて腫瘍内リンパ管新生とリンパ節転移へのスニチニブの影響を検討した。

【結果】

ヒトリンパ管内皮細胞において、スニチニブは VEGF 刺激下での VEGFR2 と VEGFR3 の自己リン酸化及びその下流の因子である ERK1/2 と Akt のリン酸化を阻害した。また、VEGF 刺激による細胞の増殖、遊走、チューブ状構造の形成を阻害した。一方、抗 VEGFR2 抗体はこれらの機能に対し、部分的な抑制効果しか示さなかった。動物モデルを用いた実験では、スニチニブ治療群マウスの移植部位の腫瘍の増殖が抑制されていた。また腫瘍内におけるリンパ管新生とリンパ節への転移も抑制された。その効果は抗 VEGFR2 抗体治療群に比べて高かった。

【考察】

実験の結果からスニチニブは VEGFR2 と VEGFR3 の VEGF-C/D 依存的なシグナル伝達を阻害し、リンパ管内皮細胞の増殖、遊走、チューブ状構造の形成等を抑制すること、また腫瘍内のリンパ管新生とリンパ節転移も抑制する可能性が示唆された。同様な VEGFRs 阻害剤でもリンパ管新生抑制効果が報告されていることから、VEGFR3 のシグナル伝達経路は転移抑制を意図した治療の有効な標的の一つと考えられる。しかしながら、リンパ管の新生と転移促進の分子メカニズムは複雑であることから、より詳細なメカニズムの解析が必要と考えられる。

【結論】

本研究の結果から、スニチニブは VEGFR3 の阻害を介して腫瘍のリンパ節への転移を抑制し、癌患者の治療に寄与する可能性が示唆された。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2011年6月21日 公 表	出版物名 Breast Cancer Research 第13巻 第3号 R66
	公 表 内 容	2011年6月21日 発 行
	全 文	

論文審査結果の要旨

本論文の概略

申請者は抗がん薬である血管新生阻害剤スニチニブの薬理作用を基礎の生物学的手法を用いて解析し、新規な作用を提示し、新たな治療効果の可能性を示した。

1. 薬剤の新規作用への着眼

申請者は血管新生阻害剤であるスニチニブの分子の特性から、VEGFR2を含む既知のキナーゼに対する阻害作用の他に、VEGFR3に対する新規な作用の可能性を提示している。同時期に他の阻害剤で類似の報告はあるものの、スニチニブに関しては、初めての検討と報告であり、本論文には新規性があると考えられる。

2. 生化学的手法での解析

スニチニブのVEGFR3への作用を解析は、申請者はwestern blotting法を用いて行っている。生化学の基礎的な手法を習得し、データとして示すことができていると考えられる。

3. 細胞生物学的手法での解析

申請者は薬剤の効果を細胞レベルでの作用を解析している。VEGFR3がリンパ管新生に関与することから、リンパ管内皮細胞を選択し使用している。アッセイとしては、内皮細胞の研究で用いられる、増殖阻害アッセイ、遊走アッセイ、tube formationアッセイを行っている。上記アッセイにより、薬剤が、リンパ管の内皮細胞の機能を抑制し、リンパ管新生を抑制する可能性を示すデ

ータが得られている。細胞の取り扱い、アッセイの組み立てについても理解していると考えられる。

4. 免疫化学的手法での解析

申請者は、VEGFRのリガンドであるVEGF-A/Dの癌細胞での発現量を検討するために、ELISA法による測定を行っている。特異的なタンパク質の測定法として妥当な手法であり、VEGFA/Dの発現も確認できている。

5. 動物を用いた薬効の解析

薬剤の効果を検証するために、動物(マウス)のモデルを用いて検証している。通常の手技として、細胞の移植、動物の取り扱い、投薬、腫瘍の測定等を習得し、データを取ることができていると考えられる。

Control群、VEGFR2抗体投与群、スニチニブ投与群を設定し、検討した結果、スニチニブの特異的な効果を示すことができている。

6. 組織学的解析

腫瘍内の血管、リンパ管の密度を測定するために、腫瘍切片の免疫染色を行っている。切片作成、抗体の選択、染色等手法を理解していると考えられる。

各薬剤の投与された腫瘍の切片を比較することで、スニチニブの特異的な血管、リンパ管新生の抑制効果を示唆するデータが得られている。

7. 動物モデルでの癌細胞の転移の解析

癌細胞の転移に対する薬剤の効果を検討するために、ルシフェラーゼとイメージングを用いて解析を行っている。比較的新しい手法であるが、取

り組んでデータを取得している。

画像として、マウス全体、リンパ節、肺の画像を解析することで、転移に対する薬剤の抑制効果を示すことができている。

8. 論文構成

血管新生阻害剤の新規な作用機序の解明として、リンパ管に対する作用を検討するという新しい試みがなされている。その過程において、低分子マルチキナーゼ阻害剤の特性、チロシンキナーゼ VEGFR ファミリーの特徴、VEGFR3 の生理学的役割、腫瘍におけるリンパ管新生の意義等を理解していると考えられる。

またこの分野における、近年の新しい研究成果をフォローし、本研究に役立てている。検証の過程では、仮説に基づき、不十分な点はあるものの、生化学、細胞物学的手法や動物モデル等必要な実験を行っている。

Discussion では他の研究成果の報告を援用しつつ、薬剤の治療効果の可能性について議論している

以上から、本論文は学位論文として十分な内容を有していると考えられる。

氏 名 久保厚子

学位の種類 博士(医学)

学位記番号 医第1076号

学位授与の日付 平成24年3月22日

学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当

学位論文題目 Profile of tyrosine hydroxylase-expressing neurons in the olfactory bulb of prokineticin type 2 receptor-deficient mice during embryonic development
(プロキネティシン受容体2型変異マウス嗅球におけるチロシン水酸化酵素含有神経細胞の発達異常)

論文審査委員 (主査) 教授 重 吉 康 史

(副主査) 教授 伊 藤 彰 彦

(副主査) 教授 楠 進