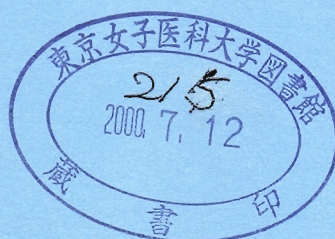


中枢神経腫瘍新生血管における増殖因子の役割

課題番号 10670177

平成10年度～平成11年度 科学研究費補助金（基礎研究C）研究成果報告書

平成12年 3 月



研究代表者 澤田 達男

（東京女子医科大学医学部 教授）



研究組織・研究期間・研究経費

研究代表者：澤田 達男 （東京女子医科大学・医学部・教授）

研究分担者：竹川 義則 （日本大学・医学部・助手）

加藤 陽一郎（東京女子医科大学・医学部・助手）

研究期間：平成10年度～平成11年度

研究経費：平成10年度（1,000,000円）

平成11年度（1,200,000円）

合計総額 （2,200,000円）

研究成果

(はじめに)

固形腫瘍において、新生血管の増殖の程度は一般に予後を左右する重要なファクターの1つで、脳腫瘍、肺がん及び乳がんなどで多くの検討がなされている。特に脳腫瘍では新生血管の増殖の程度のみならず、古くからその形態が注目され、新生血管の glomeruloid proliferation は glioblastoma の特徴的所見とされている。しかし、その発生のメカニズムには明らかではない。血管新生は胎児期の vasculogenesis と既存の血管から起こる angiogenesis に大きく大別される。vasculogenesis において、hemangioblast から endothelial cell への分化過程に重要なのが、VEGF の受容体の1つで、後述する Flk-1(VEGFR-2)である。Hemangioblast は成体においても血液細胞内に存在すると考えられ、さらに最近成体においても vasculogenesis が起こることが報告されている。腫瘍における血管新生は angiogenesis で、既存の細小血管から新しい血管 network が腫瘍内に形成される現象で、Angiogenesis は3つのプロセスによる。

- 1) 腫瘍細胞及び周囲の細胞から中枢神経系では多くは反応性の astroglia から産生される血管新生(増殖)因子による内皮細胞の活性化。
- 2) 活性化された内皮細胞の基底膜の消化、遊走、増殖。
- 3) 管腔形成を基底膜の再生。

血管新生の主体は血管内皮細胞であり、血管新生は内皮細胞の促進因子と抑制因子とのバランスによって調節され、促進因子が抑制因子の作用を上回った時に血管新生が開始されると考えられる。一般に腫瘍細胞は高い新生血管誘導能を有しており、その測定法としては古典的なものとしては角膜 assay また現在では double

chamber mtrigel を用いた培養系が持ちられますが、in vivo では我々の検討では約 1mm^3 程度で既に新生血管を有する。

血管増殖因子 VEGF

VEGF は分子量 45kD(22kDa タンパク質のホモ二量体)で Platelet-derived growth factor (PDGF)に近縁の構造を示す。ヒト VEGF にはスプライシングの差によって 4 種類のサブタイプ(121,165,189,206 アミノ酸残基)が知られている。そのうち VEGF165 タイプが量的にもまた生物学的活性からも主要なタイプとされています。さらに VEGF 関連遺伝子産物として VEGF-B, VEGF-C、PlGF(Placenta growth factor)が発見されている。VEGF のレセプターには PDGF の相似体である Flt-1, KDR/Flk-1, Flt-4 の 3 種類が存在する。VEGF は強力な血管新生因子で、主に血管周囲の種々の細胞から産生、分泌され、現在のところは paracrine mechanism で作用すると考えられてる。その作用は非常に多岐にわたり内皮細胞の増殖促進、管腔形成の促進、内皮細胞の遊走、内皮細胞からの組織因子や plasminogen activator など凝固、線溶系タンパク質の産生、細胞接着分子の内皮細胞上への発言の誘導、血管透過性の亢進、マクロファージの遊走活性を惹起するとされている。

(1) 脳腫瘍内の VEGF, VEGFR-1, VEGF mRNA の局在。

我々は VEGF, VEGFR-1(Flt-1)の免疫組織化学及び VEGF の in situ hybridization を用いて転移腫瘍を含めたヒト脳腫瘍摘出症例及びラット実験腫瘍、ラット新生仔の中樞神経系用組織における VEGF の発現と作用また臨床事項との関連に関して検討した。

