

血管新生抑制による悪性神経膠腫の治療  
—臨床応用への分子生物学的機序解明—

(研究課題番号 10671282)

平成10年度—平成11年度文部省科学研究費補助金

基盤研究C(2)

研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 高野晋吾

(筑波大学臨床医学系脳神経外科講師)

寄	贈
高野晋吾氏	平成 年 月 日



平成10年度—平成11年度文部省科学研究費補助金  
基盤研究C(2)  
研究成果報告書

(1) 研究課題番号

10671282

(2) 研究課題

血管新生抑制による悪性神経膠腫の治療—臨床応用への分子生物学的機序解明—

(3) 研究組織

研究代表者：	高野晋吾	筑波大学臨床医学系講師
研究分担者：	奥田諭吉	筑波大学臨床医学系助教授
	坪井康次	筑波大学臨床医学系講師
	三井洋司	工業技術院生命工学技術研究所首席研究官

研究協力者：

(4) 研究経費

平成10年度 1、800千円

平成11年度 1、500千円

(5) 研究発表

原著

- 高野晋吾、柴田 靖、坪井康次、松村 明、能勢忠男：神経膠腫における Technetium-MIBI SPECT と MIB-1 陽性率の対比。Brain Tumor Pathol 15 suppl: 138, 1998.
- 高野晋吾、坪井康次、松村 明、能勢忠男：ヒト神経膠腫における thymidine phosphorylase の発現。Jpn J Cancer Res 89 suppl: 529, 1998.
- Suzuki K, Takano S, Nose T: Increased concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) in chronic subdural hematoma. J Trauma 46: 532-533, 1999.
- 高野晋吾、坪井康次、趙 大文、松村 明、伴野悠士、能勢忠男：髄膜腫と神経膠芽腫における血管新生の分子病理学的差異。Brain Tumor Pathol 16: suppl 47, 1999.
- 高野晋吾、塚田篤郎、鯨岡裕司、佐藤博昭、伴野悠士、能勢忠男：神経膠腫の放射線照射後2ヶ月で占拠性腫瘤を呈した1例。Brain Tumor Pathol 16: suppl 115, 1999.
- 高野晋吾、坪井康次、松村 明、能勢忠男、三井洋司：Interferon-β によるグリオーマの血管新生抑制：IP-10 の発現誘導と VEGF の産生抑制。Jpn J Cancer Res 90: suppl 237, 1999.

- Takano S, Tsuboi K, Matsumura A, Mistui Y, Nose T: Inhibition of VEGF promoter activity in glioma. *Neuro-Oncol* 1: S97, 1999.
- 高野晋吾、坪井康次、松村 明、伴野悠士、能勢忠男：Gliosarcomaの血管新生能、腫瘍血管の微細構造。 *Jpn J Clin Electron Microsc* 32 : suppl 68, 1999.
- Takano S, Tsuboi K, Matsumura A, Tomono Y, Mistui Y, Nose T: Expression of the angiogenic factor thymidine phosphorylase in human astrocytic tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 126: 145-152, 2000.
- Takano S, Tsuboi K, Tomono Y, Mitsui Y, Nose T: Tissue factor, osteopontin,  $\alpha v\beta 3$  integrin expression in microvasculature of gliomas associated with vascular endothelial growth factor expression. *Br J Cancer* (2000 in press).

#### 著書

- Takano S, Tsuboi K, Matsumura A, Nose T: Molecular mechanism of glioma angiogenesis. *Recent Research Developments in Cancer. Transworld Research Network* (2000 in press).

#### 発表

- Shingo Takano, Koji Tsuboi, Tadao Nose: Tissue factor expression in microvasculature of astrocytic tumors associated with VEGF expression and p53 mutations. *AACR Special Conference. Angiogenesis and Cancer. 98/1 Florida.*
- 高野晋吾、柴田 靖、坪井康次、松村 明、能勢忠男： 神経こう腫における Technetium-MIBI SPECT と MIB-1 陽性率の対比—特に両者に違いのみられた症例の病理組織像について—。第16回日本脳腫瘍病理学会（5月28日、福岡）、1998年
- 高野晋吾、坪井康次、松村 明、能勢忠男： ヒト神経こう腫における thymidine phosphorylase の発現—血管新生、p53、apoptosis との関係。第57回日本癌学会総会（10月1日、横浜）、1998年
- 高野晋吾、坪井康次、松村 明、伴野悠士、能勢忠男： グリオーマ悪性化の分子機構：血管新生スイッチ—。第7回日本脳腫瘍カンファランス（シンポジウム、11月8日、金沢）、1998年
- 高野晋吾、坪井康次、松村 明、伴野悠士、能勢忠男： 神経こう腫における血管新生の調節因子—VEGF と thrombospondin1 のバランスの重要性—。第7回日本脳腫瘍カンファランス（11月8日、金沢）、1998年
- 高野晋吾、坪井康次、趙 大文、松村 明、伴野悠士、能勢忠男： 髄膜腫と神経膠芽腫における血管新生の分子病理学的差異。17回日本脳腫瘍病理学会（4月1

6日、前橋)、1999年

- 高野晋吾、塚田篤郎、鯨岡裕司、佐藤博明、伴野悠士、能勢忠男： 神経膠腫の放射線照射後2ヶ月で占拠性腫瘍を呈した1例。17回日本脳腫瘍病理学会（4月16日、前橋）、1999年
- Shingo Takano, Koji Tsuboi, Akira Matsumura, Tadao Nose: Regulation of glioma angiogenesis: balance of VEGF / thrombospondin-1 and brain specific angiogenesis inhibitor-1. Angiogenesis Novel Therapeutic Development, Boston, 99/3/22.
- Shingo Takano, Koji Tsuboi, Akira Matsumura, Youji Mitsui, Tadao Nose: Inhibition of VEGF promoter activity in glioma. The 13<sup>th</sup> International Conference on Brain Tumor Research and therapy (Oct 4-6, Sapporo), 1999
- 高野晋吾、坪井康次、松村 明、伴野悠士、能勢忠男： Interferon- $\beta$  によるグリオーマの血管新生抑制：IP-10 の発現誘導と VEGF の産生抑制。第58回日本癌学会総会（10月、広島）、1999年
- 高野晋吾、坪井康次、松村 明、伴野悠士、能勢忠男： グリオーマにみられる内因性血管新生抑制因子。第58回日本脳神経外科学会総会（10月27日、東京）、1999年
- 高野晋吾、坪井康次、松村 明、伴野悠士、能勢忠男： Gliosarcoma の血管新生能、腫瘍血管の微細構造。シンポジウム、第31回日本電子顕微鏡学会（11月17日、東京）、1999年
- 高野晋吾、坪井康次、松村 明、伴野悠士、能勢忠男： Gliosarcoma の浸潤能・血管新生能。第8回日本脳腫瘍カンファランス（11月14日、新潟）、1999年

