

学位の種類	課程博士	氏名	丹野幸恵
-------	------	----	------

学位論文題目

Human small cell lung cancer cells express functional VEGF receptor (flk-1/kdr) and VEGF-C receptor (flt-4)

(ヒト肺小細胞癌における VEGF レセプターの機能的発現に関する研究)

共著者名

大崎能伸 中西京子 豊嶋恵理 菊池健次郎

未公表

研究目的

Vascular endothelial growth factor (VEGF)と、そのレセプター(VEGF-R)は血管新生とリンパ管新生に関与している。 VEGF は VEGF(-A)から VEGF-E までの5つのファミリーに分類されている。また、VEGF-R には VEGF-R1、VEGFR-2、VEGF-R3 の3種類があり、それぞれ flt-1、flk-1/kdr、flt-4 とされている。VEGF は flt-1 と flk-1/kdr に結合し、VEGF-B は flt-1 のみに結合して主に血管新生に関与する。VEGF-C と VEGF-D はいずれも flk-1/kdr と flt-4 に結合し、リンパ管内皮細胞の増殖に関与するとされている。VEGF-E は flk-1/kdr のみに結合し、強い血管新生活性、透過性亢進をもつことが近年明らかにされた。これまでに、正常組織に加え、腫瘍の増殖・転移における VEGF と VEGF-R の生物学的な役割についての研究結果が報告されている。肺癌、乳癌、血液悪性腫瘍などにおいては、VEGF と VEGF-R の発現が見られ、これらが血管新生を促すことにより腫瘍の増殖と遠隔転移を促進し、ひいては生存期間の短縮に寄与する可能性が指摘されている。

肺癌では、非小細胞癌においては、VEGF の発現と転移との関連についての研究がなされている。一方、増殖速度が速く、初期より遠隔転移を生じ易い特性を持つ肺小細胞癌においては VEGF の発現の報告をみるのみで、VEGF-R 系の発現や、これら VEGF 系の癌細胞の増殖・転移などに関わる分子生物学的機序についての検討はなされていない。そこで本研究では、ヒト肺小細胞癌における VEGF と VEGF-R の発現パターンと、低酸素刺激による VEGF 系への影響、および VEGF 系の増殖・転移などに関する機序など生物学的な意義について検討した。

材 料 ・ 方 法

(材料)

American Type Culture Collection (ATCC) より購入した、5つの肺小細胞癌株、NCI-H82、NCI-H209、NCI-H510、NCI-H526、NCI-H660 を用いた。

(方法)

- 1) 肺小細胞癌細胞より抽出した蛋白を用い、VEGF、VEGF-C とそれらのレセプターである flk-1/kdr、flt-4 の発現を western blotting で検討した。また、低酸素刺激による発現の変化を、18時間の低酸素培養後に western blotting で検討した。
- 2) 肺小細胞癌に発現する VEGF-R が機能性か否かを検討する目的で、レセプターの下流に属する VEGF-R と MAPK の磷酸化の有無を検討した。ここでは、NCI-H82 を 0.5%の血清で48時間培養の後に、VEGF と、現時点で VEGF-C が商品化されていないためその代替として VEGF-D をいずれも 10ng ずつ加えた。VEGF-R では、添加の10分後の蛋白を抽出し、flk-1/kdr では磷酸化抗体を用いた western blotting、flt-4 では phosphotyrosine による免疫沈降ののちに western blotting を行った。MAPK では添加後、経時的に15分後までの蛋白を抽出し、western blotting により検討した。
- 3) 肺小細胞癌の増殖に関わる VEGF 系の役割を検討する目的で、1ng/ml の VEGF あるいは VEGF-D の添加と、それらの中和抗体の添加による癌細胞数の経時的な変化を growth assay によって検討した。ここでは、様々な程度にレセプターを発現する NCI-H82、NCI-H209、NCI-H660 の株を用い、無血清状態で、培養開始の24、48、72時間後における細胞数を顕微鏡下で算定した。
- 4) 肺小細胞癌における転移に関わる VEGF 系の役割を検討する目的で、VEGF および VEGF-D を添加し、癌細胞の浸潤性の変化を migration assay によって検討した。0.5%の血清で8時間の前培養の後、VEGF あるいは VEGF-D をそれぞれ 0ng/ml、1ng/ml、10ng/ml ずつ添加し、24時間の培養の後、matri gel に浸潤している癌細胞を Diff Quick で染色し、顕微鏡下で細胞数を算定した。
- 5) 統計学的解析では、2群の独立したデータでは対応のない2群の t-test、3群以上の平均値の差の検定では1元配置 (ANOVA) を用いた。また、p 値が 0.05 未満の場合に有意差がある、とした。

