

氏名(本籍)	たぐちえり (埼玉県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博乙第2436号		
学位授与年月日	平成21年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	新規 VEGF レセプター阻害剤 KRN951 の腫瘍血管正常化作用と抗腫瘍効果		
主査	筑波大学教授	医学博士	千葉 滋
副査	筑波大学准教授	医学博士	高野 晋吾
副査	筑波大学講師	博士(医学)	松下 昌之助
副査	筑波大学講師	博士(理学)	依馬 正次

論文の内容の要旨

(目的)

本研究では、キノリンウレア骨格を有する新規 VEGFR 阻害剤である KRN951 の *in vitro*, *in vivo* における活性を評価し、その特徴を分析するとともに、新規癌治療薬としての有用性を検討することを目的とした。さらに腹膜播種性腫瘍モデルを用い、本モデルにおける KRN951 の抗腫瘍効果を検討するとことで、KRN951 投与が腫瘍誘導性の新生血管に及ぼす変化について定量的に解析し評価することを目的とした。

(対象と方法)

各種のレセプター型チロシンキナーゼを持つ細胞をリガンドで刺激し、western blotting を用いてリン酸化したレセプターのバンドを検出した。このリガンド刺激時に様々な濃度で KRN951 を添加し、リン酸化したレセプターのバンドを定量的に解析することによって、各レセプターのリン酸化に対する KRN951 の阻害活性を評価した。同様にして、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を VEGF, bFGF, および EGF で刺激した場合の細胞内シグナリング (MAP kinase: MAPK) の活性化に対して KRN951 が及ぼす影響を評価し、さらに VEGF, bFGF 依存的な細胞増殖に対する影響を解析した。*In vivo* における KRN951 の作用を評価するためには、まずヌードラットにヒト肺癌細胞株 A549 を皮下移植したモデルを作製し、KRN951 を投与した後に腫瘍組織を採取して、その内部のリン酸化 VEGFR-2 と血管内皮細胞を免疫染色することにより、KRN951 が *in vivo* において VEGFR-2 のリン酸化と血管新生に対して及ぼす影響を評価した。次に、様々な癌種由来のヒト癌細胞株をヌードラットに皮下移植したモデルを作製し、KRN951 を連日経口投与して経時的に腫瘍体積を計測することで、腫瘍の増殖に対する KRN951 の抑制効果を評価した。さらに KRN951 の抗腫瘍効果を検証するため、ラット大腸癌由来の細胞株 RCN-9 を Fischer 344 ラットの腹腔内に播種することによって作製した腹膜播種性腫瘍モデルを用いて、KRN951 を連日経口投与した際の、腸間膜上における血管新生と腫瘍結節数、貯留腹水量、腹腔内の総 VEGF 量および血中 VEGF 濃度を評価した。また、各群の腸間膜上における新生血管を画像解析することにより、腫瘍誘導性の新生血管の構築と KRN951 投与がその血管構築に及ぼす作用を定量的に評価した。また、腫瘍細胞の移植当日もしくは移植 14 日後から KRN951 を長期に連日投与した際の生存期間に対する影響を評価した。

(結果)

培養細胞を用いて各種のレセプターの自己リン酸化に対する KRN951 のキナーゼ阻害活性を調べた結果、KRN951 は VEGFR-1, VEGFR-2 および VEGFR-3 の 3 つの VEGFR チロシンキナーゼに対して非常に強力かつ選択的な阻害活性を示した (IC_{50} =0.21, 0.16, 0.24nM)。また、VEGF, bFGF または EGF 刺激に対する MAPK の活性化に対して、KRN951 は VEGF 依存的な活性化のみを阻害し、細胞増殖においても、VEGF 依存的なものは阻害し、bFGF 依存的なものは阻害しなかった。これらの結果から KRN951 は VEGF に対して選択的かつ強力に阻害活性を発揮することが示された。

一方、*in vivo*においては、ヌードラットの皮下にヒト腫瘍細胞株を移植したモデルに KRN951 を経口投与した結果、腫瘍組織内部の血管内皮における VEGFR-2 のリン酸化が阻害され、血管密度が低下した。さらに、様々な癌種由来のヒト腫瘍細胞株を用いたヌードラット皮下移植モデルに KRN951 を連日経口投与した結果、腫瘍の増殖は顕著に抑制された。これらの結果から、KRN951 は *in vivo*においても血管新生阻害活性を介して高い抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなった。

腹膜播種性腫瘍モデルに対する KRN951 の効果を評価した結果では、KRN951 は腸間膜上における腫瘍誘導性の血管新生と腫瘍結節形成、および腫瘍誘導性の腹水貯留を著しく抑制した。腸間膜上に誘導された腫瘍血管の構築を定量的に解析した結果、KRN951 は腫瘍血管を退縮させるのみでなく、腫瘍血管の特徴である異常な血管構築を正常な血管構築に近いものへと変化させることが明らかとなった。さらに、腹膜播種性腫瘍モデルに KRN951 を腫瘍細胞移植当日から、もしくは腹水貯留の認められるより腫瘍が進行した状態から長期に連日経口投与した結果、いずれの場合でも有意な生存期間延長効果が認められた。

(考察)

本研究の結果から、KRN951 のレセプターチロシンキナーゼに対する阻害活性は VEGFR-1, VEGFR-2 および VEGFR-3 に対して非常に強力かつ選択的であることが明らかになった。また、様々な癌種由来のヒト腫瘍細胞株の皮下移植モデルに対して、経口投与によって血管新生阻害を介した優れた抗腫瘍効果を発揮したことから、KRN951 は新規の血管新生阻害剤として有望な抗腫瘍薬となると考えられた。現在臨床において開発が進められている他の低分子血管新生阻害剤の多くは VEGFR 以外のレセプターに対しても阻害活性を示すマルチキナーゼ阻害剤であることを考えると、KRN951 の VEGFR に対する選択性の高さは非常に特徴的であり、臨床においても他の薬剤とは異なる結果を生じることが期待される。

さらに、腹膜播種性腫瘍モデルにおける評価では、KRN951 は腫瘍誘導性の血管新生抑制を介して、腫瘍結節の形成抑制、腹水貯留の抑制効果を発揮し、その結果として初期状態の腫瘍に対しても進行状態の腫瘍に対しても生存期間を延長させる効果をもたらした。また、既に形成された異常な血管構築を示す腫瘍血管を正常な血管に近い構築へと変化させることが定量的に示された。これらの結果は、初期段階および進行段階の腹腔内における腫瘍の増殖、とりわけ腹水貯留を伴う病態に対して、KRN951 による血管新生阻害治療が新規の有望な治療方法となる可能性を示唆するとともに、血管新生阻害剤が腫瘍血管を正常化することのさらに詳細なメカニズム研究の一つとして、今後の研究に貢献することが期待された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、新規 VEGFR 阻害剤である KRN951 の *in vitro* および *in vivo* における活性を評価したものである。特に *in vivo* における腫瘍誘導性の新生血管に及ぼす変化について定量的に解析した点で新規性がある。

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。