

## 学位論文題名

# Glioma 細胞における Dopamine D2 受容体アゴニスト による Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) 産生の制御およびその作用機序について

## 学位論文内容の要旨

悪性腫瘍の成長には、血管新生が重要な役割を担っている。急速な腫瘍の成長に伴う低酸素・低栄養などの特殊な内部環境が VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), bFGF(basic Fibroblast Growth Factor)などの血管新生因子を誘導し、血管新生が促進されることは広く知られている。種々の血管新生因子のなかでも、主要な役割を果たす VEGF およびその受容体に関する様々な研究がなされており、VEGF の発現調節が主に低酸素誘導因子 (HIF: hypoxia-inducible factor) を介することがこれまでの研究で明らかになった。神経膠腫 glioma における VEGF の発現は組織学的悪性度と相関し、悪性神経膠腫は全固形腫瘍の中でもっとも血管新生能の高い腫瘍である。抗血管新生因子を用いた治療法の開発も広く行われており、すでにいくつかの薬剤は臨床試験が行われている。

dopamine あるいは dopamine 受容体アゴニストが抗血管新生作用をもつことはあまり知られていない。2000年に dopamine および dopamine D2 受容体アゴニストはマウスの卵巣癌細胞において血管新生抑制効果を示し、その機序は、dopamine D2 受容体アゴニストが血管表面の VEGF 受容体 (VEGF-R2) の内在化・リサイクリングを抑制し、VEGF と VEGFR2 の相互作用を阻害することによると報告された。glioma 細胞に対する dopamine D2 受容体アゴニストの血管新生作用に対する作用については、まだ知られていない。本研究では、dopamine D2 受容体アゴニストとして知られる bromocriptine(2-bromo- $\alpha$ -ergocryptine methanesulfonate salt)に注目した。本薬剤のグリオーマ細胞における血管新生能に与える作用およびその機序について検討した。

まず、組織学的にグリオーマと診断された 10 手術検体における D2 受容体の発現を PCR 法で検討したところ、5 検体で D2 受容体の発現が確認された。このうち、悪性度の最も高い glioblastoma では 7 検体中 4 検体で陽性であったが、グリオーマにおいて悪性度が高くなるにつれ血管新生能も高くなるとされることから検討に用いた手術検体中に血管構成細胞成分が混入している可能性も考えられた。つぎにグリオーマ細胞での D2 受容体の発現を同様に PCR 法で検討したところ、全 16 細胞株のうち 4 種類で D2 受容体が発現していた。このうちもっとも VEGF 蛋白の発現の強かった U87MG 細胞株を以降の実験で利用した。

まず D2 受容体アゴニストである bromocriptine を U87MG 細胞に暴露した場合の VEGF 蛋白・mRNA の発現を ELISA 法、Northern blot 法によりそれぞれ検討した。bromocriptine は VEGF 蛋白・mRNA のいずれも抑制した。また低酸素濃度下で細胞を培養した場合、この抑制がさらに強まり、bromocriptine は低酸素条件での VEGF 発現の作用過程になんらかの影響を及ぼしていると推測された。蛋白・mRNA の抑制の程度はほぼ同程度であり、bromocriptine による VEGF 発現の抑制には転写後の調節はあまり関与していないと推測された。VEGF 遺伝子の 5' 上流の配列を利用したルシフェラーゼアッセイでは、bromocriptine が HRE (hypoxia responsible element) と呼ばれる配列の有無により VEGF の転写活性が有意に変化し、bromocriptine は特にこの配列に作用する可能性が高いと考えられた。

低酸素条件における VEGF の発現増加はおもに HIF-1 により調節されている。低酸素条件では HIF-1 の発現が増加するとともに、逆に分解は抑制される。さらに HIF-1 の活性化も誘導される。その結果として HIF-1 が HRE に結合し、VEGF の転写が亢進される。bromocriptine がこの調節過程のどの段階に作用するか調べるために Western blot 法、免疫沈降法による検討を行った。その結果、bromocriptine の投与により MAPK (mitogen-activated protein kinase) のリン酸化が抑制され、その下流の pathway である HIF-1 $\alpha$  の活性化が抑制されると考えられた。また HIF-1 の分解は bromocriptine の投与による影響は受けなかった。

以上のことから、bromocriptine の glioma 細胞における抗血管新生作用は、情報伝達系 (MAPK) の抑制によるものであり、その結果、HIF-1 $\alpha$  の活性化、VEGF の転写活性などの MAPK よりも下流の系が抑制され、VEGF の産生が抑制される。bromocriptine は腫瘍での VEGF 産生の抑制と、血管表面の VEGFR2 の内在化・リサイクリングの抑制という 2 つの機序で血管新生を抑制することと推測される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 岩 崎 喜 信  
副 査 教 授 石 橋 輝 雄  
副 査 教 授 長 嶋 和 郎