## 目次

### 血管新生抑制による悪性神経膠腫の治療

#### —臨床応用への分子生物学的機序解明—

(1) 研究の背景・目的	5
(2) 研究の特色と意義	6
(3) 研究成果	7
(4) 今後の展望	21
(5) 参考文献	24

## (1) 研究の背景・目的

悪性神経膠腫の治療成績は既存の手術、放射線、化学療法では生存期間中央値が 50-60 週で、この 10 年間の成果はわずかに生存期間中央値として 20 週前後の延長にとどまっているために、新しい治療戦略が望まれる。その中で、腫瘍血管新生に対する関心が高まっている。癌遺伝子と癌抑制遺伝子の変異によって細胞が悪性転換して腫瘍が形成されたとしても、腫瘍血管が新生されなければ、腫瘍は一定以上に大きくなることはないといわれている。これは腫瘍細胞の増殖と同程度にアポトーシスが生じることから全体として増大できないためであり、腫瘍細胞が新生血管誘導能を獲得して腫瘍血管が新生されると、腫瘍細胞はアポトーシスを免れ、結果として腫瘍は加速度的に増大するためと説明されている。実際に悪性神経膠腫の組織学的検索から、腫瘍内の血管密度を腫瘍血管新生の指標とすると、様々な悪性腫瘍の中でも悪性神経膠腫は最も血管新生の盛んな腫瘍であり、また腫瘍のアポトーシスの程度が他の悪性腫瘍に比べて低い腫瘍である。従って悪性神経膠腫に対する血管新生抑制を標的とした治療は悪性神経膠腫の不良な治療成績を打破する可能性のある治療である。

悪性腫瘍の治療法としての血管新生抑制に対する多くの基礎研究がなされ、すでに臨床治験に入っている血管新生抑制剤もある。標的とする血管新生抑制の方法には、血管新生の分子機構の解明に基づき、血管新生因子（特に血管内皮細胞増殖因子；VEGF）を抑制する方法、内因性血管新生抑制因子、すなわち腫瘍自身の持つ抑制因子を利用する方法、外因性血管新生因子、すなわち血管新生抑制薬剤を投与する方法に分かれる。本研究では 1) 神経膠腫細胞および組織における内因性血管新生抑制因子の同定、血管新生因子／抑制因子のバランスの同定、抑制因子過剰発現による *in vitro* 血管新生の抑制、2) 外因性血管新生因子として経口血管新生抑制薬剤による神経膠腫の *in vivo* 増殖抑制、3) VEGF の抑制の中でも VEGF promoter の抑制物質の探索に焦点を絞り、それぞれの方法による血管新生抑制を *in vitro* , endothelial cell migration assay および *in vivo* , 脳腫瘍モデル、脳腫瘍微小循環モデルで評価し、分子生物学的機序を明らかにしながら、血管新生抑制による悪性神経膠腫治療の臨床応用への展開を目的として研究する。

## (2) 研究の特色と意義

1。血管新生抑制因子の検討が近年盛んに行われているが、各々の細胞あるいは組織において血管新生因子と抑制因子のバランスを検討する試みは、未だに少ない。血管新生の盛んな神経膠腫でのバランスの検討は重要である。内因性血管新生抑制因子、thrombospondin-1 (TSP-1)の過剰発現の研究が近年散見される。fibroblast では wt-p53 の発現により TSP-1 の発現がみられ血管新生が抑制された。乳癌細胞への TSP-1 の過剰発現により *in vitro* および *in vivo* で血管新生が抑制された。神経膠腫細胞への wt-p53 の導入により TSP-1 とは違った未知の血管新生抑制因子が報告された。神経膠腫細胞への wt-p53 の導入により VEGF promoter が抑制された。しかし、VEGF promoter には wt-p53 の binding site が見つかっておらず、promoter 抑制には他の機序、例えば TSP-1 を介した VEGF の抑制も考えられる。また、近年 wt-p53 が結合する因子の検索から TSP-1 フラグメントと非常に高い相同性のある物質、brain specific angiogenesis inhibitor (BAI)が同定された。BAI は脳組織特異的で、正常のグリア細胞にはみられるが、神経膠腫細胞では見られなかったとされている。これらの事実は TSP-1 が神経膠腫の血管新生に強く関わりのあることを示している。神経膠腫の血管新生の molecular framework が VEGF、TSP-1、p53 を中心として理解できるとともに、神経膠腫細胞への TSP-1 過剰発現に伴う VEGF の promoter および mRNA 発現の抑制を検討する事は急務であると考えられる。

2。経口血管新生抑制薬の抗腫瘍効果をラット脳腫瘍モデルで確かめることは、臨床応用への第一歩と考える点。今回試みる経口薬は従来他の薬理作用により患者に用いられている薬剤であり、その毒性はすでに十分に検討されている。従って、これらの薬剤により抗腫瘍効果を得ることができれば、神経膠腫の血管新生抑制治療への臨床応用が期待できる。経口血管新生抑制薬による神経膠腫治療の可能性。経口抑制薬の中でイルソグラジンは糖尿病性網膜症の患者で効果がみられたという報告が学会でなされた。神経膠腫では報告がなく、放射線、化学療法でも必ず局所に再発をきたす神経膠腫の進行をこれら抑制薬が副作用なく抑える事が予測される。

3。VEGF promoter を抑制する遺伝子として p53 が報告されているが他の遺伝子あるいは低分子物質はまだ解っていない。VEGF promoter を抑えることにより、VEGF antisense、VEGF 中和抗体より強力な抗 VEGF 作用を期待し、VEGF を標的とした血管新生抑制療法の基盤となる。



### (3) 研究成果

#### グリオーマ血管新生の分子機構

グリオーマの血管新生に関わる分子機構を明らかにすべく、新しく同定された血管新生および血管新生関連因子、グリオーマ悪性化の分子機構としての血管新生スイッチ、マクロファージの役割、グリオーマと髄膜腫の違い、Glioblastoma の 1 型である gliosarcoma の血管新生能につき検討した。

#### 1. グリオーマにおける血管新生因子 Thymidine phosphorylase の発現 (参考文献 1)

目的：近年、血管新生因子として同定された Thymidine phosphorylase (TP) の発現を脳腫瘍組織で検討する。

対象・方法：

- 1) 組織準備：63例のグリオーマ組織(27例 膠芽腫(GBM)、19例 退形成星状細胞腫(AA)、17例 星状細胞腫(LGA))と5例の正常脳組織を用いた。組織の一部は10%ホルマリンに48時間固定後、パラフィン包埋し、5 $\mu$ m切片を作成し通常の病理診断および免疫組織科学に使用した。一部は摘出後ただちに液体窒素で凍結し、-70°Cの保存し、蛋白、RNAの抽出に使用した。
- 2) 免疫組織科学：免疫組織科学はLSABキット(Dako)を用い、使用した抗体はモノクローナル抗TP抗体、654-1(日本ロシユ)、ポリクローナル抗VEGF抗体、A20(Santa Cruze Biotech)、モノクローナル抗ヒト第8因子関連抗原抗体(Dako)、モノクローナル抗ヒトマクロファージ抗体、KP1, HAM56(Dako)、モノクローナル抗p53抗体、DO7(Dako)、モノクローナル抗MIB-1抗体(Immunotech)である。VEGFとTPの発現程度は腫瘍細胞、血管内皮細胞に分けて、一、十、++の3段階で評価した。P53とMIB-1陽性率は1000個以上の腫瘍細胞を数えて求めた。腫瘍血管密度は200倍視野での抗ヒト第8因子関連抗原抗体で染まる血管数、3視野の平均値で求めた。
- 3) アポトーシス細胞の検出：腫瘍パラフィン切片でApopTag in situ detection kitを用いて行った。少なくとも5視野、3000個以上の腫瘍細胞を観察し、陽性率を求めた。
- 4) RNAの抽出とreverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)：13例の凍結組織(5例 GBM, 2例 AA, 3例 LGA, 3例 正常脳)からRneasy Mini Kit