成 績

- 1) ヒト肺小細胞癌株における発現：検討に用いた5つの肺小細胞癌株すべてにおいて、抽出した蛋白を用いた western blotting により VEGF、VEGF-C と flk-1/kdr、flt-4 の発現を認めた。また、NCI-H82 を用いた低酸素刺激では、18時間の低酸素培養ののちに抽出した蛋白を用いた western blotting で検討した結果、VEGF と VEGF-R の発現は、いずれも有意に増加していることを認めた。一方、すべての western blotting において、プロテイング膜から抗体を除去したのちに、コン

トロールとしてのベータアクチン抗体を用いて、再度 western blotting を行ったが、いずれの blotting においても等量のサンプルが用いられていることを確認した。

- 2) **VEGF-R とその下流の MAPK におけるシグナル伝達**：低血清濃度の培養により、VEGF-R と MAPK の磷酸化を抑制した後に VEGF あるいは VEGF-D を添加した結果、添加の5分後より flk-1/kdr、flt-4 と MAPK のいずれも磷酸化を認めた。磷酸化のシグナルを確認した後、プロットティング膜から抗体を除去して total のレセプター、あるいは total-MAPK にて再度 western blotting を行った結果では、刺激前後において等量のサンプルを用いていることが確認された。
- 3) **Growth assay**：無血清状態での培養であるため、培養開始より24時間、あるいは48時間後をピークに細胞数は減少を示した。VEGF、VEGF-D のいずれの添加によっても、細胞数はコントロールである無添加の条件に比べ有意に増加した ($p < 0.05$)。flk-1/kdr と flt-4 の中和抗体の添加では、陰性コントロールであるマウス IgG の添加に比し、統計的に有意差を得るにはいたらなかったが、細胞数は減少する傾向を示した。
- 4) **Migration assay**：低血清状態で培養したのみのコントロールにおいても癌細胞の matri gel への浸潤は見られたが、VEGF の添加により、癌細胞の浸潤は濃度依存性に増加した。しかし、VEGF-D の添加では、癌細胞の浸潤には有意な変化はみられなかった。

考 案

肺小細胞癌では、c-kit や natriuretic peptide receptor などのペプチドレセプターの発現が報告されているが、通常、これらの発現量は少なく、検出が難しい。本研究によって、western blotting で肺小細胞癌における flk-1/kdr と flt-4 の発現が初めて確認され、また、低酸素刺激によって、VEGF と VEGF-C、flk-1/kdr と flt-4 のいずれも発現が増加することが初めて示された。この機序として、低酸素刺激による Hypoxia-inducible factor-1 の VEGF の転写の加速や、VEGF の mRNA の安定性の促進などの機序が指摘されているが、同様の機序が肺小細胞癌においても関与していることが推察される。

次に、肺小細胞癌における VEGF-R が生物学的に機能的であるか否かを見るために VEGF-R と MAPK の磷酸化について検討した。上皮細胞においては、VEGF が VEGF-R に結合した後に VEGF-R や MAPK の磷酸化を引き起こし、細胞内情報伝達を介して細胞分裂が誘導される。肺小細胞癌では、VEGF、VEGF-D のいずれの添加によっても VEGF-R および MAPK そのものが磷酸化されることが示され、肺小細胞癌における VEGF-R は細胞内にシグナルを伝達しており、生物学的に機能的であると考えられた。

Growth assay では、3つの細胞株、NCI-H82、NCI-H209、NCI-H660 のいずれにおいても、VEGF、VEGF-D のいずれの添加によっても細胞数は増加し、かつ、VEGF-R の中和抗体の添加による細胞数は、陰性コントロールであるマウス IgG の添加に比べ減少を認め、肺小細胞癌の細胞増殖に関する VEGF-VEGFR を介した調節系が存在していることが示された。

