

氏名	藤井 由紀子
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5489号
学位授与の日付	平成29年3月24日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	血管新生因子 Angiogenin のリンパ管新生に果たす役割に関する研究
論文審査委員	長塚 仁 教授      此内 浩信 准教授      佐々木 朗 教授

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

リンパ管内に存在するリンパ液の流れが障害されるとリンパ浮腫を生じる。先天性なリンパ管の形成不全に起因すると考えられる原発性と、癌に対する治療でリンパ管が損傷され発症する続発性に分類される。患者の多くは乳癌、子宮癌、卵巣癌の治療に伴う続発性であり、治療を行った患者の25~30%に発症する。リンパ浮腫は非常に難治性で、進行に伴い、皮膚潰瘍、蜂窩織炎、象皮症を合併し、患者のQOLを低下させる。また稀に悪性化してリンパ管肉腫に移行する。

リンパ浮腫に対しては、患肢の圧迫や用手的リンパドレナージを含む複合的理学療法と、リンパ管と近傍の静脈を吻合し貯留したリンパ液を静脈に流入させるリンパ管静脈吻合術といった外科的治療が行われてきた。しかし、いずれの方法を用いても完治は困難である。新しいリンパ管を形成することによって、遮断されたリンパ液の流れを再開すれば、リンパ浮腫を制御できる可能性がある。

代表的なリンパ管新生因子である Vascular Endothelial Growth Factor -C (VEGF-C) は VEGFR-3 に結合すると、シグナル伝達因子 ERK や AKT を介して、リンパ管内皮細胞の増殖と生存を促進する。

Angiogenin (ANG) はヒト大腸癌細胞株 HT-29 の培養上清から単離された。ANG は血管内皮細胞表面の受容体に結合すると、ERK や AKT を活性化させると同時に、ANG 自体も直接に核に移行しリボソーム RNA (rRNA) の転写を促進する。しかし、ANG のリンパ管新生に与える影響は未だ解明されていない。そのため本研究は、ANG がリンパ管新生に与える影響を解明し、リンパ浮腫に対する新たな治療法の可能性について検討したので報告する。

### 【材料と方法】

#### 1) ANG がリンパ管内皮細胞に与える影響

正常ヒト皮膚微小リンパ管内皮細胞 HMVEC-dLy に ANG および VEGF-C を単独もしくは混和して添加し、増殖能、遊走能、運動能、管腔形成能について検討した。

#### 2) ANG がリンパ管内皮細胞のシグナル伝達経路と細胞内局在に与える影響

リンパ管内皮細胞のシグナル伝達経路に与える影響については、細胞内タンパクを回収し、ウェスタンブロット法で ERK と AKT のリン酸化について検討した。ANG の細胞内局在については、免疫蛍光抗体染色法で評価した。

#### 3) ANG がリンパ管内皮細胞内のリボソーム生合成に与える影響

AgNOR 染色法を用いて ANG の HMVEC-dLy におけるリボソーム生合成に与える影響について検討した。

#### 4) ANG がマウスリンパ浮腫モデルに与える影響

1 群を 5 匹とし 8 週齢雄 C57BL/6 マウス（日本クレア，東京，日本）の尾基部から 1 cm 遠位の表皮を 2 mm 環状に剥ぎ取りマウスリンパ浮腫モデルを作製した。ANG および VEGF-C を単独もしくは混和し週 3 回腹腔内投与した。尾の直径を計測しリンパ浮腫の程度を検討した。

2 週後にマウスを屠殺し，尾の組織切片を作製した。切片は LYVE-1 の免疫組織化学染色法を用いて評価した。

#### 【結果】

##### 1) リンパ管上皮細胞への ANG の影響

HMVEC-dLy に ANG を添加すると，経時的に増殖能，遊走能，運動能，管腔形成能を促進した。また管腔形成能では ANG と VEGF-C の相乗効果が認められた。

##### 2) リンパ管上皮細胞のシグナル伝達経路と細胞内局在への ANG の影響

ANG 添加群では ERK と AKT のリン酸化が亢進した。ANG 添加群では ANG の核内移行が認められた。

##### 3) リンパ管上皮細胞のリボソーム生合成への ANG の影響

ANG 添加群では対照群と比較してリボソーム生合成が有意に促進された。

##### 4) ANG がリンパ浮腫モデルに与える影響

ANG 投与群と VEGF-C 投与群，ANG/VEGF-C 投与群では対照群と比較して浮腫が軽減した。また摘出材料の免疫組織化学染色法において，LYVE-1 陽性リンパ管が有意に増加すると同時に ANG と VEGF-C の相乗効果が認められた。