(Qiagen)を用いて RNA を抽出し、GeneAmp RNA PCR Kit (Perkin-Elmer Cetus)を用いて RT-PCR を行った。VEGF, TP,  $\beta$ -actin に特異的なプライマーを用いた。TP, VEGF,  $\beta$ -actin の mRNA 発現程度は PCR 産物を NIH Image で測定した。

5) Thymidine phosphorylase ELISA: 13例の凍結組織(6例 GBM, 2例 AA, 3例 LGA, 2例 正常脳)をホモジナイズし、蛋白濃度を測定し、ELISAでTP蛋白濃度を求めた。

結果：グリオーマ組織におけるTPとVEGFの免疫組織科学的局在と濃度：免疫組織科学の結果をTableに示す。TP抗原は腫瘍細胞および腫瘍血管の細胞質あるいは核に局在していた(参考文献 Fig 1)。腫瘍細胞ではGBMの27例中17例、AAの19例中11例、LGAの17例中2例にみられた。腫瘍血管ではGBMの27例中8例、AAの19例中4例、LGAの17例中1例にみられた。正常脳には発現はみられなかった。ELISAによるTP濃度はGBM, AAでLGA, 正常脳に比べて有意に高かった(参考文献 Fig 2)。RT-PCRによるTP、VEGFのmRNA発現の程度も組織学的悪性度に伴って強くみられ(参考文献 Fig 3)、TPとVEGFのmRNA発現には強い相関がみられた(参考文献 Fig 4)。また腫瘍組織の連続切片をマクロファージ抗体とTP抗体で染色することにより、TP陽性細胞の一部はマクロファージであることが判明した。

さて、グリオーマ組織をTP陽性の腫瘍と陰性の腫瘍に分けると、いくつかの点で明らかな違いがみられた(参考文献 Table 1)。すなわち、TP陽性の腫瘍ではTP陰性の腫瘍に比べて、MIB-1陽性率で現される腫瘍増殖能、腫瘍血管密度、p53陽性率、VEGF陽性率、apoptosis indexが有意に高かった。さらに、TPとVEGFの腫瘍細胞での陽性所見は63例中45例で同程度にみられた。これらの所見の中で、apoptosis indexだけはGBMだけに限ってみても、TP陽性のGBMではTP陰性のGBMに比べて有意に高かった。

結語：以上の結果はTPがVEGFとともに、グリオーマの強力な血管新生因子であるとともに、グリオーマの増殖とアポトーシスと密接な関係があることを示した。TP発現の高いグリオーマでアポトーシスの程度が高い理由は明らかではないが、血管新生因子の過剰発現に伴う、血管新生の内因性抑制因子の関与が推察された。

## 2. VEGF 発現に関係する、組織因子、オステオポンチン、 $\alpha$ v $\beta$ 3 インテグリンのグリオーマ腫瘍血管における発現 (参考文献 2)

目的：VEGFはグリオーマの強力な血管新生因子である。近年、VEGFによって血管内

皮細胞の組織因子 (tissue factor: TF)、オステオポンチン (OPN)、 $\alpha v\beta 3$  インテグリンが誘発され、生体内で血管新生に関わる大切な分子であることが明らかにされた。これらの分子のグリオーマ組織での発現を観察し、その意義を同定することを目的とした。

**対象および方法:** 68例のグリオーマ組織 (膠芽腫(GBM)23例、退形成星細胞腫(AA)13例、星細胞腫(LGA)32例) と5例の正常脳組織を用いた。組織の準備は成果の1と同様である。VEGF, TF, OPN,  $\alpha v\beta 3$  インテグリンの発現を免疫組織科学で検討すると共に、腫瘍血管密度を求めた。29例の凍結組織 (GBM10例、AA4例、LGA9例、正常脳6例) では、VEGF および TF に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行い、mRNA 発現を半定量化した。また、9種類の悪性グリオーマ細胞およびヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いて、グリオーマ細胞の培養液による HUVEC の TF 発現を検討した。

**結果:** 血管内皮細胞での TF の発現は GBM の 74%、AA の 54% にみられ、LGA ではみられず、腫瘍血管密度と相関していた (参考文献 Table)。VEGF と TF の二重染色では GBM 組織での両蛋白の局在は一致していた (参考文献 Fig 1)。グリオーマ組織における VEGF と TF の mRNA 発現の程度は有意な相関がみられた (参考文献 Fig 4)。9種類のグリオーマ細胞は24、48、72時間の間で様々な量の VEGF を培養液中に分泌している。グリオーマ細胞の培養液で HUVEC を18時間培養し、HUVEC の RNA を抽出し、TF に特異的なプライマーで RT-PCR を行った (参考文献 Fig 5)。VEGF 分泌の少ないグリオーマ細胞の培養液では、メデイウムだけのときと同様 TF の発現はみられないが、VEGF 分泌の多いグリオーマ細胞の培養液では、VEGF 10 ng/ml と同程度に TF の発現亢進がみられた。しかしながら、VEGF 分泌の多い細胞の培養液に VEGF 中和抗体をいれて HUVEC を培養すると、TF 発現は減弱からみられなくなることより、グリオーマ細胞培養液による HUVEC の TF 発現亢進にはグリオーマの分泌する VEGF が重要な役目をもっていることが判明した。Osteopontin、 $\alpha v\beta 3$  インテグリンの発現は免疫組織科学では悪性グリオーマ組織の腫瘍血管にみられ、VEGF との二重染色で Osteopontin、 $\alpha v\beta 3$  インテグリン陽性の血管は VEGF も陽性であった (参考文献 Fig 2)。

**考察:** VEGF と VEGF によって誘発される血管内皮細胞での分子、TF, osteopontin,  $\alpha v\beta 3$  インテグリンはグリオーマの腫瘍血管で組織だって分布しており、それぞれがグリオーマの血管新生のマーカーとなりうる。TF は活性型トロンビンの形成に働き、細胞外基質の修飾に携わる。Osteopontin は  $\alpha v\beta 3$  インテグリンのリガンドであり、両

者は内皮細胞の遊走に関係している。それぞれの生理活性は違うがグリオーマ組織内では、これら分子が互いに関係しあって、単独ではなく総合的に関与してグリオーマの血管新生を行っていると考えられる。

### 3. グリオーマ悪性化の分子機構－血管新生スイッチー

目的：星細胞腫（LGA）は経過中に悪性化をきたすことがあり、決して予後良好な疾患ではない。LGA 初発時に悪性化するの否かを判定できるのかどうか、増殖能、血管新生能に注目して検討する。

対象および方法：診断時より5年以上経過をおえた54例のLGAを対象とした。臨床データから悪性化までの時間、生存率を求めた。各症例のパラフィン切片で、p53, MIB-1 染色を行い、それぞれの陽性率を腫瘍細胞1000個以上で求めた。血管新生能の指標として、VEGF, tissue factor, thymidine phosphorylase, osteopontin に対する抗体で免疫染色し、染色の程度で－、＋、＋＋の3段階に分類した。また、CD34 抗体による染色で200倍視野中（1.0mm<sup>2</sup>）の血管数を数えた。