学 位 論 文 題 名

## Glioma 細胞における Dopamine D2 受容体アゴニスト による Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) 産生の制御およびその作用機序について

悪性腫瘍の成長には、血管新生が重要な役割を担っている。急速な腫瘍の成長に伴う低酸素・低栄養などの特殊な内部環境が血管新生因子を誘導する。種々の血管新生因子のなかで主要な役割を果たす VEGF および VEGF 受容体に関する様々な研究がなされており、VEGF の発現調節が主に低酸素誘導因子 (HIF : hypoxia-inducible factor) を介することがこれまでに明らかになった。神経膠腫 glioma における VEGF の発現は組織学的悪性度と相関し、悪性神経膠腫は全固形腫瘍の中でもっとも血管新生能の高い腫瘍である。抗血管新生因子を用いた治療法の開発も広く行われているが、dopamine 受容体アゴニストが抗血管新生作用をもつことはあまり知られていない。2000 年に dopamine および dopamine D2 受容体アゴニストはマウスの卵巣癌細胞において血管新生抑制効果を示し、その機序は、dopamine D2 受容体アゴニストが血管表面の VEGF 受容体 (VEGF-R2) の内包化の促進し、VEGF と VEGFR2 の相互作用を阻害することによると報告された。本研究では、dopamine D2 受容体アゴニストとして知られる bromocriptine に注目し、本薬剤のグリオーマ細胞における血管新生能に与える作用およびその機序について検討した。

グリオーマ細胞での D2 受容体の発現を PCR 法で検討したところ、全 16 細胞株のうち 4 種類で D2 受容体が発現していた。このうちもっとも VEGF 蛋白の発現の強かった U87MG 細胞株を以降の実験で利用した。bromocriptine を U87MG 細胞に暴露した場合の VEGF 蛋白・mRNA の発現を ELISA 法, Northern blot 法によりそれぞれ検討したところ、VEGF 蛋白・mRNA のいずれも抑制された。また低酸素濃度下で細胞を培養した場合はこの抑制がさらに強まり、bromocriptine は低酸素条件での VEGF 発現の作用過程になんらかの影響を及ぼしていると推測された。さらに VEGF 遺伝子の上流の配列を利用したルシフェラーゼアッセイでは、bromocriptine が HRE と呼ばれる配列に作用する可能性が高いと考えられた。

VEGFの発現はおもにHIF-1により調節されており、低酸素濃度条件ではHIF-1の発現が増加し、逆に分解は抑制される。さらにHIF-1の活性化も誘導される。その結果、HIF-1がHREに結合し、VEGFの転写を亢進させる。bromocriptineがこの調節過程のどこに作用するか調べるためにWestern blot法、免疫沈降法を行った。低酸素条件で培養したU87MG細胞において、bromocriptineの投与によりMAPKのリン酸化が抑制され、その下流のpathwayであるHIF-1 $\alpha$ の活性化が抑制されたと考えられた。またHIF-1の分解はbromocriptineの投与による影響は受けなかった。bromocriptineのglioma細胞における抗血管新生作用は情報伝達系(MAPK)の抑制により、HIF-1 $\alpha$ の活性化、VEGFの転写活性などのMAPKよりも下流の系が抑制される。bromocriptineは腫瘍でのVEGF産生の抑制と、血管表面のVEGFR2の内包化の促進・リサイクリングの抑制という2つの機序で抗血管新生作用を有すると推測される。公開発表において石橋輝雄哲也教授より、抗血管新生薬としてD2-agonistを選んだ理由やVEGFの転写活性の変化を調べたLuciferase assayに使用したコンストラクトの配列の詳細に関してなどの質問があった。次いで長島和郎教授より、glioma細胞株での他の血管新生因子発現の程度やMAPKの活性化とHIF-1 $\alpha$ の活性化の関連に関する質問があった。最後に、岩崎喜信教授より、D2受容体の手術検体での発現率と組織学的悪性度との関連の有無やD2-agonistを脳腫瘍患者に投与した場合に期待できる効果についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者らは自らの研究に基づく経験や過去の論文の内容を引用し、豊富な知識に基づいて明解に解答した。

この論文はD2-agonistのglioma細胞におけるVEGF産生に対する抑制効果を明らかにし、その機序がMAPKの活性化の低下によるHIF-1 $\alpha$ の活性低下にあることを明らかにした点が高く評価され、今後のD2-agonistの抗血管新生薬としての研究に応用できるものと期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。