

氏名(本籍)	まつもとけん (東京都)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第5467号		
学位授与年月日	平成22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	人間総合科学研究科		
学位論文題目	<b>Anti-tumor angiogenesis effects of 2-oxoglutarate through inhibition of HIF-1<math>\alpha</math> expression</b> (2-オキソグルタル酸のHIF・1 $\alpha$ 発現抑制を介した腫瘍血管新生抑制効果)		
主査	筑波大学教授	医学博士	野口雅之
副査	筑波大学准教授	医学博士	高野晋吾
副査	筑波大学助教	博士(理学)	山下年晴
副査	筑波大学教授	医学博士	正田純一

## 論文の内容の要旨

### (目的)

固形腫瘍の増殖には腫瘍血管新生が必須である。この腫瘍血管新生は固形腫瘍内部での低酸素環境に応答して、HIF (hypoxia inducible factor) -1の発現が増加し、VEGF (vascular endothelial growth factor) の転写が誘導されることにより引き起こされる。HIF-1 $\alpha$ 鎖は通常大気中では、HIF-1 $\alpha$ 鎖プロリン残基水酸化酵素(HIF-PHD)により分解されるが、低酸素下では、HIF-PHDの基質である酸素が欠乏するため、分解されず安定化することでHIF-1の発現が増加する。HIF-PHDは酸素の他、2-オキソグルタル酸(2-OX)も基質としている。

以上の背景をもとに、本研究の目的は、培養細胞*in vitro*モデルを用いて、2-OX投与により、低酸素下でもHIF-1 $\alpha$ 鎖の分解促進により血管新生能抑制効果を示すかどうかを検証し、さらにマウス*in vivo*モデルを用いて、腫瘍の増殖および腫瘍血管新生における2-OX投与の効果を明らかにすることにある。

### (対象と方法)

#### 研究項目1: 培養細胞*in vitro*モデルにおける2-OXの作用機序解析と血管新生に対する効果検討

培養細胞*in vitro*モデルにおいて、2-OX投与が、HIF-1 $\alpha$ 鎖の分解を促進し、標的遺伝子であるVEGFの発現量を減少させるかどうかを検討した。また、培養ヒト血管内皮細胞を用いて、2-OX投与による血管新生阻害効果を検討した。

#### 研究項目2: 実験腫瘍モデルマウスを用いた2-OXの効果検討

マウス背部皮下法を用いて、腫瘍血管誘導能に対する2-OX投与の効果を評価した。さらに腫瘍細胞皮下移植マウスモデルを用いて、2-OX投与の腫瘍増殖に対する効果を評価した。このモデルにおいて、形成された腫瘍組織における血管形成の差異を免疫染色法により評価した。また、形成された腫瘍組織でのVEGF発現に対する2-OXの効果も検討した。加えて、2-OXと既存の抗癌剤(5-FU)の併用投与群が、5-FU単独投与群よりも強い抗腫瘍効果を示すかを、腫瘍細胞移植マウスモデルを用いて評価した。

## (結果)

### 研究項目1：培養細胞 *in vitro* モデルにおける 2-OX の作用機序解析と血管新生に対する効果検討

2-OX を投与した Hep3B 細胞では、低酸素環境下においても HIF-1 $\alpha$  鎖の分解が起こり、結果として標的である VEGF の発現低下が引き起こされた。さらに、2-OX 処理した血管内皮細胞はその管腔形成能が著しく低下しており、2-OX が血管新生抑制効果を示すことが確認された。

### 研究項目2：実験腫瘍モデルマウスを用いた 2-OX の効果検討

マウス背部皮下法を用いた検討において、2-OX は腫瘍の血管誘導能抑制効果を示すこと、腫瘍細胞株皮下移植モデルマウスの検討において、2-OX 腹腔内投与は腫瘍の発育を抑制することを認めた。さらに、2-OX 投与群の腫瘍組織内部での血管分布量は、2-OX 非投与群と比較し、有意に減少しており、腫瘍組織内部での VEGF 発現においても 2-OX 投与による発現抑制効果が認められた。加えて、2-OX は 5-FU との併用により、腫瘍血管新生抑制・血管正常化を介して、相乗的な腫瘍増殖抑制効果を示すことが確認された。

## (考察)

本研究により、2-OX が HIF-1 $\alpha$  鎖の分解を促進し、低酸素下での VEGF 誘導を抑制することが明らかとなった。また、マウス *In vivo* モデルにおいて、2-OX 単独投与および抗がん剤との併用投与は、腫瘍血管新生抑制・血管正常化を介して、腫瘍増殖抑制効果を示すことを認めた。

低酸素応答に関して、特に HIF-1 $\alpha$  鎖の制御機構をとおして近年多くの知見が得られ、様々な疾患における HIF-1 の役割が明らかになってきた。HIF-1 を中心的プラットフォームとした血管新生の機序解明は血管閉塞による疾患への治療や腫瘍細胞の増殖抑制につながり、将来的には有効な創薬や新規治療法に結びつく可能性を秘めている。将来的に 2-OX は有用な血管新生阻害剤の一員として、その発展に貢献できることが期待される。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は HIF (hypoxia inducible factor) -1 の代謝酵素である HIF-1 $\alpha$  鎖プロリン残基水酸化酵素 (HIF-PHD) の基質の一つである 2-オキシグルタル酸 (2-OX) が HIF-1 $\alpha$  鎖の分解を促進し、低酸素下での VEGF 誘導を抑制することを初めて示した意義ある研究である。腫瘍増殖抑制効果のある 2-OX を分指標的とした新しい臨床治療研究に発展することが期待される。

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。