結果：VEGF 陽性の腫瘍は18例、陰性の腫瘍は36例であった。陽性の腫瘍と陰性の腫瘍の間には生存率：mean ± SD 44.0 ± 5.7 months vs 69.9 ± 5.2 months (p = 0.022)、悪性化までの時期：33.9 ± 6.2 months vs 66.5 ± 8.8 months (p = 0.048)、血管密度：36.6 ± 21.3 vs 23.7 ± 15.1 (p = 0.0133)に有意な違いがみられた。しかし、MIB-1 陽性率：3.4 ± 4.0 % vs 2.8 ± 2.8 %、p53 陽性率：12.1 ± 22.7 % vs 5.6 ± 10.9 %には違いがみられなかった（Table）。また、VEGF に関連する血管新生関連因子である tissue factor, osteopontin や別の血管新生因子である thymidine phosphorylase もまたこれら VEGF 陽性腫瘍では発現が高かった。

結語：星細胞腫の VEGF 発現は予後因子となり、星細胞腫の中に腫瘍増殖能とは別に、血管新生のスイッチが入った状態のグループが存在する。

### 4. グリオーマ血管新生におけるマクロファージの役割（参考文献3）

目的：腫瘍組織内のマクロファージは VEGF, basic FGF, tumor necrosis factor  $\alpha$  などのサイトカインやコラゲナーゼ、ウロキナーゼといった血管新生因子を細胞外基質より有利させる酵素を分泌することから腫瘍の血管新生に関与すると考えられている。グリオーマ組織内でのマクロファージの血管新生への役割を検討する。

対象および方法：19例のグリオーマ組織（8例 膠芽腫（GBM）、5例 退形成星細胞腫（AA）、6例 星細胞腫（LGA））のパラフィン切片で、血管内皮細胞のマー

カーとして第8因子関連抗原抗体、マクロファージのマーカーとして KP1, HAM56 抗体で免疫染色した。マクロファージの浸潤はグリオーマ組織内で Parenchymal, 血管周囲、壊死組織周囲の3部位に分類された。このうち parenchymal なマクロファージの浸潤を一、+、++の3段階にグレード化した。腫瘍血管密度は第8因子関連抗原抗体で染色される血管数を200倍視野で数えた。

**結果：**parenchymal なマクロファージの浸潤は GBM で最も強く、LGA で弱くみられ、グリオーマの組織学的悪性度に伴っていた。マクロファージの浸潤と腫瘍血管との分布をみるために、7例の GBM において連続切片で KP1, VEGF, factor VIII の抗体で免疫染色した。38領域の200倍視野で KP1 の染色の程度と腫瘍血管密度を測定した。KP1 と腫瘍血管の分布は腫瘍組織内において均一ではなく、KP1 の陽性所見が強い部位は腫瘍血管密度が低く、KP1 の陽性所見が弱い部位は腫瘍血管密度が高かった。同時に行った VEGF 染色では、VEGF は腫瘍細胞およびマクロファージが陽性で、VEGF の局在はマクロファージ浸潤が強く、血管密度の低い部位にみられた (参考文献 Fig 6, 7)。

**考察：**悪性グリオーマ組織内ではマクロファージは、血液供給の最も離れた腫瘍の低酸素領域にひきつけられ、そこで VEGF などの血管新生因子を分泌し、血管新生を促進する。グリオーマ組織内にみられるマクロファージは VEGF との連係でグリオーマの血管新生を調節する役割を持っていることが明らかにされた (Figure 1)。

## 5. グリオーマと髄膜腫における血管新生の分子機構の違い

**目的：**髄膜腫(MEN)と神経膠芽腫(GBM)は血管造影での腫瘍濃染像が特徴的であり、共に hypervascular tumor である。一方、MEN は良性腫瘍、GBM は悪性腫瘍であり、腫瘍成長の面からは大きな違いがある。両者の血管新生に関する因子の差異を検討した。

**対象および方法：**①24例のテント上 MEN、23例の GBM のパラフィン切片で、LSAB kit (Dako)を用い免疫染色を行った。抗体は VEGF (Santa Cruze), Tissue Factor (TF; American Diagnostica), Osteopontin (OPN; DSHB), Thymidine phosphorylase (日本ロシユ)で、染色の結果は腫瘍と血管にわけ、10%以上の染色を陽性とした。②12例の MEN、5例の GBM で凍結組織からホモジネートを作成し、ELISA にて VEGF 蛋白濃度を測定した。③5例の MEN、5例の GBM で凍結組織から、total RNA を抽出し、VEGF, TF, TP に特異的なプライマーを作成し、RT-PCR で mRNA を定量化した。④9種の glioma cell line、2種の MEN の primary culture を用い、VEGF, TF, TP

について RT-PCR を、培養上澄液中の VEGF 蛋白を ELISA と Western Blot で計測した。

結果：①免疫染色の陽性率（％）の結果を示す(Tm = Tumor, EC = endothelial cell)。

Tumor	VEGF		TF		OPN		TP	
	Tm	EC	Tm	EC	Tm	EC	Tm	EC
MEN	88	21	17	0	42	17	60	30
GBM	100	78	91	74	100	100	74	35

GBM に比べて、MEN では VEGF が腫瘍には良く染まるが、血管の染色が少ないこと、TF, OPN の染色が腫瘍、血管とも少ないことが特徴的であった。②腫瘍組織の ELISA による VEGF 濃度は、MEN:  $258.6 \pm 344.7$ , GBM:  $6281.4 \pm 3317.0$  pg/mg protein で MEN で有意 ( $p < 0.01$ ) に低かった。③腫瘍組織の RT-PCR による VEGF, TF, TP の解析は MEN で TF の発現が低かった。④腫瘍細胞の VEGF は MEN, GBM 共に RT-PCR では高発現していたが、ELISA, Western blot では非常に低発現であった。

結語：MEN と GBM の血管新生に関わる因子の中で VEGF の蛋白分泌、TF, OPN の発現に大きな違いがみられた。

## 6. Gliosarcoma の浸潤能、血管新生能

【はじめに】 Gliosarcoma (GS) は Glioblastoma (GBM) に分類されるが、中枢神経系外転移、急速な髄腔内播種をきたし、殆どが sarcomatous component からなる境界明瞭な硬い腫瘍を呈し、臨床病理学的に通常の GBM と違う GS の 2 例を経験した。その浸潤能、血管新生能を GBM と比較検討した。

【症例 1】 50 歳、男性。痙攣発作で発症。左側頭葉腫瘍を全摘出した（培養細胞 Higa; 組織 GS1）。1 年後に肺転移巣を生検で確認、3 ヶ月後に小脳腫瘍を全摘出した（組織 GS2）。【症例 2】 2 歳、男児。頭痛で発症、左前頭葉腫瘍を全摘出した。2 ヶ月後に初発部位に再発、脳室、脳槽に広範に播種巣を認め、再発腫瘍を全摘出した（培養細胞 Suzu, 組織 GS3）が、全経過 4 ヶ月で死亡した。

【方法】 GS 細胞 (Higa, Suzu)、6 種の GBM 細胞、腫瘍組織： GS (GS 1, 2, 3)、2 種の GBM、2 種の Low Grade Astrocytoma、3 種の転移性脳腫瘍組織を用いた。I) 浸潤能の評価は細胞培養液、腫瘍組織抽出液を用い Gelatin zymogram で Gelatinase activity を、II) 血管新生能の評価は CD34 染色で組織血管数、細胞培養液で HUVEC 遊走能、VEGF 濃度、RT-PCR で VEGF, bFGF, tissue factor mRNA の発現を、III) 電顕で腫瘍血管の微細構造を検討した。