ヒト手術摘出例及び ENU 誘発ラット脳腫瘍培養細胞 C6 を用いて脳腫瘍移植モデルを作成し、免疫組織化学 VEGF, VEGFR-1 の及び in situ hybridization 法を用いて VEGF mRNA の局在を検討した。

免疫組織化学的検討

VEGF, VEGFR - 1 は免疫組織化学的には astrocytoma, 転移性脳腫瘍の腫瘍細胞、反応性 astroglia, 新生血管内皮細胞に陽性所見が認められた。Astrocytoma では VEGF の labeling index と Daumas-Duport による St-Ann-MAYO classification には相関が認められ、組織学的悪性度また予後と関連する事が示された。なを同様の所見は小児腫瘍の代表的な疾患である、neuroblastoma に関しても臨床的に重要視される Shimada の予後と相関することを示した。新生血管内皮では glomeruloid proliferation を形成する血管内皮には形成を認めない内皮に比して VEGF の発現は著明である。

in situ hybridization 法による検討

in situ hybridization はヒト、ラットともに probe は次の方法で作成したヒト及びラット腎臓から AGPC 法により総 RNA を抽出し、逆転写反応を施行し cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として、ヒト VEGF mRNA に特異的なプライマーを用いて（フロント: 158-177bp、リア: 670-191bp）PCR を行い、反応中にジゴキシゲニン標識 dUTP を取り込ませた。スライドは VEGF の RT-PCR の結果ですが、splicing による 3 つの isoforme に一致して 3 本のバンドが認められた。今回得られた RT-PCR 産物と既に報告されているヒト VEGF の塩基配列を比較した

ものですが、完全な一致が認められ、今回用いた probe の特異性が証明された。ラットに用いた probe もヒト手術例と同様に作製し、特異性を同様の方法で証明した。in situ hybridization は、42 度、overnight で in situ hybridization を施行し、アルカリオプスファターゼ標識抗体を反応させ、NBT/BCIP で、可視化した。シグナルは glioblastoma では腫瘍細胞のみならず、glomeruloid proliferation を示す新生血管内皮細胞にシグナルが認められ、転移性脳腫瘍においても carcinoma cell のみならず、間質の細胞にシグナルが認められ、また浸潤部分の glomeruloid proliferations を示す新生血管内皮にシグナルを認められた。low grade astrocytoma では腫瘍細胞に弱いシグナルを認められたが、新生血管内皮にはシグナルは認められず、コントロール症例ではシグナルは認められなかった。ラット移植腫瘍では。腫瘍細胞特に壊死周囲の腫瘍細胞にシグナルが著明に認められますが、新生血管内皮には認められません。C6 glioma 移植腫瘍の新生血管明かな新生血管内皮の glomeruloid proliferations は認めず、また電顕的には不完全ですが tight junction が認められ、また fenestration も認められないところから、low grade astrocytoma と同様の所見と考えられた。新生血管において、正常の脳毛細血管の性質保持していることが示唆される新生血管には VEGF mRNA のシグナルは認められず、glomeruloid proliferations を示す増殖能に高い新生血管内皮には mRNA のシグナルが認められた。VEGF を始めとする液性の血管増殖因子は paracrine system によって起こるとされているが、VEGF の免疫組織化学では腫瘍細胞、reactive astroglia の他に血管内皮に認められる事も事実で、oligodendroglioma の報告では腫瘍細胞は陰性で内皮細胞のみに認められるなどの報告もある。その考察としては内皮細胞に receptor に結合した蛋白が残

っている、分解速度が遅い、また分泌が非常に早い等が考えられているが、我々の今回の検討から autocrine mechanism が存在することが証明された。

（２）ラット vasculogenesis における VEGF の役割

ラット新生仔を生後 1,3,5,7,10,14 日後の脳を摘出し、脳腫瘍と同様の方法で検討した。vasculogenesis が著明とされるの生後 5-7 日に VEGF mRNA が in situ hybridization ですが、血管内皮に認められ、このシグナルは生後 10 日を過ぎると著しく減少し、vasculogenesis がほぼ終了する生後 14 日では認められなかった。Purkinje 細胞、脈絡叢の細胞には、長く陽性所見が認められます。

（３）血管増殖因子で誘発された新生血管と脳血液関門

tight junction related protein の 1 つである、Zo-1 及び中枢神経系毛細血管内皮に発現する p-glycoprotein はともに BBB の構成に重要な蛋白である。免疫組織化学的にヒト脳腫瘍摘出標本を用いて、両者の局在を検討した。一般に VEGF で惹起される新生血管は BBB は有さないとされているが、正常毛細血管また VEGF の発現の低い low grade astrocytoma に比してその程度はやや低いものの glomeruloid proliferation を示す新生血管にも Zo-1 の発現は認められ、同様に P-glycoprotein の発現も認められた。P-glycoprotein 及び Zo-1 の局在の程度と組織学的悪性度及び細胞増殖性は負の相関が認められた。