#### 【考察】

本研究では，ANG は HMVEC-dLy において，増殖能，遊走能，運動能を促進した。ANG が HMVEC-dLy の細胞動態に影響を与えたことから，リンパ管上皮細胞の細胞表面にも受容体が存在すると推察された。HMVEC-dLy の ANG 刺激により，ERK と AKT がリン酸化され，また ANG の細胞内局在を検討したところ核内に存在した。ANG によってリボソーム合成が促進されていた。ANG はリンパ管細胞に直接的に作用し細胞増殖を促進していると考えられた。

In vitro における ANG による増殖能，遊走能，運動能の促進効果は，VEGF-C との相乗効果を認めなかったが，管腔形成能やリンパ浮腫動物モデルにおいては相乗効果を認めた。ANG は  $\alpha$  平滑筋アクチンと複合体を形成し，組織プラスミノゲン活性化因子を活性化して細胞外基質の分解および浸潤能や遊走能を促進する。VEGF-C にはない ANG の作用によって，VEGF-C と ANG の相乗効果が In vivo のみに生じた可能性があると考えられた。

本研究では，ANG 投与がリンパ管新生を促進することで，リンパ浮腫に対する新規治療法となる可能性を見出した。

#### 【まとめ】

ANG は in vivo，in vitro においてリンパ管新生作用を認め，新規リンパ浮腫治療薬の候補となりうる可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

リンパ浮腫はリンパ液の還流障害により生じる。患者の多くは悪性腫瘍の治療にともなう続発性リンパ浮腫であり、我が国での推定患者数は約10万人である。リンパ浮腫は様々な合併症をともなう慢性進行性疾患であるが、現在の標準治療である複合的理学療法では完治は困難である。新しいリンパ管を形成し遮断されたリンパ液の流れを再開すれば、リンパ浮腫を制御できる可能性がある。Angiogenin (ANG) はヒト大腸癌細胞株 HT-29 の培養上清から単離されたポリペプチドであり血管新生作用を有する。血管内皮細胞表面の受容体に結合すると、ERK や AKT を活性化させると同時に、ANG 自体も直接に核に移行し rRNA の転写を促進する。しかし、ANG のリンパ管新生に与える影響は未だ解明されていない。本研究では、ANG がリンパ管新生に与える影響を解明し、リンパ浮腫に対する新たな治療法の可能性について検討がされた。

本研究では、新生児および成人由来のヒト皮膚微小リンパ管内皮細胞 (HMVEC-dLy) を使用し、ANG とリンパ管新生因子 VEGF-C を添加し、増殖能、遊走能、運動能、管腔形成能について検討した。また細胞内シグナル伝達経路、核内移行およびリボソーム形成能を検討した。さらに尾の皮膚剥離による C57BL/6 マウスリンパ浮腫モデルを作製し ANG ならびに VEGF-C による浮腫の改善を比較するとともに、浮腫形成部位の組織を免疫組織化学的に検討した。

研究結果は以下の内容であった。

- 1) ANG は HMVEC-dLy の増殖能、遊走能、運動能、管腔形成能を促進し、特に管腔形成能は ANG と VEGF-C の相乗効果を認めた。また ANG は ERK と AKT をリン酸化するとともに、ANG は核内移行しリボソーム形成能が促進された。
- 2) リンパ浮腫動物モデルにおいては、ANG 投与群では尾の浮腫部位における断面直径の減少を認めた。また摘出材料の免疫組織化学染色法においてリンパ管密度が有意に増加し、同時に ANG と VEGF-C の相乗効果を認めた。

以上のことから ANG は HMVEC-dLy の細胞動態に影響を与えたことから、HMVEC-dLy の細胞表面に受容体が存在する可能性が示唆された。また血管内皮細胞における報告と同様に、ANG で HMVEC-dLy を刺激すると ERK と AKT がリン酸化されたことから、ANG はリンパ管新生において血管内皮細胞と同様にこれらのシグナル伝達因子が重要な役割を果たしていると考えられた。同時に ANG は核内へ移行しリボソーム形成能を促進したことから、ANG は直接的に作用し細胞増殖を促進していると考えられた。in vivo でも ANG はリンパ管新生を促進し、浮腫の減少を促進していたことから、ANG がリンパ浮腫に対する新規治療法となる可能性を見出した。

よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。