



Title	Inhibition of angiopoietin 2 attenuates lumen formation of tumour-associated vessels in vivo
Author(s)	鈴木, 玲
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76221
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)		鈴木 玲	
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	大阪大学教授	土岐 祐一 郎
	副 査	大阪大学教授	小川 和彦
	副 査	大阪大学教授	奥山 宏臣

論文審査の結果の要旨

Angiopoietin 2(Ang2)は血管内皮細胞（以下、内皮細胞）と血管周皮細胞（以下、周皮細胞）の協調に関わり、血管新生阻害療法の有望な標的とされる。Ang2中和peptibody L1-10でAng2を阻害したときの腫瘍血管の増殖・内腔形成への効果をVEGF中和抗体によるVEGF阻害と対比して検討した。周皮細胞が存在しない*in vitro*実験ではAng2は内皮細胞の増殖・内腔形成に影響を与えなかった。

一方マウス皮下腫瘍モデルでは、VEGF中和抗体により血管径と血管数が減少し腫瘍は有意に縮小した。L1-10投与群でも腫瘍は縮小したが、その腫瘍血管は周皮細胞の裏打ちが過剰となった結果、内腔形成が著しく抑制され、針金状となった。本研究は、腫瘍血管の内腔形成（血管の分化）にAng2が寄与することを初めて示したものであり、博士（医学）の学位授与に値すると考えられる。

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	鈴木 玲
論文題名 Title	Inhibition of angiopoietin 2 attenuates lumen formation of tumour-associated vessels <i>in vivo</i> (アンジオポエチン2阻害は <i>in vivo</i> で腫瘍血管の内腔形成を抑制する)
論文内容の要旨	
〔目 的(Purpose)〕	
Angiopoietin 2 (Ang2)は83kDaの糖蛋白で、アンジオポエチン受容体Tie2 との結合を介して血管内皮細胞（以下、内皮細胞）と血管周皮細胞（以下、周皮細胞）の協調に関わっている。 教室の研究グループはヒト大腸癌肝転移切除標本を用いて血管新生に関与する分子Vascular endothelial growth factor (VEGF), Ang1, Ang2, Tie2 のmRNA量を定量し、VEGFとAng2のmRNA発現量に正の相関関係があり（相関係数$r=0.55$、$p=0.002$）、VEGFとAng2 が協働して大腸癌肝転移巣の腫瘍血管新生に働く可能性を示した（Ogawa M. <i>et al.</i>, Hepatology 2004）。しかし、先行研究では分子発現の解析に留まり、機能的な解析はなされておらず、またAng2を阻害した場合の抗腫瘍効果についてはほとんど不明であった。本研究は、Ang2 阻害が腫瘍血管の増殖・内腔形成に果たす役割をVEGFと対比して<i>in vitro</i>と<i>in vivo</i>で明らかとすることを目的とした。	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
Ang2 阻害には、Ang2 に結合するペプチドとヒト免疫グロブリンの重鎖不変領域（Fc 領域）を遺伝子工学的に融合させた Ang2 中和合成タンパク（peptibody）L1-10（Amgen, USA）を、VEGF 阻害には抗 VEGF 中和抗体（IBL, Japan）を使用した。実験に先立ち、L1-10 が濃度依存的に Ang2 と Tie2 の結合を阻害することを ELISA 実験系で確認した。 <i>in vitro</i> の検討：ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）を VEGF（0, 25 ng/mL）と Ang2（0, 50, 200 ng/mL）または L1-10（0, 200, 400 μg/mL）存在下にコラーゲングエル（0.06% I 型コラーゲン、Cellmatrix I-A）上で培養した。内腔形成能とインテグリン-細胞外マトリクスシグナル相互作用の下流で内腔形成に関与する Rac1 と CDC42 の発現をウェスタンブロット法により評価した。 コラーゲングエル上で VEGF は HUVEC を増殖させ内腔形成を促進し、Rac1 と CDC42 の発現を増加させた。一方、Ang2 および L1-10 は各濃度で HUVEC の増殖や内腔形成に変化を与えず、Rac1 と CDC42 発現にも影響を与えなかった。 <i>in vivo</i> の検討：VEGF と Ang2 を分泌するヒト大腸癌由来細胞株 KM12SM を 4 週齢ヌードマウス背部皮下に移植した xenograft model を作成し、薬剤を投与した。コントロール群（IgG200 μg 腹腔内投与）、抗 VEGF 抗体群（200 μg 腹腔内投与）、L1-10 群（2 mg/kg 皮下投与または 5 mg/kg 皮下投与）の 3 群で、腫瘍体積と免疫組織化学的に腫瘍血管を評価した。内皮細胞は抗 CD31 抗体、周皮細胞は抗 αSMA 抗体を用いて染色した。内皮細胞と周皮細胞の関係を見るために CD31 と αSMA の二重染色を行った。血管面積（内皮細胞の外縁をトレースした面積）と内腔面積（内皮細胞の内縁をトレースした面積）を画像処理して算出、比較した。 コントロール群では、不整な形の内腔をもった腫瘍血管が豊富に形成された。抗 VEGF 抗体群の腫瘍体積は有意に縮小し、血管径および血管数は減少した。L1-10 群の腫瘍体積も容量依存的に縮小したが、組織像は抗 VEGF 抗体群と大きく異なっていた。L1-10 群の腫瘍血管は線状に伸長しているものの内腔形成が著しく抑制された。血管面積は、抗 VEGF 抗体群でコントロール群と比較して有意に縮小していたが（$p<0.01$）、L1-10 群で有意差はなかった。一方、内腔面積は、抗 VEGF 抗体群、L1-10 群ともにコントロール群より有意に減少した（$p<0.01$）。内腔面積と血管面積の比は、抗 VEGF 抗体群で有意差なく、L1-10 群はコントロール群より有意に減少した（$p<0.01$）	
〔総 括(Conclusion)〕	
周皮細胞が存在しない内皮細胞単独の <i>in vitro</i> 実験で Ang2 は内皮細胞の増殖および内腔形成に影響を与えなかった。一方、周皮細胞が共存する <i>in vivo</i> 実験では、Ang2 阻害によってマウス皮下腫瘍での抗腫瘍効果が得られ、血管内腔形成の著しい抑制がみられた。これらの所見から、Ang2 が腫瘍血管の内腔形成に重要な役割を演じている可能性が示唆された。	