

| | |
|---------|---|
| 氏名(本籍) | まる やま こつじ とも え 丸山(小辻)智恵(茨城県) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 博甲第3178号 |
| 学位授与年月日 | 平成15年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 審査研究科 | 医学研究科 |
| 学位論文題目 | PDGF-BB induces the MAP kinase phosphorylation and VEGF expression in neurofibroma-derived cultured cells from patients with Neurofibromatosis 1 (PDGF-BBは神経線維腫症1型患者の神経線維腫由来培養細胞におけるMAPキナーゼのリン酸化とVEGFの発現を誘導する) |
| 主査 | 筑波大学教授 医学博士 中山 凱 夫 |
| 副査 | 筑波大学講師 医学博士 遠藤 隆 志 |
| 副査 | 筑波大学講師 医学博士 大越 教 夫 |
| 副査 | 筑波大学講師 医学博士 坪井 康 次 |

論文の内容の要旨

(目的)

神経線維腫1型(NF1)患者に多発する神経線維腫の発生・増大の機序は明らかではない。この機序の解明が、切除以外の薬物治療の開発に重要であると考えられる。神経線維腫は良性腫瘍であるにもかかわらず、血管成分に富んでいる。この豊富な血管が神経線維腫の増大に関与しているとも考えられる。

神経線維腫由来培養細胞(NF-derived cells)ではplatelet-derived growth factor(PDGF)βレセプターの増加が報告されているが、PDGF-BBによってVEGFの発現が誘導されるか否かを検討した。

(対象と方法)

- ・46歳と66歳の男性NF1患者の神経線維腫を細切し、シャーレに播き、10%血清含有培地にて培養した(passage0, P0)。トリプシン処理で継代し、P3・P4の細胞を実験に用いた。
- ・Mitogen-activated protein kinase(MAP kinase)の解析
NF-derived cellを48時間無血清培地におき、無血清培地のみと、10ng/mlのPDGF-BB含有無血清培地とにそれぞれ交換した。18時間後SDSサンプルバッファーで溶解し、超音波破碎の後加熱処理し12.5%SDS-PAGEゲルにて電気泳動した。ニトロセルロース膜に転写し、抗リン酸化p42/p44MAP kinase抗体と抗非リン酸化p42/p44MAP kinase抗体に反応させ、ABC法を用いてペルオキシダーゼにて発色した。
- ・VEGFの転写をRT-PCRにて解析
NF-derived cellを48時間無血清培地におき、ただの無血清培地、10ng/mlのPDGFまたは2ng/mlのTGF-β1を含有する無血清培地にそれぞれ交換し、6時間後total RNAを抽出した。逆転写にてcDNAにした後、VEGFのプライマーを使ってPCR法にて増幅した。
- ・NF-derived cellsからのVEGF分泌量の測定
培養細胞を48時間無血清培地においた後、ただの無血清培地、10ng/mlのPDGF、または2ng/mlのTGF-β1、または100ng/mlのIGF-Iを含有する無血清培地に交換した。24時間後ELISA法にてこの培養液中のVEGFの分泌

量を測定した。それぞれペアで測定し、同様の実験を3回行った。

(結果)

10ng/mlのPDGF-BB添加後18時間で、MAP kinaseのリン酸化が誘導された。

PDGF-BBまたはTGF- β 1の添加でVEGFのmRNAのバンドが検出されたが、無添加ではVEGFのmRNAのバンドは検出されなかった。

培養細胞の培養液に分泌されたVEGFの蛋白量は、無添加状態では 10^5 個の培養細胞あたり平均10pg/mlであった。PDGF-BB添加で、この約10倍、TGF- β 1添加で約8倍、IGF-I添加で約5倍に増加した。

(考察)

MAP kinaseは細胞増殖因子・放射線・熱ショック・抗癌剤・紫外線・高浸透圧など種々の刺激で活性化し、細胞外の刺激を核に伝達し、遺伝子発現を調節することで、増殖・分化・アポトーシスなどの細胞応答を制御する。タンパクリン酸化カスケードによるシグナル伝達経路の代表である。はじめに発見された古典的MAP kinaseであるERK1 (p44MARK) とERK2 (p42MARK) は種々の増殖因子の刺激で活性化する。

ハムスターの線維芽細胞ではp44/p42 MAP kinaseがVEGFの発現を制御すると報告されているが、今回の実験においてもPDGF-BBの添加によるVEGFの発現に伴い、p44/p42 MAP kinaseの活性化がみられた。

線維芽細胞、血管平滑筋細胞、子宮平滑筋などにおいてPDGF-BBがVEGFの発現を誘導することが分かっており、この機序は、創傷治癒、種々の悪性腫瘍の増殖・転移、子宮筋腫、動脈硬化などに関与していると考えられている。

(結論)

PDGF-BBはNF-derived cellsに過剰発現したPDGF β レセプターに結合しMAP kinaseを介してVEGFの発現を誘導し、神経線維腫内の血管を新生させ、腫瘍の増大を引き起こしていると考えた。PDGFは神経線維腫に特徴的なhypervascularityに重要な役割を果たしていると考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

PDGFによるVEGFの誘導は種々の悪性腫瘍、子宮筋腫などの病因の1つとして検討されている。今回、その機序が神経線維腫症1型患者に生じる神経線維腫に特徴的な豊富な腫瘍内血管を生じ、その増大に関与している事が示唆された。神経線維腫は多発し、整容上の問題のみならず、打撲に伴う大量の内出血などの合併症を引き起こし、ときに悪性化もみられる。切除以外に有効な治療法はないが患者にとっては負担が大きいと考えられる。今後、PDGF阻害剤などで神経線維腫の増大を抑制する治療法の開発に結びつけば、本研究の意義は大きいと考えられる。

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。