【結果】I) Gelatinase activity: GS, GBM 共に 92 kD (MMP9), 72 kD (MMP2)および 67kD(活性型 MMP2)の発現が LGA に比し強かった。GS では GBM に比べ 57kD、特に 45kD (活性型)の MMP3 の発現が強くみられた(Figure 2)。II) 血管新生能は GS、GBM 共に高く、両者に違いはなかった。III) GS の微細構造で腫瘍血管の基底膜と腫瘍間質の境界はわからず、血管周囲の細胞(腫瘍、周皮細胞)に Weibel-Palade body がみられた。

【結語】GS の浸潤能に MMP3 の関与、腫瘍間質と連続する血管基底膜の構造の関与が示唆された。

## グリオーマの血管新生抑制

グリオーマの増殖に必須な血管新生は、血管新生因子と血管新生抑制因子とのバランスから成り立っている。血管新生因子では腫瘍細胞あるいはマクロファージが分泌する VEGF が中心的な役割を果たし、thymidine phosphorylase、tissue factor、osteopontin、 $\alpha\beta 3$  integrin といった種々の血管新生関連因子の重要性が明らかにされてきた。抑制因子に関する報告、新生因子と抑制因子のバランスまで言及する報告は少ない。グリオーマの血管新生抑制による治療の臨床応用へのステップとして 1) 内因性血管新生抑制因子の同定、2) 内因性抑制因子の過剰発現による効果、3) VEGF プロモーター活性の抑制による効果、4) 外因性血管新生抑制物質による効果を検討した。

### 1. グリオーマにおける血管新生バランス- VEGF と thrombospondin1- (参考文献 3)

目的：グリオーマの血管新生因子として VEGF の重要性が指摘されている。一方、アンギオスタチン、エンドスタチン、thrombospondin 1(TSP1)といった内因性血管新生抑制因子の存在が注目され、血管新生は刺激因子と抑制因子のバランスで調節されていると考えられる。グリオーマにおける VEGF と TSP1 の発現を *in vitro*, *in vivo* で捉え、両者のバランスと血管新生の関係を検討した。

対象および方法：9種類のヒトグリオーマ細胞、ヒト繊維芽細胞、ヒト血管内皮細胞(HUVEC)から VEGF, TSP-1,  $\beta$ -actin の mRNA 発現を RT-PCR を用い定量した。各細胞の 24, 48, 72 時間の無血清培養後の細胞培養液を用いて、ELISA による VEGF 濃度の定量、chemotaxis chamber を用いた HUVEC の migration assay を行った。2種類の細胞(A172, U251)では低酸素状態による VEGF, TSP1 mRNA 発現の変化を検討した。10例のグリオーマ凍結組織(神経膠芽腫(GBM)5例、退形成星細胞腫(AA)



2例、星細胞腫（LGA）3例、および2例の正常脳を用い、VEGF, TSP1 の発現を蛋白レベル（免疫組織化学、ELISA）、mRNA レベル（RT-PCR）で検討した。同時に組織切片を用い factor VIII で染色される200倍視野中の血管密度を測定した。

結果：グリオーマ細胞の培養液による HUVEC の遊走能は mRNA の VEGF / TSP1 ratio が高い細胞（Becker: ratio = 2.5）で強くみられ、抗 VEGF 中和抗体（MV303; 1/10 – 1/500）、TSP 抗原（3.3 – 170 ng/ml）により濃度依存的に最高45%まで抑制された（参考文献 Fig 9）。また、VEGF / TSP1 ratio の低い細胞（TK2; ratio = 0.8）では抗 TSP 抗体（1/500）により HUVEC の遊走が増強された。低酸素状態では A172 細胞の VEGF mRNA 発現は3時間より増強され、24時間で約3倍となり、培養液中の VEGF 濃度も約3倍となった。一方、TSP1 の mRNA 発現は低酸素状態で変わらず、VEGF / TSP1 ratio は3倍に増強された。組織での VEGF 発現は蛋白レベル、mRNA レベルとも GBM, AA では LGA、正常脳に比べて有意に強かった。TSP1 の発現は免疫組織化学で GBM の血管、腫瘍細胞にみられたが、LGA、正常脳ではみられなかった。RT-PCR による TSP1 mRNA 発現は GBM で強い傾向がみられたが、LGA、正常脳でもみられ、VEGF / TSP1 ratio は GBM, AA で LGA、正常脳に比べて有意に高く、VEGF 単独よりもその差が顕著であった。また、VEGF / TSP1 ratio は組織中の血管密度と有意な相関がみられた（ $p = 0.79, p < 0.05$ ）。

結語：血管新生刺激因子と抑制因子のバランス（VEGF / TSP1 ratio）はグリオーマの血管新生を *in vitro*, *in vivo* で調節する。VEGF の発現低下あるいは TSP1 の発現減弱による治療がグリオーマの血管新生を抑制し、増殖を抑制することが示唆された。

## 2. グリオーマの内因性血管新生抑制因子の同定（参考文献3）

目的：グリオーマの血管新生は新生因子と抑制因子のバランスから成り立つ。新生因子については多数の報告があるが、抑制因子の報告は少ない。グリオーマ組織、細胞における内因性抑制因子の発現を検討した。

対象および方法：13例のグリオーマ組織および3例の正常脳組織、9種の悪性グリオーマ細胞、繊維芽細胞、血管内皮細胞（HUVEC）から RNA を抽出し、内因性抑制因子、thrombospondin-1 (TSP-1), platelet factor 4 (PF-4), brain specific angiogenesis inhibitor-1(BAI-1), interferon inducible protein 10 (IP-10) の mRNA 発現を RT-PCR 法で検討した。TSP-1 は免疫組織化学、IP-10 は細胞抽出液のウエスタンブロットにより蛋白の発現も検討した。

結果：1) TSP-1 の発現は GBM > AA = LGA > 正常脳の順にみられ（参考文献 Fig 8）、

免疫組織化学で GBM の血管に強い陽性所見を認めた。細胞では繊維芽細胞に強い発現を認め、グリオーマ細胞では様々であった。TSP-1 発現の高いグリオーマ細胞の培養液への TSP 抗体投与により HUVEC の遊走が増強された。TSP-1 発現の低い細胞の培養液への TSP 抗原投与により HUVEC の遊走が抑制された(参考文献 Fig 9)。

2) BAI-1 の mRNA 発現は GBM, AA, LGA, 正常脳で同様にみられた。グリオーマ細胞の 1 種類のみを発現がみられた。 3) IP-10 の発現は 2 例の GBM で正常脳に比べ強発現していた。細胞では通常の状態では発現はみられず、interferon- $\beta$ 100 U / ml 投与後 6 時間より強く発現がみられた。 4) PF-4 は組織、細胞ともに発現はみられなかった。

結語： TSP-1, BAI-1, IP-10 はグリオーマの内因性血管新生抑制因子として同定された。これら抑制因子は生体、腫瘍にとって生理的であり、その過剰発現は腫瘍の血管新生を負の方向に導き、グリオーマの増殖抑制に繋がる治療として重要と考えられる。