Migration assay では、VEGF の添加により浸潤性の増加がみられたが、VEGF-D の添加では変化しな

った。この成績は VEGF が肺小細胞癌の浸潤・転移に寄与する可能性を初めて示したものと考えられる。VEGF は、細胞の遊走や浸潤を刺激することが報告されている。この機序として、肺癌細胞では検討はみられないが、白血病細胞では、VEGF により転移・浸潤に関与する matrix metalloproteinase (MMP) が産生されること、また、乳癌細胞においては、fibronectin の存在下で VEGF により MMP が産生されることが知られている。本研究では、VEGF-D の添加では VEGF の添加と異なる成績が得られたが、その詳細は明らかではなく、今後の検討を要すると考えられる。

結 語

本研究の結果、肺小細胞癌において既に報告されている VEGF の発現に加え、VEGF-C、flk-1/kdr、flt-4 の発現が認められること、これらは、生物学的に機能性であり、シグナルを伝達することが初めて示された。さらに、肺小細胞癌におけるこれらの VEGF-VEGF-R 系を介した機序が、細胞増殖、細胞浸潤、遠隔転移などに関与する可能性が強く示された。

引 用 文 献




1. Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol.* 237: 1-30, 1999.
2. Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. and Poltorak, Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 13: 9-22, 1999.
3. Nicosia, R. F. What is the role of vascular endothelial growth factor-related molecules in tumor angiogenesis? *Am J Pathol.* 153: 11-16, 1998.

参 考 論 文

1. Ohsaki Y, **Tanno S**, et.al. Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer patients with p53 overexpression. *Oncol. Rep.* 7(3):603-7, 2000.
2. Satoshi Tanno, **Sachie Tanno**, et. al. AKT activation up-regulates insulin-like growth factor I receptor expression and promotes invasiveness of human pancreatic cancer cells. *Cancer Research* 61(2) p.589-593, 2001.
3. **Sachie Tanno**, Yoshinobu Ohsaki, et. al. Spontaneous rupture of the amyloid spleen in a case of usual interstitial pneumonia. *Internal Medicine* 40(5) p.428-431, 2001.
4. 丹野幸恵、大崎能伸、他。医療職員の結核多発が疑われた事例。日本胸部臨床。61(2) p.179-182, 2002.

5. Yoshinobu Ohsaki, Kaneyoshi Takeyama, Syoko Nakao, **Sachie Tanno**, et.al. Detection of photofilin fluorescence from malignant and premalignant lesions in the bronchs using a full-color endoscopic fluorescence imaging system: a preliminary report. *Diagnostic and Therapeutic Endoscopy* in press

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	丹 野 幸 恵
審査委員長 <u>小川 隆幸</u> 			
審査委員 <u>池田 唯博</u> 			
審査委員 <u>菊池 健次郎</u> 			
学 位 論 文 題 目			
Human small cell lung cancer cells express functional VEGF receptor (flk-1/kdr) and VEGF-C receptor (flt-4) (肺小細胞癌における VEGF-R の発現における研究)			
<p>血管増殖因子 (VEGF) 及びそのレセプターは血管及びリンパ管新生に関することはよく知られているが、最近腫瘍の増殖や転移にも関わることが注目されている。本学位論文提出者らは、肺小細胞癌細胞株を用いて VEGF 及び VEGF レセプターの発現、及び培養液中に加えた VEGF の影響を検討した。5 種類の肺小細胞株を用いて、リガンドである VEGF、VEGF-C 及びレセプターである <i>flk-1/kdr</i>、<i>flt-4</i> の発現を調べたところ、いずれの細胞株にも発現が見られ、また細胞を低酸素状態におくとリガント、レセプターともに発現が亢進することが明らかになった。また、培養液中に VEGF または VEGF-D を加えると、VEGF レセプターと MAPK のリン酸化が起ることから、これらのリガントはレセプターを介して MAPK 系を活性化することが明らかになった。</p> <p>また、VEGF を培養液中に加えることにより細胞増殖とともに細胞の運動性が亢進したのに対して、VEGF-D の添加では細胞増殖のみが亢進した。以上の結果は、VEGF-VEGF レセプター系は肺小細胞癌の増殖と浸潤に関与している可能性を示唆するものであり、特に肺小細胞癌が生理的に VEGF を産生するリンパ節などの転移しやすいことと合致する興味深い所見である。</p>			

本学位論文提出者は試問審査においても関係領域について十分な知識を有することが明らかになり、よって本審査委員会は本論文が学位論文に値するものと判定した。