The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Soluble VEGF receptor 1(sFLT1) induces non-apoptotic death in ovarian and colorectal cancer cells
Author(s)	三宅, 達也
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69277
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　三宅　達也

論文審査担当者		（職）	氏　名
	主　査	大阪大学教授	木村　正
	副　査	大阪大学教授	金田安史
	副　査	大阪大学教授	土岐祐一郎

論文審査の結果の要旨

血管新生阻害因子の一つであるSoluble VEGF Receptor 1 (sVEGFR1/sFLT1)はVEGFなどの血管新生因子と競合し、妊娠高血圧腎症や腎不全などの発症と関連することが知られているが、本論文はsFLT1が血管新生阻害作用に加え、さらに細胞障害性を有するのではないかという仮説に基づいて検討された。卵巣癌細胞株(SKOV-3, HeyA8)及び大腸癌細胞株(HT-29)に対し、内因性に*sFLT1*を遺伝子導入する方法と、外因性にsFLT1を投与する方法の2種類の投与方法により評価を行った。細胞増殖及び細胞傷害の評価として細胞数測定、LDH Release Assayを、アポトーシスの有無の評価として細胞形態、TUNEL染色、ウエスタンブロッディング法、及びFACS法を用い検討した。sFLT1は非アポトーシス経路による直接的な細胞傷害性を有することを確認した。さらにSKOV3を皮下移植した卵巣癌モデルマウスに対しrecombinant VEGFR1を腹腔内投与した群ではPBS投与群に比し腫瘍重量は有意な低下を示した。本研究は、sFLT1がいくつかの癌種に対する将来的な抗癌治療法の候補となることを示したものであり、学位の授与に値すると認める。

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	三宅　達也
論文題名 Title	Soluble VEGF receptor 1(sFLT1) induces non-apoptotic death in ovarian and colorectal cancer cells （sFLT1は卵巣癌及び大腸癌細胞の非アポトーシス経路での細胞死を誘導する）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

Soluble VEGF Receptor 1 (sVEGFR1/sFLT1)は VEGF(Vascular Endothelial Growth factor)や PlGF(Placental Growth factor)といった血管新生因子と競合する血管新生阻害因子である。Soluble FLT1上昇などによるVEGF familyの不均衡は、血管新生の障害に伴い胎盤の増殖を抑制しpreeclampsiaの発症に関連することが知られている。一方で、これまでにsFLT1の直接的な細胞傷害に関する報告はない。胎盤と腫瘍（特に固形癌）はいくつかの共通する性質を有しているが、今回我々は急速に増殖するという共通点に着目し、sFLT1の腫瘍細胞に対する直接的な細胞傷害性を検討した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

卵巣癌細胞株(SKOV-3, HeyA8)及び大腸癌細胞株(HT-29)に対し、内因性にpLV-sFLT1を遺伝子導入する方法と、外因性にsFLT1蛋白を投与する方法の2種類の投与方法により評価を行った。まず細胞増殖及び細胞傷害の評価として細胞数測定、LDH Release Assayを行った。外因性および内因性sFLT1投与により細胞数が減少し、sFLT1蛋白を中和する目的でrecombinant VEGFを培養上清中に投与することで細胞数の減少が抑制されることを確認した。またこの細胞数減少がsFLT1の直接的な細胞傷害性であることをLDH Release Assayを用いて確認した。

次に、細胞死のメカニズムとしてアポトーシス経路の関与について検討した。細胞形態、TUNEL染色、ウエスタンブロッディング法によるCaspase-3及びリン酸化Aktの発現、またFACS法によるAnnexinⅤを評価した。細胞形態の観察により、pLV-sFLT1遺伝子導入細胞ではネクローシス誘導細胞と類似する形態を示すことを確認した。またsFLT1投与群においてTUNEL染色陽性細胞数の増加、cleavaged Caspase-3及びリン酸化Akt発現の上昇、AnnexinⅤ陽性細胞数の増加などを認めず、細胞傷害はアポトーシス経路を介するものではないことを確認した。

さらに、sFLT1投与により細胞増殖自体が抑制されていないかに関して検討した。ウエスタンブロッディング法によるリン酸化ERK及びJNKの発現、BrdU Cell Prolifelation Assayを検討したところ、sFLT1投与により細胞増殖自体は抑制されていないことを確認した。以上より、sFLT1は非アポトーシス経路による直接的な細胞傷害性を有することがわかった。

最後に、SKOV3を皮下移植した卵巣癌モデルマウスに対しrecombinant VEGFR1を腹腔内投与した群ではPBS投与群に比し腫瘍重量は有意な低下を示した。これらのマウスにおいて高血圧・蛋白尿などの重篤な副作用は認めなかった。

〔総　括(Conclusion)〕

sFLT1がいくつかの癌種に対する将来的な抗癌治療法の候補となることが示唆された。