### 3. グリオーマの内因性血管新生抑制因子の過剰発現 (参考文献 3)

目的：前回までの研究でグリオーマの内因性血管新生抑制因子の過剰発現によるグリオーマの治療の可能性を示唆した。内因性血管新生抑制因子として thrombospondin-1 (TSP1), interferon inducible factor 10 (IP10), brain specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1) の発現が悪性神経膠腫細胞および組織でみられた。治療への応用を考え、過剰発現による *in vitro* および *in vivo* の血管新生抑制、脳腫瘍増殖抑制の状態を検討する。

対象および方法：

- 1) TSP1 の過剰発現：TSP1 の発現 plasmid DNA (pcDNA TS1) およびコントロール plasmid (pcDNA neo) の調整を行った。TSP 1 発現の低いグリオーマ細胞 (Becker) にリポフェクチンおよび electroporation を用いて強制発現させた。発現の程度を RT-PCR で mRNA をウエスタンブロットで細胞培養液中の蛋白を同定する。強制発現させたグリオーマ細胞の血管新生能を細胞培養液による HUVEC の遊走能で評価し、*in vivo* マウス皮下腫瘍モデルで評価する。
- 2) IP10 の過剰発現：3 種類のグリオーマ細胞 (U87, Becker, TK2) の細胞培養液に Interferon- $\beta$  を種々の条件で投与した。投与後の細胞で RT-PCR により IP10, VEGF, bFGF,  $\beta$ -actin の mRNA 発現を評価した。投与後の細胞培養液中の IP10 蛋白の発現をウエスタンブロットで、VEGF 蛋白の発現を ELISA, ウエスタンブロットで評価した。また、投与後の細胞培養液による HUVEC の遊走能をボイデンチャンバーで

評価した。In vivo の評価として、U87 細胞のマウス皮下腫瘍モデルで検討した。U87 細胞の継代皮下腫瘍のフラグメントを、6 週のオス SCID マウスの皮下に埋め込み、7—10 日後に、皮下腫瘍の大きさが 5 x 5 mm になった時点から、Interferon  $\beta$  高濃度 (50 万 U / 0.2 ml / 匹 / 日)、Interferon  $\beta$  低濃度 (10 万 U / 0.2 ml / 匹 / 日)、コントロール (生理食塩水 0.2 ml / 匹 / 日) の腫瘍局所注射を連日、6 週間にわたり行った。

結果：

- 1) TSP1 の過剰発現：3つの問題点があり現在も施行中である。1つは TSP1 に対する抗体が手にはいらなくなり、強制発現させた場合の検出方法が不十分になったこと、2つめは TSP1 発現の低い神経膠腫細胞 (Becker) に発現を試みたが、Becker は in vivo で腫瘍を形成せず、in vivo の効果を見るために不十分であった。腫瘍形成能のある U87 細胞で実験をくり返している。3つめはリポフェクチンおよび electroporation を用いても導入効率が非常に低い点である。他のグリオーマ細胞 (U251)での導入、導入条件を変えて現在も施行中である。
- 2) IP10 の過剰発現：IP10 は 10 – 500 U / ml の低濃度の interferon- $\beta$  で、6 時間後から 24 時間の間で強力に神経膠腫細胞に誘導される (参考文献 Fig 10)。interferon- $\beta$  の神経膠腫細胞への投与は、血管新生抑制因子である IP10 を誘導するだけでなく、血管新生因子である VEGF の産生を抑制し、強力に神経膠腫による血管新生を抑制した (Jpn J Cancer Res, 1999)。現在、U87 細胞皮下腫瘍モデルでの血管新生抑制および腫瘍増殖抑制効果を検討中である。

結語：TSP1 の過剰発現の実験は現在も継続中である。Interferon- $\beta$  による抗腫瘍効果のひとつとして血管新生抑制因子である IP10 の発現誘導と血管新生因子である VEGF の発現抑制に伴う血管新生抑制による機構が考えられる。In vivo の実験は現在も施行中である。

#### 4. VEGF プロモーター活性の抑制 (参考文献 3)

目的：グリオーマの成長、増殖には血管新生が必須であり、VEGF が重要な血管新生因子であることより、VEGF を標的とした治療が考えられている。その中で、VEGF のプロモーター活性を抑制する戦略の報告は未だに少ない。プロモーター活性を抑制する物質を探索した (Figure 3)。

対象および方法：

- 1) VEGF promoter / reporter plasmid の作成：1.6 kb のマウス VEGF promoter のフラグメ

ントを reporter plasmid である pGL2 basic (Promega)につなげた pGL-VEGF plasmid DNA を作成した。またヒト VEGF promoter のフラグメントを reporter plasmid である pGV2 につなげた pYO13 plasmid DNA を作成した。

- 2) Luciferase assay: 1  $\mu$ g の plasmid DNA を pGL-VEGF DNA はラット C6 グリオーマ細胞に、pYO13 DNA はヒトグリオーマ細胞、U87 にリポフェクチンでトランスフェクションし、48時間の培養後、ルミノメーターで細胞抽出液の luciferase activity を測定し、VEGF promoter activity を評価する系を確立させた。同時に48時間培養後の培養液の VEGF 濃度を ELISA で測定し、48時間培養後の細胞より RNA を抽出し、RT-PCR にて VEGF mRNA 発現を測定した。また、48時間培養後の培養液による HUVEC の遊走能をボイデンチャンバーを用いて測定した。
- 3) プロモーター活性の抑制物質の探索：トランスフェクション後色々な薬物を投与し、プロモーター活性を抑制する物質を探索した。薬物として VEGF のプロモーター領域に結合する転写因子、SP1 の抑制剤である mithramycin A、protein tyrosine kinase の抑制薬である genistein、血管新生抑制作用のある thrombospondin, retinoic acid, pentoxifyllin, theobromin である。

結果：VEGF プロモーター活性の抑制は Mithramycin A 10 nM : 52%、All trans-retinoic acid 1  $\mu$ M: 26.2%、genistein 100  $\mu$ M: 73.9%、150  $\mu$ M: 81.4%、thrombospondin 250  $\mu$ g/ml: 22.7%、theobromin であった。培養液中の VEGF 濃度はそれぞれコントロールに比べて低下し、RT-PCR による細胞の VEGF mRNA 発現は低下し、培養液による HUVEC の遊走能を抑制した (参考文献 Fig 11)。

結語：Mithramycin, retinoic acid, genistein, thrombospondin, theobromin は VEGF のプロモーター活性を抑制し、引き続き VEGF の mRNA 発現および分泌を抑制し、結果としてグリオーマ細胞培養液による HUVEC の遊走能を抑制した。以上のことより、これら VEGF プロモーター活性の抑制薬は、グリオーマに対する VEGF を標的とした治療のひとつとなりうると考えられた。

## 5. 外因性血管新生抑制物質を投与する方法：

目的：1) グリオーマにおいては血管新生因子として VEGF が重要な因子であることから、外因性抑制物質の中でも VEGF の抑制を標的とした治療を考える。すなわち、前回までの研究で明らかにされた VEGF プロモーター活性を抑制し、引き続き VEGF の mRNA 発現および分泌を抑制し、結果としてグリオーマ細胞培養液による HUVEC の遊走能を抑制する物質を in vivo で用い、グリオーマ増殖、血管新生の抑制を検討