（まとめ）

1、VEGF の angiogenesis 及び vasculogenesis における作用は基本的には paracrine mechanism によって内皮細胞の増殖が起こる。

2、血管増殖能が著しく亢進している状態では、今回の検討では新生血管内皮細胞にシグナルが認められ、autocrine mechanism も関与する。

今後は VEGFR(Flt-1)mRNA を用いての検討。また血管増殖阻止因子に関しての検討、それに関してこれは以前から行っているのですが、新生血管内皮の apoptosis の発現の検討。さらに遺伝子導入法を用いての検索を予定しています。

研究発表
学会誌など

Takekawa Y. and Sawada T.: Vascular endothelial growth factor and neovascularization in astrocytic tumors. Pathology International.48:109-114.1999

Kato Y. Sakayori N, Shibata N, Sawada T, Kobayashi M: Chronological Expression and its significance of *c-jun* and mRNA in Rat Brain. Acta Histochem Cytochem 31: 345-354 1998

Sawada T, Takekawa Y, Sakurai I, Kobayashi M: Apoptosis in metastatic carcinoma of the central nervous system. Neuropathology 18: 370-375.1998

Takekawa Y, Sawada T, Sakurai I: Expression of apoptosis and its related protein in astrocytic tumors. Brain Tumor Pathology .16(1):11-16 1999

Sawada T, Kato Y, Sakayori N, Takekawa N, Kobayashi M: Expression of the multidrug resistance P-glycoprotein (Pgp MDR-1) by endothelial cells of neovasculture in central nervous system. Brain Tumor Pathol.16(1):23-28 1999

口頭発表

加藤陽一郎、坂寄紀子、山本智子、柴田亮行、澤田達男、小林槓雄： 癌組織における c-jun 遺伝子の発現とその局在の検討。第 87 回日本病理学会総会。広島。1998,4

澤田達男、柴田亮行、加藤陽一郎、金澤美穂、竹川義則、桜井勇、小林槓雄： 中枢神経系腫瘍新生血管内皮細胞における P-glycoprotein (Pgp) の発現と意義。第 87 回日本病理学会総会。広島。1998,4

澤田達男、小林槓雄、竹川義則： 脳腫瘍新生血管内皮細胞における MDR-1 P-glycoprotein (Pgp) の局在とその臨床的意義。第 16 回日本脳腫瘍病理学会。福岡。1998,5

澤田達男、加藤陽一郎、小林槓雄、竹川義則： 脳腫瘍における VEGF mRNA の局在。第 39 回日本神経病理学会学術研究会。福岡。1998,5

Sawada T, , Kato Y, Sakayori N, Kobayashi M:
Vascular endothelial growth factor in brain tumor 。
Xth international Vascular Biology Meeting. Cairns,
Queensland , Australia 1998.8

澤田達男、加藤陽一郎、金澤美穂、小林槇雄、久保長生、絹川典子、竹川義則。Astrocytic tumorにおける VEGF, VEGFR の発現とその臨床的意義第 88 回日本病理学会総会 東京 1999.4

加藤陽一郎、山本智子、澤田達男、小林槇雄。アデノウイルス誘発ラット網膜腫瘍における癌関連遺伝子 E1B の関与。第 88 回日本病理学会総会東京。1999.4

澤田達男、小林槇雄、久保長生、竹川義則。脳腫瘍新生血管における ZO-1 の免疫組織学的局在—VEGF 発現との関連。第 17 回日本脳腫瘍病理学会。前橋。1999.4

澤田達男、加藤陽一郎、山本智子、金澤美穂、柴田亮行、小林槇雄、竹川義則：ラット脳組織における VEGF mRNA の局在。第 40 回日本神経病理学会学術講演会。横浜。1999.6

Sawada T, Shibata N, Kato Y, Kobayashi M, Takekawa Y: Immunohistochemical study of blood brain barrier related protein in neovasculature in brain tumor The 2nd Conjoint Meeting of the Japanese, Korean, Australasian & Hong Kong Division of the IAP and Pathology Associations. Seoul. 1999.10

出版物

1. 澤田達男：脳腫瘍の血管増殖因子。脳と神経。51: 404-410.1999