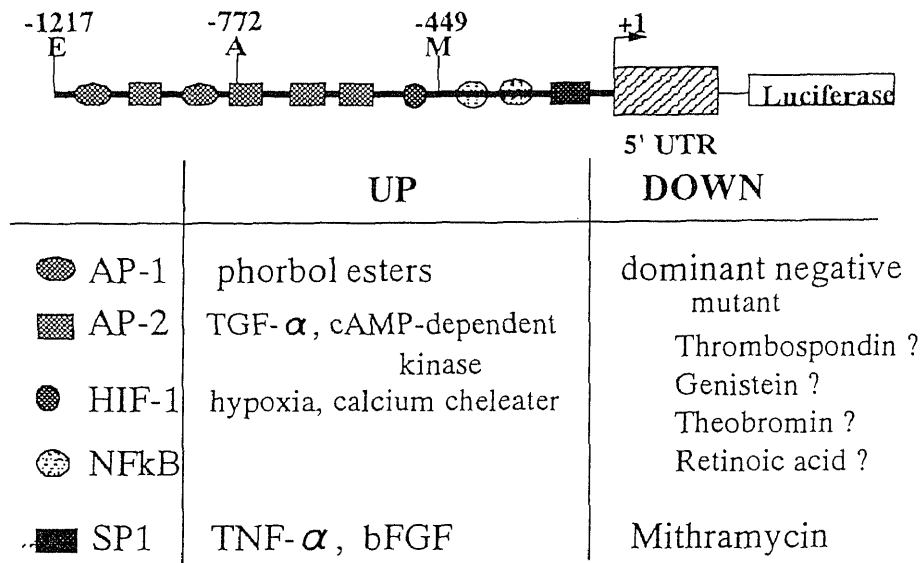
する。2) また、臨床応用を考える上で VEGF だけでなく非特異的に血管新生を抑制する経口薬の開発が望まれる。イルソグラジン、トラニラスト、カプトリルの経口投与による *in vivo* モデルでのグリオーマ増殖、血管新生の抑制を検討する。3) *in vivo* のモデルとして皮下腫瘍モデル、脳腫瘍モデルをこれまで用いてきたが、生体での血管新生の状態を観察するために新たに脳腫瘍微小循環モデル(Cranial window model)を開発する。

対象および方法：1) VEGF 抑制を標的とし、経口摂取が可能な物質として pentoxifyllin、トラニラスト、theobromin を用いて、マウス U87 皮下腫瘍モデルによる腫瘍増殖抑制を評価する。2) 6 週令のオス SCID マウスの頭部に径 6 mm の円形の開頭を行い、硬膜を切開後、径 7 mm のカバーガラスを開頭部に置き、レジンで固定する。腫瘍血管の観察には開頭部に 1 mm<sup>3</sup> の大きさの U87 腫瘍フラグメントを置き、レジンで固定する。1 週間後に蛍光顕微鏡にて微小循環のパラメーターを測定する。FITC-dextran 40 mg / kg を i.v して正常脳表あるいは腫瘍血管の分岐、径の太さを、FITC でラベルしたマウス赤血球を i.v.して血流速度を、rhodamin 6G 100 μg / kg i.v.で白血球をラベルして白血球と血管内皮細胞との interaction (adhesion と rolling の程度)を評価する。

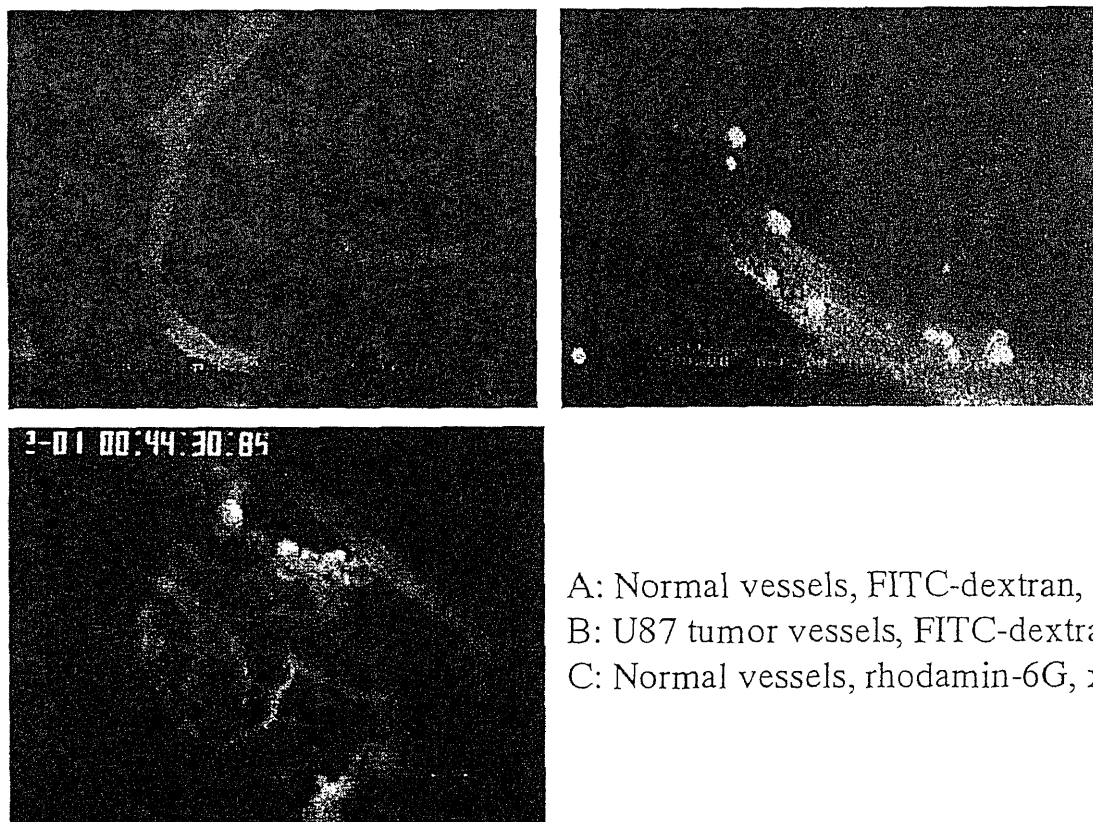
結果：

- 1) 外因性血管新生抑制物質の利用：theobromin が VEGF promoter activity を抑制すること、pentoxifyllin が VEGF の mRNA 発現および蛋白産生を抑制すること、両者が神経膠腫が誘発する血管内皮細胞の遊走を抑制することが明らかにされた。これら theobromin, pentoxifyllin は現在すでにほかの用途で、ヒトに投与されている経口薬であり、*in vivo* での効果を検討している。
- 2) Mouse Cranial Window Model を用いた intravital tumor microcirculation の評価で上記血管新生抑制物質の効果を判定している。正常脳の血管構築 (Figure 4A)に比べて、U87 腫瘍片での腫瘍血管は蛇行し数が増加していた (Figure 4B)。また、正常脳表血管では多くの白血球が adhesion あるいは rolling していたが(Figure 4C)、腫瘍血管では白血球の rolling が減少していた。U87 腫瘍片を移植した tumor microcirculation の評価は現在も施行中である。

結語：cranial window model はまだモデルの確立ができた段階で、次年度以降に治療による評価を行う。



**Figure 3** Molecular Target of VEGF Promoter Region



A: Normal vessels, FITC-dextran, x50  
 B: U87 tumor vessels, FITC-dextran, x50  
 C: Normal vessels, rhodamin-6G, x200

**Figure 4** Intravital microscopic observation of microcirculation in normal brain (A, C) and U87 glioma (B) .Note tortuous vessels in U87 tumor and many rolling white blood cella in normal vessels.

## 今後の展望

- 1) VEGF を標的とした抗血管新生療法：悪性神経膠腫の増殖には血管新生が必須であり、血管新生因子と抑制因子のバランスから成り立っている。血管新生因子では、Vascular endothelial growth factor (VEGF) が中心的な役割を果たし、thymidine phosphorylase, tissue factor、 osteopontin,  $\alpha$  V $\beta$ 3 integrin といった種々の血管新生関連因子と密接な関係があることが *in vitro*, *brain in situ* の研究で明らかにされた。今後は VEGF に標的をしぼり、抗 VEGF 抗体を用いた抑制、VEGF promoter 活性の抑制による神経膠腫の血管新生抑制を *in vivo* model で検討する。特に VEGF promoter activity inhibitor での報告は少ない。さらに、生体内での血管新生には VEGF 以外にも多数の血管新生因子が働いており、VEGF 単独の効果を評価するのは難しい。そこで、内因性 VEGF 発現がない神経膠腫細胞に VEGF を強制発現させた細胞を用いることによる、抗 VEGF 抗体の効果とともに、VEGF promoter activity inhibitor の評価を行う点が特徴である。
- 2) 合成ペプチドによる抗血管新生療法：抑制因子では神経膠腫細胞自身もつ内因性血管新生抑制因子のうち、Thrombospondin 1(TSP1)、Brain specific angiogenesis inhibitor 1(BAI1)が重要であるが、TSP1 は血管新生抑制だけでなく、逆に腫瘍の浸潤、接着に有利な方向での作用もみられる。また、BAI1 の発現は、悪性神経膠腫を含めて種々の癌組織でもみられ正常脳（正常 astrocyte）特異的ではなかった。そこで今後は TSP1, BAI1 両者の構造内にみられ、血管新生抑制に特異的に働く type I repeat に注目し、type I repeat 内のアミノ酸 20 個以内のペプチドによる血管新生抑制を *in vivo* model で検討する。TSP1 の構造内には血管新生抑制作用の他に、TGF- $\beta$  の活性化部位、CD36 結合部位があり腫瘍の接着、浸潤を促進する作用もみられること、TSP1 は分子量 450 kD の 3 量体であることより、実際の治療を考える上で、血管新生作用だけをもつ分子量の小さな合成ペプチドの検索を行う点が独創的であり、かつ実践的である。Type I repeat のペプチドに注目し、純粹に血管新生抑制作用を目指した研究は近年始まったばかりである。強力な内因性血管新生因子として注目されている angiostatin は plasminogen の、endostatin は collagen type XVIII の分解産物としてのフラグメントであり、TSP1 も全分子ではなく、ペプチドでの効果をみることは理論的と思われる。
- 3) Cranial window を用いた血管新生の評価：神経膠腫の血管新生抑制の *in vivo* での評価を cranial window を用いることにより、*intra-vital* の状態で観察する。腫瘍血管の形態、数だけでなく、腫瘍血流量、白血球と血管内皮細胞との相互関係、イン

テグリンなど接着因子との関係、血管透過性を同時に観察することができる。また、移植する腫瘍細胞を GFP などの色素マーカーでラベルすることで、VEGF 発現腫瘍細胞と腫瘍血管との関係 (ex. hypoxic lesion の同定) を観察する。Cranial window model による血管新生抑制評価：腫瘍の血管新生抑制効果の評価は現在まで、*in vitro* での腫瘍に誘発される内皮細胞の遊走能、増殖能、管腔形成能、protease 産生能、*in vivo* での腫瘍の大きさの測定、摘出した腫瘍組織の血管数、血管新生因子の発現定量、あるいは生存率で行われてきた。Cranial window を用いた微小循環を評価することにより、脳という環境で血管新生の *in vivo* さらに *intra-vital* (=生存した状態) の評価ができることが本研究での意義であり、独創的な点である。Cranial window model は新しい model ではないが、その作成が難しく、当 model で血管新生抑制の評価まで行った研究は殆どみられない。申請者 (高野) は近年 cranial window model を用いて精力的に研究を行っている Dr. Jain (MGH, Boston) の研究室で 99 年春 model 作成を習熟した。

4) 経口血管新生抑制薬による神経膠腫治療への可能性：前回までの研究で theobromin, pentoxifyllin (ロコルナール<sup>TM</sup>) など現在抗アレルギー剤、循環改善剤として実際に経口薬として用いられている薬剤が神経膠腫細胞の VEGF の mRNA 発現, 蛋白分泌を抑制することが明らかにされた。動物実験での成果をだすまでには至らなかった。他に銅キレート剤：trientine (メタライト<sup>TM</sup>), tranilast, irsogladin, ACE 阻害剤：captopril (カプトリル<sup>TM</sup>), perindopril (コバシル<sup>TM</sup>) は血管新生とは違う領域で使用されているが、血管新生抑制作用を持つ経口薬である。今回は U87 皮下腫瘍モデル、次に cranial window モデルにおける *intra-vital* の血管新生抑制作用を検討する。これらの *in vivo* 実験結果に基づき、神経膠腫再発例の患者への投与の展開を検討する。経口血管新生抑制薬による評価：今回対象となる薬剤はすでに臨床で血管新生とは違う目的で用いられており、副作用がなく使用できる点が最大の特徴である。また既存の抗癌剤との併用による相乗効果も検討でき、悪性神経膠腫の患者にどの薬剤を臨床応用するかをマウス *In vivo* model で決定することが急務であり、今後の臨床応用への展開の糸口となる。経口血管新生抑制薬による評価：種々の薬剤で血管新生抑制作用が *in vitro*、*in vivo* で確かめられている。生体への応用は米国では、thalidomide が臨床試験されている。日本では糖尿病性網膜症の患者へのイルソグラチンの試験が行われている程度である。単独で血管新生を抑制し腫瘍増殖を抑えることは難しいかもしれない。経口血管新生抑制薬と抗癌剤を全身投与で、interferon- $\beta$ 、ヒト型抗 VEGF 抗体、TSP1 ペプチドを ommaya valve より局所投与し相乗効果で悪性神経膠腫の増殖を抑える試みはまだなされていない。



## 謝辞

本研究は筑波大学基礎医学系の大島宣雄先生、伊藤千夏先生、筑波大学技官の塚田喜子さん、宮川まき子さん、森田和子さん、山口孝子さん、伊藤百代さん、日本ロシュ（株）研究所、抗癌剤研究グループの田中 裕先生、東レ（株）の原田謙治先生、第1製薬（株）の市川 豊さんのお力添えにより成果を得ることができました。ここに研究にご協力いただきました方々に深謝致します。

著作権の制約により、報告書に掲載のある以下の 2 論文はオンラインでは公開していません。

Takano S, Tsuboi K, Matsumura A, Tomono Y, Mitsui Y, Nose T. Expression of the angiogenic factor thymidine phosphorylase in human astrocytic tumors. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. J Cancer Res Clin Oncol. 2000 Mar;126(3):145-52.

<http://dx.doi.org/10.1007/s004320050024>

Takano S, Tsuboi K, Tomono Y, Mitsui Y, Nose T. Tissue factor, osteopontin,  $\alpha_v\beta_3$  integrin expression in microvasculature of gliomas associated with vascular endothelial growth factor expression. *British Journal of Cancer* (2000) 82, 1967-1973.

<http://dx.doi.org/10.1054/bjoc.2000.1150>